

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA ORAL NO
DESENVOLVIMENTO DE COMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO
ONCOLÓGICO DO CÂNCER DE BOCA**

MARIANNA SAMPAIO SERPA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Emmanuel Dias Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

S486 Serpa, Marianna Sampaio

Avaliação da microbiota oral no desenvolvimento de complicações do tratamento oncológico do câncer de boca / Marianna Sampaio Serpa – São Paulo, 2020.

125p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Emmanuel Dias-Neto

Descritores: 1. Neoplasias Bucais/Mouth Neoplasms. 2. Infecção da Ferida Cirúrgica/Surgical Wound Infection. 3. Estomatite/Stomatitis. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real/Real-Time Polymerase Chain Reaction. 5. Metagenômica/Metagenomics. 6. RNA Ribossômico 16S/RNA, Ribosomal, 16S.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2779

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

A minha linda irmã Vivi que foi luz mesmo nos momentos mais difíceis de sua vida. Você foi e sempre será minha inspiração. Com você, aprendi que mesmo nos dias mais tristes ainda devemos sempre acabar eles com um sorriso no rosto e imensa gratidão pela vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos pacientes que participaram deste estudo o meu muito obrigado. Vocês permitiram que em prol da pesquisa eu os acompanhasse no que deve ter sido um dos ou o momento mais difícil na vida de vocês, e mesmo assim sempre me receberam com muita gentileza e carinho. A vocês, meu eterno agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Um projeto desta dimensão nunca poderia ter sido feito sozinho, e fico muito feliz em afirmar que tive muita gente me ajudando de tantas maneiras diferentes, mas igualmente importantes.

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** que colocou pessoas maravilhosas em minha vida e me fez sentir paz mesmo em momentos de extremo cansaço e o que deveria ser de desespero. Sem Ele esse doutorado com certeza teria sido bem mais difícil.

Aos meus pais, **Ricardo e Margarete**, por tudo. Vocês são o meu mundo, e eu nunca terei como agradecer tudo que vocês fizeram e continuam fazendo por mim. Espero um dia poder retribuir um pouco do que vocês me dão diariamente. Obrigada por mesmo não entendendo por que eu gosto tanto de pesquisa, sempre me apoiaram e deram o suporte que preciso. Eu amo vocês daqui até o infinito!

A minha irmã **Manuella** que é a minha alma gêmea. Somos tão diferentes e ao mesmo tempo tão iguais. Você mesmo a distância fez os meus dias mais leves através das nossas chamadas de vídeo que sempre foram cheias de risadas e muito carinho. Aos meus irmãos **Carlos, João e Tatiana**, e cunhados **Luciano, Fernando e Bruna**, por todo o apoio, amor e cumplicidade. Mesmo cada um em um canto do mundo, sempre torcemos juntos pela felicidade de todos.

Ao meu noivo **André**, por toda a compreensão e amor que você sempre me deu. Estamos juntos há tantos anos que quando me perguntam o tempo eu até me atrapalho nas contas. Você é meu melhor amigo e companheiro, sempre apoiou minhas escolhas e nunca me deixou desistir dos meus sonhos. Durante todos os anos de pós-graduação você me ajudou de tantas formas que é difícil descrever. Mesmo de longe você fez meu doutorado ser mais tranquilo e me acalmou em momentos difíceis. Muito obrigada por tudo, meu amor!

Aos meus sobrinhos lindos, **Biel, Clarinha, Sofia e Luquinhas**, que são as paixões da minha vida. Mesmo sem terem noção vocês me ajudaram a descontrair e rir em momentos de tensão. Ver vocês crescendo com certeza é uma das maiores alegrias da minha vida. Aos meus sobrinhos-cães, **Meg, Johnny e Mike**, que a cada visita me derrubam no chão de tanta alegria, e mesmo sem falarem sempre me passam tanto amor e carinho. Tia Mari ama muito todos vocês!

Aos meus amigos do mestrado, **Amanda, Hugo, Jefferson, Leorik, Luiz Arthur e Thalita**, por todas as gargalhadas, conselhos e desabafos. Nós entramos todos juntos na pós-graduação 6 anos atrás. Nossas amizades cresceram com base no nosso amor pelo ensino e pesquisa, e hoje, quase todos doutores (só falta eu!) sei que todos estão preparados para seguir a carreira de docentes com muito carinho e dedicação.

Aos demais familiares e amigos, muito obrigada por todo o apoio e carinho que foi tão importante para o andamento e conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, **Dr. Emmanuel Dias-Neto**, por todos os ensinamentos ao longo desses 4 anos. Obrigada pela imensa confiança que você depositou em mim. Hoje refletindo vejo que você teve muita coragem em orientar uma dentista que nunca tinha trabalhado com biologia molecular, e muito menos com metagenômica. Agradeço a paciência, gentileza e por sempre me passar muita tranquilidade quando eu estava apreensiva ou com dúvidas. Sua dedicação e amor pela pesquisa é admirável e fez com que eu tivesse cada vez mais vontade de aprender. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, por abrir as portas do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço para mim. Obrigada por sempre se mostrar acessível e estimular tanto a pesquisa, sempre se mostrando entusiasmado com cada descoberta e nova ideia. À **Dra. Diana Nunes**, pelo incentivo e empolgação com cada novo resultado. Suas sugestões foram essenciais para a escrita e andamento deste projeto. Agradeço imensamente também sua constante preocupação com meu bem-estar, sendo sempre solícita a ajudar, e fazendo com que eu sempre me sentisse bem acolhida.

Ao meu querido grupo Genômica Médica, por todos os aprendizados. Com vocês eu cresci bastante e aprendi além do que achava possível. Fico muito feliz em dizer que aqui fiz amizades que vou levar para a vida. Não tem distância que me separe de vocês. Agradeço em especial à **Dra. Maria Amorim** que me ensinou basicamente tudo o que sei de bancada. Muito obrigada pela paciência, amizade e diversos bons momentos compartilhados. Embora hoje você não esteja mais no grupo, você foi essencial para a execução deste trabalho. À **Dra. Thais Bartelli** pelas incontáveis vezes que você me ajudou, seja para discutir alguma nova análise ou só para ver se as cores na figura ficaram boas. Você com certeza fez o meu trabalho de doutorado ser melhor e os meus dias mais fáceis e descontraídos. Obrigada por todas as sugestões, conselhos e intermináveis gargalhadas. À **Isabella** por sempre me passar calma e confiança. Mesmo nos dias mais estressantes

você sempre soube me confortar e passar a sensação que tudo ia ficar bem. À **Gabriela Albuquerque**, por toda a ajuda, seja em algum experimento ou em conversas bobas para nos distrair. Você é um exemplo de determinação e dedicação, e sou muito grata por ter você como amiga. À **Gabriela Branco**, por ter me ajudando extensamente nos experimentos de PCR em tempo real. Obrigada pelo suporte e apoio.

Ao grupo de Bioinformática, em especial ao **Dr. Israel Tojal e Rodrigo Borges**, por terem desenvolvido com muita dedicação e empenho o *pipeline* usado no processamento das amostras sequenciadas. À **Alexandre**, por sempre processar o resultado dos sequenciamentos o mais rápido possível, e à **Bruno**, pelas diversas vezes que precisei de ajuda usando o *RStudio* incluindo passarmos horas tentando identificar porque o comando simplesmente não rodava. Aos dois agradeço imensamente a paciência e amizade formada.

Ao **Dr. Vinícius Calsavara**, por me orientar nas análises estatísticas, e fazer com que eu aprendesse muito nesta área. Obrigada pela disponibilidade de tempo e paciência, e por sempre se mostrar disposto a me ajudar, incluindo ter que usar diferentes meios ou explicações para que eu entendesse melhor a análise proposta.

A toda a **equipe de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center**, por toda a ajuda e acessibilidade que vocês sempre me proporcionaram fazendo eu também me sentir do grupo. Agradeço em especial ao **Dr. Fábio Alves**, que foi quem me apresentou ao Dr. Emmanuel, para eu fazer o doutorado aqui na instituição. Sem a sua ajuda as coisas incríveis que me aconteceram nos últimos anos não teriam sido possíveis. Serei sempre grata por isso. Aos titulares, residentes e alunos de pós-graduação do departamento, agradeço por todas as risadas e bons momentos compartilhados. Aqui também fiz boas amizades. Em especial, agradeço a **Camila, Flávio, Matheus, Patrícia e Teresa** por terem feito alguma coleta para mim quando por algum motivo eu não poderia fazer. À **Matheus**, em particular, agradeço por ter feito eu me sentir mais perto de casa. Você foi a primeira amizade que fiz em São Paulo e sei que vou levar para a vida.

A toda a equipe médica e de enfermagem da Cirurgia de Cabeça Pescoço, Radioterapia, internação e UTI do A.C. Camargo Cancer Center por sempre terem permitido o meu acesso aos departamentos, sempre facilitando o meu acesso aos pacientes e as coletas. Agradeço, em especial, os então residentes da Cirurgia de Cabeça e Pescoço, **Jorge e Celso**, por terem esclarecido dúvidas que tive durante o projeto.

À **Dra. Jurema Castro**, por ter me inserido na pesquisa quando eu ainda estava no quinto período da faculdade de odontologia. Você que me apresentou a este universo maravilhoso de questionamentos e descobertas que tanto me apaixonei. Obrigada pelo incentivo em seguir carreira na pós-graduação, conselhos e ensinamentos.

A todas as **funcionárias da Pós-Graduação, escritório de projetos e Centro Internacional de Pesquisa e Ensino** pela presteza, competência e auxílio que foram essenciais para o bom funcionamento deste doutorado.

À minha banca de qualificação **Dra. Raquel Ajub Moysés e Dra. Eloiza Helena Tajara Da Silva**, agradeço por todas as correções e sugestões, que foram importantes para melhorar este trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON)**, pelo apoio financeiro que me possibilitou a realização deste curso e execução deste trabalho.

RESUMO

Serpa MS. **Avaliação da microbiota oral no desenvolvimento de complicações do tratamento oncológico do câncer de boca.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

A infecção do sítio cirúrgico (ISC) e mucosite oral (MO) são complicações comuns e debilitantes advindas do tratamento de pacientes com câncer de boca (CB). Avaliamos o papel da microbiota oral durante o tratamento do CB, buscando compreender seu papel no desenvolvimento da ISC e MO. Para isso coletamos *swabs* orais em dois módulos com focos distintos: I) coletas pré- e pós-operatórias, para o estudo da ISC e II) coletas pré- e trans-radio-quimioterapia, para o estudo da MO. Avaliamos a quantidade de DNA bacteriano e humano (PCR em tempo real) e a composição da microbiota bacteriana (metagenômica, pelo sequenciamento do gene 16S DNA ribossomal). No módulo I coletamos 172 amostras obtidas de 45 pacientes, dos quais 14 (31,1%) tiveram ISC. Os aspectos clínicos relacionados à ISC foram estágio clínico avançado, esvaziamento cervical, reconstrução cirúrgica e maior tempo de cirurgia. Pacientes com ISC apresentaram maior diversidade bacteriana, e abundância de *Prevotella* e *Porphyromonas*. A maior quantidade de *Aggregatibacter* no momento pós-operatório (antes de ISC) indicou maiores chances (OR: 5,67; IC: 1,25-25,60) de ocorrência de ISC. No módulo II, coletamos 199 amostras obtidas de 44 pacientes, dos quais 27 (61,4%) desenvolveram MO severa. Estes casos mostraram menor quantidade de DNA bacteriano ao longo do tratamento, mas uma maior diversidade e distinta composição bacteriana desde a pré-radioterapia. *Actinomyces* e *Granulicatella* em maior quantidade antes do início da radioterapia indicaram maior chance (OR: 20,5; IC: 4,22-99,73) de MO severa. Registramos o grande impacto, quantitativo e qualitativo, da cirurgia na microbiota oral com aparente recomposição antes do início da radioterapia. Por fim, concluímos que a microbiota influencia o desenvolvimento da ISC e da MO, com *Aggregatibacter*, *Porphyromonas* e *Prevotella* exercendo possível papel no desenvolvimento da ISC e a presença aumentada de *Actinomyces* e *Granulicatella* estando relacionada a grande aumento nas chances de desenvolvimento de MO.

Descritores: Neoplasias Bucais. Infecção da Ferida Cirúrgica. Estomatite. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Metagenômica. RNA Ribossômico 16S.

ABSTRACT

Serpa MS. [Assessment of oral microbiota in the development of complications of oncological treatment of oral cancer]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Surgical site infection (SSI) and oral mucositis (OM) are common and debilitating complications arising from oral cancer (OC) treatment. We evaluated the role of the oral microbiota during the treatment of OC, seeking to understand its role in the development of SSI and OM. Oral swabs were collected based on two modules: I) pre- and postoperative collections, for the study of SSI and II) pre- and trans-radio-chemotherapy collections, for the study of OM. We evaluated the quantity of bacterial and human DNA (real-time PCR) and bacterial microbiota composition (metagenomic, by sequencing the 16S ribosomal DNA). In module I, we collected 172 samples obtained from 45 patients, of which 14 (31.1%) had SSI. Clinical data related to SSI were advanced clinical stage, neck dissection, surgical reconstruction and longer surgery time. Patients with SSI showed greater bacterial diversity, and greater abundance of *Prevotella* and *Porphyromonas*. The greater amount of *Aggregatibacter* in the postoperative moment (before SSI) indicated greater chances (OR: 5.67; IC: 1.25-25.60) of occurrence of SSI. In module II, we collected 199 samples obtained from 44 patients, of which 27 (61.4%) developed severe OM. These cases had a lower quantity of bacterial DNA throughout the treatment, but a greater diversity and distinct bacterial composition since pre-radiotherapy. *Actinomyces* and *Granulicatella* in greater quantity before the beginning of radiotherapy indicated a greater chance (OR: 20.5; IC: 4.22-99.73) for severe OM. Surgery had a great impact, quantitatively and qualitatively, on the oral microbiota with apparent recomposition before radiotherapy began. Finally, we conclude that the microbiota influences the development of SSI and OM, with *Aggregatibacter*, *Porphyromonas* and *Prevotella* playing a possible role in the development of SSI and the increased presence of *Actinomyces* and *Granulicatella* being related to a great chance of developing OM.

Key-words: Mouth Neoplasms. Surgical Wound Infection. Stomatitis. Real-Time Polymerase Chain Reaction. Metagenomics. RNA, Ribosomal, 16S.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação das regiões do gene 16S-rDNA bacteriano	10
Figura 2	Número de pacientes em cada módulo do estudo.....	18
Figura 3	Divisão do projeto de acordo com o tipo de tratamento do paciente	19
Figura 4	Descrição da média de dias entre os momentos de coletas de acordo com o dia da cirurgia	39
Figura 5	Descrição das coletas de cada paciente de acordo com o dia da cirurgia	40
Figura 6	Gráfico de perfil dos CTs, conforme o momento da coleta estratificado por infecção do sítio cirúrgico	42
Figura 7	Curva de saturação das 172 amostras sequenciadas do módulo I	44
Figura 8	Curva de saturação das 9 amostras com número de sequencias abaixo de 6.000 reads	45
Figura 9	Frequência relativa das bactérias a nível de gênero de acordo com o momento de coleta do módulo I	47
Figura 10	Diversidade alfa em relação à presença ou ausência de infecção do sítio cirúrgico a nível de OTU nos quatro momentos das coletas	48
Figura 11	Diversidade beta em relação à infecção do sítio cirúrgico a nível de OTU nos quatro momentos de coletas.....	49
Figura 12	Gráfico de perfil da diversidade alfa em relação ao momento da coleta e estratificado por infecção do sítio cirúrgico	51

Figura 13	Gráfico de perfil em relação à diversidade alfa a nível de OTU estratificado por infecção do sítio cirúrgico ao longo das quatro coletas	52
Figura 14	Frequência relativa dos 194 gêneros bacterianos presentes nas 172 amostras do módulo I do estudo	55
Figura 15	Gráfico de perfil da frequência relativa dos gêneros mais abundantes ao longo das coletas de acordo com a presença da infecção do sítio cirúrgico ..	59
Figura 16	Gêneros bacterianos com diferente abundância entre os pacientes com e sem infecção do sítio cirúrgico em cada momento da coleta de acordo com escores da LDA.....	61
Figura 17	Descrição da média de dias entre os momentos de coletas de acordo com o dia da primeira sessão de radioterapia.....	74
Figura 18	Descrição das coletas de cada paciente de acordo com o dia da primeira sessão de radioterapia	75
Figura 19	Gráfico de perfil dos CTs conforme o momento da coleta estratificado pela mucosite oral (OMS)	77
Figura 20	Curva de saturação das 199 amostras sequenciadas do módulo II	81
Figura 21	Curva de saturação das 4 amostras com número de sequencias abaixo de 6.000 reads	81
Figura 22	Frequência relativa das bactérias a nível de gênero de acordo com o momento de coleta do módulo II	82
Figura 23	Diversidade alfa em relação à mucosite oral (OMS) a nível de OTU nos quatro momentos das coletas	84

Figura 24	Diversidade beta em relação à mucosite oral (OMS) a nível de OTU nos quatro momentos das coletas	84
Figura 25	Gráfico de perfil da diversidade alfa em relação ao momento da coleta estratificado pela gradação de mucosite oral (OMS).....	86
Figura 26	Gráfico de perfil em relação à diversidade alfa a nível de OTU estratificado pela mucosite oral (OMS) ao longo das quatro coletas	87
Figura 27	Frequência relativa dos 169 gêneros presentes nas 151 amostras do módulo II do estudo	89
Figura 28	Gráfico de perfil da frequência relativa dos gêneros mais abundantes ao longo das coletas de acordo com a severidade da mucosite oral (OMS)	93
Figura 29	Gêneros bacterianos com diferente abundância entre os pacientes com mucosite oral ausente/leve e severa (OMS) em cada momento da coleta de acordo com escores da LDA.....	95
Figura 30	Diversidade alfa a nível de OTU em relação ao swab coletado nos momentos VI e VII.....	101
Figura 31	Descrição da média de dias entre os momentos de coletas de acordo com o dia da primeira coleta	103
Figura 32	Gráfico de perfil dos CTs ao longo dos sete momentos de coleta.....	105
Figura 33	Diversidade alfa a nível de OTU em relação à região de coleta do momento I	106
Figura 34	Frequências dos gêneros mais abundantes dos módulos I e II do estudo.....	107

Figura 35	Frequência relativa dos 19 gêneros mais abundantes do módulo I e II do estudo ao longo dos momentos de coleta.....	108
------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínicos dos 45 pacientes submetidos à cirurgia.....	33
Tabela 2	Dados cirúrgicos dos 45 pacientes submetidos à cirurgia	34
Tabela 3	Análise das variáveis clínicas em relação à infecção do sítio cirúrgico	36
Tabela 4	Análise das variáveis cirúrgicas em relação à infecção do sítio cirúrgico	37
Tabela 5	Análise de associação entre a idade e as variáveis de tamanho e estágio clínico do tumor	38
Tabela 6	Avaliação do CT médio em relação ao gene-alvo e momento de coleta do estudo de infecção do sítio cirúrgico.....	41
Tabela 7	Avaliação do CT médio em relação ao gene-alvo, momento de coleta e presença de infecção do sítio cirúrgico	43
Tabela 8	Avaliação da diversidade alfa em relação ao momento de coleta e presença de infecção do sítio cirúrgico.....	49
Tabela 9	Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com a coleta e pacientes que tiveram ou não infecção do sítio cirúrgico	57
Tabela 10	Modelo de regressão logística dos 10 gêneros mais frequentes em relação ao momento de coleta e presença de infecção do sítio cirúrgico	65

Tabela 11	Dados clínicos gerais dos 44 pacientes submetidos à radioterapia associada ou não à quimioterapia.....	69
Tabela 12	Dados de tratamento radio-quimioterápico dos 44 pacientes avaliados no módulo II	70
Tabela 13	Análise das variáveis clínicas em relação ao grau de mucosite oral (OMS)	72
Tabela 14	Análise das variáveis relacionadas à radioterapia e número de lesões de mucosite em relação ao grau de mucosite oral (OMS)	73
Tabela 15	Avaliação do CT em relação ao gene-alvo e momento de coleta do estudo da mucosite oral	76
Tabela 16	Avaliação do CT em relação ao gene-alvo, momentos de coletas e de acordo com a severidade da mucosite oral (OMS)	79
Tabela 17	Avaliação do CT em relação ao swab controle e de mucosite do momento VI	80
Tabela 18	Avaliação do CT em relação ao swab controle e de mucosite do momento VII	80
Tabela 19	Avaliação da diversidade alfa em relação ao momento de coleta e severidade da mucosite oral (OMS)	85
Tabela 20	Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com a coleta e severidade da mucosite oral (OMS)	91

Tabela 21	Modelo de regressão logística dos 13 gêneros mais frequentes em relação ao momento de coleta e severidade da mucosite oral (OMS)	97
Tabela 22	Avaliação da frequência da Actinomyces e Granulicatella em relação à mucosite oral (OMS) e momento de coleta	98
Tabela 23	Avaliação do CT em relação aos swabs da coleta I (baseline) da cirurgia e radioterapia.....	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Lista de comorbidades de acordo com o NCI.....	21
Quadro 2	Sistema de estadiamento clínico TNM do câncer de boca	22
Quadro 3	Classificação da Sociedade Americana de Anestesia.....	23
Quadro 4	Sistema de gradação de mucosite proposto pela OMS.....	24
Quadro 5	Sistema de gradação de mucosite proposto pelo NCI.....	24
Quadro 6	Descrição dos momentos de coletas	25
Quadro 7	Amplificação do gene bacteriano 16S-rDNA e humano beta-actina	27
Quadro 8	Amplificação do gene bacteriano do 16S-rDNA.....	28
Quadro 9	Termociclagem para a amplificação do gene do 16S-rDNA	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASA	Do inglês, <i>American Society of Anesthesiologists</i> , traduzido como Sociedade Americana de Anestesiologistas
CEO	Carcinoma epidermoide oral
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPO-D	Refere-se ao número de dentes cariados, perdidos e obturados
C_T	Do inglês, <i>cycle threshold</i> , traduzido como limiar do ciclo
DNA	Do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucleíco
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Do inglês, <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> , traduzido como ácido etilenodiamino tetra-acético
HPV	Do inglês, <i>human papillomavirus</i> , traduzido como papiloma vírus humano
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corpórea
ISC	Infecção do sítio cirúrgico
MO	Mucosite oral
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	Do inglês, <i>National Cancer Institute</i>
NIC	Nível de inserção clínica
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Do inglês, <i>odds ratio</i>
OTU	Do inglês, <i>Operational Taxonomic Units</i> , traduzido como unidades taxonômicas operacionais
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> , traduzido como reação em cadeia de polimerase
PS	Profundidade de sondagem
rDNA	Do inglês, ribossomal DNA, traduzido como DNA ribossomal
RG	Recessão gengival
SDS	Do inglês, <i>sodium dodecyl sulfate</i> , traduzido como dodecil sulfato de sódio

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNM	Do inglês, <i>Tumor-Node-Metastasis</i> - sistema de estadiamento clínico que avalia o tamanho do tumor, envolvimento do linfonodo regional e presença de metástase à distância
TrisHCl	Tris-Hidrocloreto
UV	Luz ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de boca	1
1.2	Infecção do sítio cirúrgico	3
1.3	Mucosite oral	7
1.4	Microbiota oral	9
1.4.1	Características Gerais e Abordagens de Estudo	9
1.4.2	Microbiota oral e infecção do sítio cirúrgico	12
1.4.3	Microbiota oral e mucosite oral	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	METODOLOGIA	17
3.1	Considerações éticas	17
3.2	População de estudo	17
3.3	Amostra	17
3.3.1	Critérios de inclusão	19
3.3.2	Critérios de exclusão	19
3.4	Procedimentos para coleta de dados	20
3.4.1	Coleta de dados clínicos	20
3.4.2	Coleta de amostras para estudo da microbiota	24
3.5	PCR em tempo real: análise quantitativa do DNA bacteriano e humano	26
3.6	Sequenciamento do gene 16S-rDNA bacteriano	27
3.6.1	Amplificação do gene alvo (16S-rDNA) e sequenciamento	27
3.6.2	Processamento e filtragem das amostras sequenciadas	29
3.7	Análises estatísticas	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

4.1	Módulo I: Infecção do sítio cirúrgico.....	31
4.1.1	Dados clínicos.....	31
4.1.1.1	Caracterização dos dados clínicos.....	31
4.1.1.2	Análise estatística dos dados clínicos.....	35
4.1.1.3	Dados das amostras coletadas.....	39
4.1.2	Análise quantitativa das bactérias por PCR em tempo real.....	40
4.1.3	Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene do 16S-rDNA... 44	
4.1.3.1	Resultado do processamento dos reads	44
4.1.3.2	Diversidade alfa e beta.....	47
4.1.3.3	Bactérias: frequências e resultados estatísticos	53
4.2	Módulo II: Mucosite oral.....	68
4.2.1	Dados clínicos.....	68
4.2.1.1	Caracterização dos dados clínicos.....	68
4.2.1.2	Análise estatística dos dados clínicos.....	70
4.2.1.3	Dados das amostras coletadas.....	74
4.2.2	Análise quantitativa das bactérias por PCR em tempo real.....	76
4.2.3	Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene do 16S-rDNA... 80	
4.2.3.1	Resultado do processamento dos reads	80
4.2.3.2	Diversidade alfa e beta.....	82
4.2.3.3	Bactérias: frequências e resultados estatísticos	88
4.2.3.4	Comparação dos swabs controle e mucosite.....	101
4.3	Módulos I e II do estudo.....	102
4.3.1	Análise quantitativa das bactérias por PCR em tempo real.....	103
4.3.2	Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene do 16S-rDNA. 106	
4.3.2.1	Diversidade alfa.....	106
4.3.2.2	Bactérias: frequências e resultados estatísticos	107
5	CONCLUSÕES.....	109
5.1	Conclusões do Módulo I.....	109
5.2	Conclusões do Módulo II.....	109
5.3	Conclusões dos Módulos I e II.....	110

6	REFERÊNCIAS.....	112
----------	-------------------------	------------

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de consentimento livre e esclarecido

Apêndice 2 Diversidade alfa e beta em relação à infecção do sítio cirúrgico e parâmetros clínicos/cirúrgicos

Apêndice 3 Perfil dos CTs de acordo com o momento da coleta de todos os pacientes dos módulos I e II do estudo

Apêndice 4 Perfil das bactérias mais abundantes de acordo com o momento da coleta de todos os pacientes dos módulos I e II do estudo

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE BOCA

O câncer de boca (CB) ou câncer oral é o sexto tipo de câncer mais comum, representando globalmente cerca de 2,1% de todas as neoplasias malignas^{1,2}. O CB compreende desde a vermelhidão dos lábios até, superiormente, a junção do palato duro e mole e, inferiormente, a linha das papilas circunvaladas, incluindo neste espaço os lábios, dois terços anteriores da língua, mucosa jugal, assoalho oral, gengiva, região retromolar e palato duro³. Devido à sua alta incidência, ampla dispersão geográfica e agressividade (cerca de 50% dos casos têm uma sobrevida de 5 anos)⁴, o CB é extensamente estudado no mundo.

Mundialmente, as maiores taxas de incidência de CB se dão no sul e sudeste asiático, regiões do Pacífico, partes da Europa Central e Oriental e América Latina. Em alguns lugares, como Sri Lanka (Sul da Ásia), este é o tumor mais comum. Na América Latina, o Brasil tem a maior incidência de CB tendo sido estimado que este ano ele vai corresponder ao 5º tumor mais frequente no sexo masculino (11.180 novos casos) e 12º entre as mulheres (4.010 novos casos)^{5,6}. No Brasil, a maior incidência no sexo masculino será no Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (5ª posição) enquanto entre as mulheres se destaca o Nordeste (11ª posição)⁶.

Os principais fatores associados ao CB incluem o uso de tabaco e álcool. O consumo destes produtos foi associado com até 75% dos casos desta neoplasia, e quando usados em conjunto as chances de desenvolver CB são 40X maiores do que a de não-etilistas e não-tabagistas^{7,8}. Mesmo o consumo de tabaco sem fumaça aumenta o risco deste câncer. Na Ásia, por exemplo, a masca do betel (folha verde de pimenteira – agente carcinogênico) é comum. Este hábito aumenta em até 7,9 vezes a chance de desenvolver CB e explica porque este tumor é tão frequente nesse continente^{1,9}.

Outros fatores já associados ao desenvolvimento de CB incluem: dieta e nutrição inadequadas (incluindo o baixo consumo de vegetais, frutas e vitaminas e alto consumo de carne processada); predisposição genética (o indivíduo que fuma e bebe e apresenta

histórico familiar de CB tem 1,7 vezes maior chance de desenvolver esta doença); infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) - embora este esteja particularmente associado ao câncer de orofaringe - e radiação solar ultravioleta (UV) que é associada ao câncer de lábio^{7,10,11}.

A maioria dos casos de CB ocorre em homens acima dos 50 anos,¹² sendo mais comum nos dois terços anteriores da língua (língua oral – 40% dos casos), seguido do assoalho oral e lábio inferior¹³. Clinicamente, esta neoplasia usualmente se apresenta como uma lesão ulcerada, circundada por bordas elevadas e endurecidas, embora o aspecto exofítico de superfície irregular ou verruciforme também possa ser observado. Em fases mais iniciais o CB pode se apresentar somente como uma mácula de coloração esbranquiçada e/ou avermelhada¹⁴. Histologicamente, 90% dos casos de CB são do tipo carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide que é caracterizado pela proliferação desordenada de células epiteliais que invadem o tecido conjuntivo subjacente em forma de cordões ou ilhas^{15,16}.

O CB é classificado de acordo com o sistema de estadiamento clínico TNM, que permite a padronização da definição da extensão da doença de acordo com o tamanho do tumor no sítio primário (T), o grau de envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença de metástase à distância (M) – seguido de números que classificam cada um destes parâmetros. A partir desta avaliação é definido o estágio clínico, usado como base para definição do melhor tratamento para o paciente e a ter uma indicação do seu prognóstico^{17,18}.

O tratamento do CB pode incluir a cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. A escolha do tratamento ideal depende de diversos fatores que incluem o tamanho, localização e estágio clínico do tumor, comorbidades, ou a capacidade do paciente tolerar ou querer ser submetido ao tratamento proposto¹⁹. Particularmente, a excisão cirúrgica é a modalidade de preferência, todavia, os fatores descritos acima devem ser considerados pois caso o tumor, por exemplo, se encontre em um local de difícil visualização ou o paciente apresente uma metástase à distância, esta modalidade terapêutica não é indicada. Nestes casos, a radioterapia e/ou quimioterapia podem servir como um tratamento alternativo à cirurgia, ou como um tratamento neoadjuvante ou adjuvante à cirurgia²⁰. Além disso, para casos de tumores de cabeça e pescoço recorrentes ou

metastáticos, com progressão da doença durante ou após terapia à base de platina, a imunoterapia (pembrolizumabe e nivolumabe) também pode ser indicada²¹.

Diversas complicações podem ocorrer devido ao tratamento oncológico do CB. No tratamento cirúrgico destacam-se a infecção do sítio cirúrgico (ISC), infecção respiratória, necrose do retalho cirúrgico, sepse e óbito²². Já na radioterapia, o paciente pode apresentar mucosite oral (MO), xerostomia, infecções secundárias (*Candida*, por exemplo), odinofagia e disgeusia. Além disso, osteorradioneecrose e cáries de radiação também podem ocorrer a longo prazo³. Efeitos colaterais da quimioterapia e imunoterapia podem incluir MO, disgeusia, náusea, diarreia e anemia, dentre outros²³. ISC e MO, por serem o foco deste trabalho, serão discutidas mais extensamente a seguir.

1.2 INFECÇÃO DO SÍTIO CIRÚRGICO

Infecção do sítio cirúrgico (ISC) ou infecção da ferida cirúrgica é uma infecção pós-operatória no sítio cirúrgico que ocorre em até 30 dias após o procedimento.²⁴ Ela pode resultar em uma perda funcional significativa, resultados estéticos insatisfatórios, uso prolongado de medicamentos, maior tempo de internação com consequentemente aumento das despesas médicas, mais óbitos^{22,25,26}. Além disso, esta complicação pode adiar o início de tratamentos adjuvantes (radioterapia e quimioterapia)²⁵, e segundo Grandis et al.²⁷ pacientes com ISC são mais propensos a desenvolver recidiva locorregional quando comparados aos que apresentaram um quadro livre de infecções pós-operatórias.

Em geral, a ISC ocorre entre 0,95 e 1,9% dos pacientes submetidos à cirurgia em ambiente hospitalar, e representa cerca de 20% das infecções hospitalares, sendo um dos tipos de infecções mais comumente adquiridas em hospital²⁸⁻³⁰. Nas cirurgias de tumores de cabeça e pescoço a ISC ocorre em até 59% dos pacientes^{26,31,32}. No CB, exclusivamente, a ISC já foi observada entre 19,8 e 40,6% dos casos, sendo a complicação pós-operatória mais frequente nestes pacientes^{22,33,34}.

De acordo com a probabilidade e grau de contaminação da ferida no momento da operação, as cirurgias são divididas em quatro tipos: (I) cirurgias limpas - realizadas em tecidos não infeccionados ou inflamados e que não têm penetração nos tratos digestivo, respiratório ou urinário. A cicatrização é de primeira intenção e não há drenagem aberta; (II) cirurgias potencialmente contaminadas - aquelas em que também não há processo

infeccioso e inflamatório, porém o tecido é de difícil descontaminação e apresenta penetração nos trato digestivo, respiratório ou urinário; (III) cirurgias contaminadas - aquelas realizadas em tecidos recentemente traumatizados e abertos, cuja descontaminação seja difícil ou impossível; (IV) cirurgias sujas ou infectadas - feridas traumáticas com tecido desvitalizado, infectado ou víscera perfurada³⁵.

De modo geral, o tipo de cirurgia está associado ao potencial de desenvolver ISC. Já foi observado, por instância, que cirurgias potencialmente contaminadas, contaminadas e sujas aumentam em 54%, 167% e 105%, respectivamente, a chance do paciente ter ISC quando comparadas as cirurgias limpas³⁶. As intervenções em cabeça e pescoço são em geral classificadas como potencialmente contaminadas devido à contaminação da ferida cirúrgica por bactérias do trato aerodigestivo superior (cirurgias na cavidade oral, faringe, laringe e etc). Por outro lado, as cirurgias que envolvem apenas tireoide, parótida e pescoço são categorizadas como cirurgias limpas³⁷⁻³⁹.

Estudos realizados nos anos 1980^{40,41} observaram que o uso de antibiótico profilático em cirurgias de cabeça e pescoço diminuiu significativamente a ocorrência de ISC sendo atualmente um consenso sua indicação na profilaxia nas cirurgias potencialmente contaminadas. Uma colaboração internacional de diversos grupos recomenda atualmente na cirurgia de cabeça e pescoço potencialmente contaminada o uso profilático por 24 horas a cefazolina ou cefurozima com metronidazol, ampicilina/sulbactam ou clindamicina quando o paciente é alérgico à penicilina. A adição de um aminoglicosídeo (*i.e* gentamicina, amicacina) com clindamicina também é indicada quando se tem um alto risco de contaminação da ferida cirúrgica por bactérias gram-negativas⁴². Este guia foi formulado a partir de resultados de trabalhos prévios; todavia o antibiótico ideal para este tipo de procedimento ainda é discutido na literatura.

Destaca-se que embora o uso de antibiótico profilático já seja uma prática comum nos centros hospitalares, a ISC ainda é a complicação pós-operatória mais frequente no paciente com CB submetido à cirurgia. Karakida et al.³⁴, por exemplo, mesmo fazendo o uso profilático com ampicilina ou cefmetazol (60 minutos antes da cirurgia) e continuado (nos primeiros 3 dias após a cirurgia), 40,6% dos pacientes com CB ainda desenvolveram ISC. Assim, embora o uso do antibiótico profilático tenha sido uma descoberta extraordinária que reduziu consideravelmente a ocorrência da ISC, ainda é necessário

desenvolver ou aperfeiçoar meios de a evadir, para que ela não seja mais uma complicação usual da cirurgia.

Os critérios mais usados para definir uma ISC na região de cabeça e pescoço são os estabelecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC)⁴³ e Johnson et al.⁴⁰ O primeiro considera como sinais de infecção a presença de drenagem purulenta, microrganismos identificados a partir de amostras obtidas assepticamente, deiscência espontânea com febre ($>38^{\circ}\text{C}$) ou dor ou sensibilidade localizada e abscesso. Já o segundo critério faz a gradação da ISC segundo a sua severidade: 0- cicatrização normal; 1- eritema ao redor da sutura limitado a 1cm; 2- eritema com 1 a 5cm; 3- eritema com mais de 5cm e endurecimento; 4- drenagem purulenta espontânea ou por incisão ou dreno; 5- fístula orocutânea. Uma revisão realizada por Akashi et al.⁴⁴ observou que falta uniformidade entre os critérios usados para definir ISC em um paciente submetido à cirurgia oncológica em boca com reconstrução simultânea. Em geral, os critérios usados são adaptações dos dois descritos acima, e uma das diferenças principais foi atribuída a interpretação da fístula orocutânea. De acordo com os autores a fístula orocutânea só deve ser considerada uma ISC quando causada por uma infecção aparente, isto é, com formação de abscesso, e não quando ela tiver resultado de uma isquemia do retalho, por exemplo. Por isso, eles enfatizam que para categorizar uma fístula orocutânea como ISC deve ser considerado sua etiologia.

Fatores intrínsecos (relacionados ao paciente) e extrínsecos (relacionados ao procedimento cirúrgico) já foram associados ao maior risco de desenvolver ISC. Dentre os fatores intrínsecos mais importantes para desenvolvimento da ISC encontram-se idade mais avançada, baixo índice de massa corpórea (IMC), diabetes *mellitus*, consumo de tabaco, anemia, linfocitopenia, maior risco cirúrgico (baseado na classificação da Sociedade Americana de Anestesiologistas – ASA), estágio clínico avançado ou envolvimento dos linfonodos. Já os extrínsecos incluem uma maior extensão e tempo da cirurgia, realização de transfusão de sangue, reconstrução de retalho cirúrgico, traqueostomia e esvaziamento cervical^{26,32,34,39}.

Um estudo recente²⁶ avaliou fatores preditivos de ISC em pacientes com câncer de orofaringe e boca. Através da análise multifatorial foi observado que homens apresentaram 3 vezes mais chance de ter ISC; tumores localizados na língua apresentam um menor risco de ISC do que os localizados em outras regiões, e pacientes com

reconstrução apresentaram 12 vezes mais de chance (IC 95%: 4,96-29,01) de desenvolver ISC do que os com sutura primária. Outro estudo³⁴ mostrou que pacientes com CB submetidos a reconstrução apresentam um maior risco de ISC particularmente quando apresentam um escore de ASA alto e maior tempo de cirurgia. Segundo uma revisão realizada por Cannon et al.⁴⁵, os fatores de risco para ISC diferem bastante entre os estudos. Isto provavelmente ocorre porque entre os estudos são usados diferentes critérios para caracterizar ISC estabelecida, além de variar os tipos de cirurgias, localização do tumor e classificação das feridas cirúrgicas, fazendo com que a interpretação dos resultados seja difícil.

Além dos fatores já mencionados, Heinzelmann et al.⁴⁶ discute que os mecanismos de defesa do hospedeiro também possuem um papel importante no desenvolvimento de ISC. Por exemplo, se o hospedeiro não consegue identificar a atividade patogênica contra o tecido, a invasão bacteriana não será interrompida, e a bacteremia persistirá, podendo levar a sepse e óbito. Na proteção do hospedeiro atuam essencialmente: defesas mecânicas - barreira física ou físico-química (secreções); imunidade humoral - IgG, IgM e IgA; imunidade celular - ativação de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, células *natural killers* e linfócitos T; e citocinas – interleucinas e fatores de crescimento. Estas diferentes linhas de defesa não são independentes e interagem de modo a otimizar a defesa e evitar o estabelecimento de uma infecção. Neste cenário os mesmos autores também destacam o papel das bactérias na ISC – foco deste estudo que será discutido mais extensamente na próxima secção desta Introdução.

A ISC em geral é detectável ao redor de 8 dias após a cirurgia e seu tratamento pode incluir desde cuidados locais e uso de antibióticos, além de intervenções mais agressivas incluindo cirurgia^{25,47}. A morbidade da ISC é menor quando seu diagnóstico ocorre mais cedo; todavia, sinais clássicos de inflamação como eritema, edema e endurecimento são comuns no pós-operatório da cirurgia de cabeça e pescoço o que faz com que o diagnóstico de ISC nem sempre seja simples, sendo muitas vezes considerado apenas quando há uma progressão para drenagem de material purulento. Manejos clínicos podem incluir desde drenagem de material purulento e desbridamento no caso da presença de tecido desvitalizado a fim de limpar e estimular a cicatrização da ferida cirúrgica⁴⁸.

1.3 MUCOSITE ORAL

A mucosite oral (MO) é caracterizada como lesões eritematosas e ulcerativas na mucosa oral que podem causar uma dor leve ou intensa. Ela é uma complicação decorrente de tratamentos oncológicos, incluindo a radioterapia e a quimioterapia. Na quimioterapia os casos mais severos ocorrem principalmente devido ao tratamento mieloablativo, indicado em regimes de condicionamento para o transplante de células-tronco hematopoiéticas, embora também seja comum em pacientes com tumores sólidos que fazem quimioterapia. Na radioterapia de cabeça e pescoço ela ocorre, em algum grau, em praticamente todos os pacientes^{49,50}.

A MO, desde seus graus mais leves, já diminui a qualidade de vida dos pacientes por causar dor e disfagia (dificuldade de deglutir) sendo eventualmente necessário nutrição por via parenteral nos casos mais avançados. Além disso, pode ocorrer disartria (pobre coordenação dos músculos da fala) e odinofagia (dor ou sensação de queimação). A MO facilita a instalação de infecções oportunistas e devido à dificuldade de higienização associada à disfagia e consequente perda de peso. Tudo isso, consequentemente, pode requerer a interrupção parcial ou total da radioterapia e/ou quimioterapia antes da finalização do plano terapêutico, piorando o prognóstico do paciente. Aproximadamente 11% dos casos de interrupção e modificação do regime de radioterapia ocorrem por causa da MO, com a necessidade de hospitalização entre 16-32% dos casos^{49,51}.

Em protocolos usuais de 6 a 7 semanas de radioterapia de cabeça e pescoço (1 dose/dia, 5 dias/semana), a MO tende a aparecer entre a segunda e terceira semana, tendo o seu pico próximo do final do tratamento e remissão em 2 a 4 semanas pós-radioterapia. No tratamento do CB o maior pico de MO geralmente ocorre na quinta semana após o início da radioterapia. Pacientes que fazem quimioterapia concomitante podem ter uma MO mais severa e mais longa, com início já no início do tratamento. Em relação à localização, a MO induzida pela quimioterapia em geral é limitada a áreas de mucosa não-queratinizada (mucosa jugal e labial, lateral de língua, assoalho oral e palato mole) enquanto que na radioterapia ela ocorre nas regiões irradiadas sendo as não-queratinizadas mais susceptíveis^{50,52-54}.

Para melhor caracterizar a severidade da MO, algumas classificações foram estabelecidas incluindo as elaboradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e

National Cancer Institute (NCI). A primeira gradua a mucosite em 5 subtipos: 0 – ausente; I – eritema e queixa de ardência; II – presença de eritema e úlceras, mas o paciente ainda é capaz de se alimentar por via oral; III – presença de úlceras e o paciente faz apenas uso de dieta líquida; IV – presença de úlceras e alimentação via oral não é possível⁵⁵. De modo similar, o NCI também dividiu a MO de 5 graus: 0 – ausente; I – eritema; II – reação pseudomembranosa focal (geralmente menores do que 1,5 cm de diâmetro e não contíguas); III – reação pseudomembranosa confluyente (áreas contíguas, geralmente maiores do que 1,5 cm de diâmetro); IV – Necrose ou ulceração profunda, pode incluir sangramento não induzido por trauma menor ou abrasão⁵⁶. A escala da OMS é mais utilizada na prática clínica e na pesquisa relacionando a MO com medidas objetivas e subjetivas enquanto a NCI é mais objetiva sendo focada na extensão das lesões.

Fatores de riscos para MO já descritos incluem: consumo de bebida alcóolica, uso de tabaco, pobre higienização oral e doença periodontal, hipossalivação, baixo IMC, diabetes *mellitus*, insuficiência renal crônica, linfonodos comprometidos e localização do tumor primário (tumores em boca e orofaringe têm maior risco do que os de laringe e hipofaringe). Ainda, pacientes submetidos ao tratamento radioterápico com dose total acima de 50 Gy, quimioterapia concomitante, dose de radiação diária alta, e amplo volume de tecido irradiado tendem a desenvolver MO mais severa. Do mesmo modo que uso de abridores de boca e técnicas de radioterapia mais avançadas, como a radioterapia com intensidade modulada do feixe (IMRT), reduzem a dose de radiação em tecidos não-alvos reduzindo assim a severidade ou extensão da MO^{54,57-61}.

O atual tratamento da MO ajuda essencialmente a aliviar sintomas evitando outras complicações, como desidratação e caquexia. Para aliviar a dor pode ser indicado o uso de anestésicos locais contendo lidocaína e lavagens da cavidade oral com solução salina. Os pacientes são orientados a evitarem dietas irritativas como alimentos ácidos e apimentados e a manterem boa higienização oral. As terapias já estudadas para prevenir, tratar ou reduzir a severidade da MO incluem a crioterapia, fatores de crescimento, anti-inflamatórios, fotobioestimulação e agentes naturais como vitamina E, glutamina, camomila, zinco, mel e própolis. Na radioterapia de cabeça e pescoço o *laser* de baixa potência é frequentemente indicado na prevenção da MO⁶²⁻⁶⁵.

1.4 MICROBIOTA ORAL

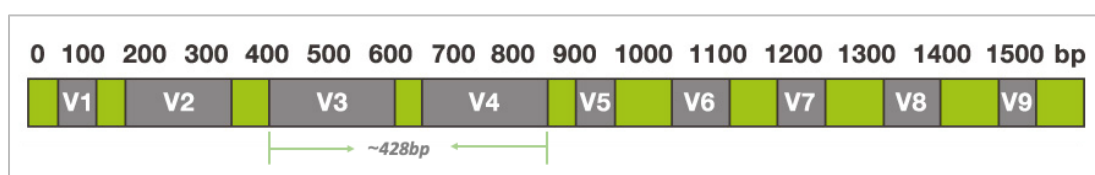
1.4.1 Características Gerais e Abordagens de Estudo

A microbiota oral consiste em uma ampla variedade de microrganismos incluindo bactérias, fungos, vírus, arquea e protozoários que habitam na boca. A cavidade oral tem a segunda maior comunidade microbiana no corpo humano ficando apenas atrás do intestino. Há cerca de 770 espécies de bactérias que a compõem, sendo algumas destas benéficas à saúde do hospedeiro e outras potencialmente patogênicas. Assim, para que elas vivam harmonicamente (eubiose) é necessário que haja um equilíbrio resultando em microambiente simbiótico no indivíduo. Se este equilíbrio é desregulado surge um quadro de disbiose - alteração importante na composição e/ou quantidade de bactérias que facilita o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos que podem desencadear várias doenças, como a periodontite e síndrome do intestino irritável⁶⁶⁻⁶⁸.

A técnica mais usada para identificar as bactérias é o cultivo, porém apenas ~50% das espécies bacterianas da cavidade oral, identificadas em testes baseados em DNA, podem ser isoladas com esta técnica. Isto porque as condições para o crescimento de muitas bactérias não são reproduzíveis por necessitarem de nutrientes específicos, temperatura e pH precisos e interação com outros microrganismos da sua comunidade. Além do mais, não é possível analisar a frequência das diferentes bactérias de uma amostra, visto que a cultura só confirma a presença de um microrganismo específico e não analisa todo o grupo bacteriano. Do mesmo modo, ela não é eficaz para identificar novos microrganismos ou aqueles tidos como incultiváveis^{69,70}.

Devido a estas limitações o sequenciamento direto, sem crescimento prévio, é uma opção mais adequada para avaliar a real dinâmica de populações bacterianas. A metagenômica pode ser aplicada pelo sequenciamento de uma região específica do DNA bacteriano, que contém região hipervariável entre grupos bacterianos distintos, ou pelo sequenciamento abrangente da amostra, sem amplificação prévia (*shotgun*). A primeira consiste no sequenciamento de um gene bacteriano específico que tem regiões conservadas que permitem capturar e amplificar o DNA de interesse e são intercaladas por regiões variáveis através das quais é possível identificar os diferentes grupos bacterianos. Esta abordagem normalmente tem como alvo o gene 16S-rDNA, presente em todas as bactérias. Este gene é suficientemente grande (~1.500 pb), permitindo a exploração de

regiões distintas, incluindo 10 regiões conservadas (C1-C10) e outras 9 regiões variáveis (V1-V9) (**Figura 1**). Desvantagens no seu sequenciamento incluem, em alguns casos, uma baixa profundidade taxonômica – que não permite definir o organismo a nível de espécie; além de um viés determinado pelos iniciadores que não conseguem cobrir toda a diversidade bacteriana^{69,71,72}. Por outro lado, esta abordagem permite estudar a microbiota em situações onde há uma predominância de DNA do hospedeiro, pois os iniciadores capturam e amplificam o DNA bacteriano, permitindo sua análise detalhada. Já o sequenciamento *shotgun*, por sequenciar todo DNA presente no meio, consegue identificar em vários casos, chegar a uma detalhada análise dos microrganismos (não limitados a bactérias – pois inclui vírus, fungos, protozoários e outros), permitindo identificação até nível de cepa. Suas maiores limitações incluem o alto custo, a complexidade e demora na análise dos dados, e ruído por contaminação do DNA humano que pode sobrepor o dos patógenos⁶⁹.



Fonte: Adaptado de Renvoisé et al.⁷³.

Figura 1 – Representação das regiões do gene bacteriano 16S-rDNA. Áreas verdes indicam as regiões conservadas (C1-C10) e as cinzas as variáveis (V1-V9). Regiões que são amplificadas neste trabalho para o sequenciamento incluem a V3 e V4 (~428bp) que estão destacadas pelas setas verdes.

A taxonomia bacteriana agrupa as bactérias que possuem características semelhantes sob vários aspectos, incluindo características fenotípicas e genotípicas, permitindo compreender aspectos fisiológicos e relacionados a doenças ou condições clínicas. A avaliação das bactérias nos 6 níveis taxonômicos (filó, classe, ordem, família, gênero e espécie) é interessante para observar como bactérias agrupadas em um nível mais abrangente (por exemplo, filó), vão se difundindo à medida que atingem um táxon mais específico (nível de espécie). Na metagenômica, as bactérias ainda são agrupadas de uma sétima forma, através de *Operational Taxonomic Units* (OTUs). Este tipo de classificação é feito no processamento das amostras sequenciadas onde sequências com uma identidade de pelo menos 97% são consideradas uma única OTU. De acordo com os autores, este nível de identidade permite em alguns casos agrupar bactérias da mesma espécie. Após

estabelecidas as OTUs, por agrupamento de sequências por nível de identidade, as bactérias são identificadas de acordo com a taxonomia⁷⁴.

Parâmetros comumente utilizados para analisar dados metagenômicos incluem a avaliação da diversidade alfa e beta. A primeira consiste em identificar quão diversa é uma dada amostra. Isto pode ser feito avaliando a riqueza (número de bactérias presentes) e abundância (distribuição/frequência das bactérias). Dentre os índices usualmente computados para esta avaliação há o *Observed* que avalia restritamente a riqueza/número de bactérias nas amostras, e o Shannon e Simpson que avaliam as duas medidas: riqueza e abundância/frequência das bactérias. Quanto maior for o valor gerado por estes índices maior é a diversidade alfa considerada para as amostras⁷⁵.

Já a diversidade beta avalia diferenças qualitativas e quantitativas entre diferentes amostras. Através do índice de Bray-Curtis, por exemplo, é avaliado quão similar é a composição bacteriana entre as amostras baseado na sua abundância ou contagem de *reads*. Um outro índice usado para esta avaliação são as distâncias UniFrac do tipo *unweighted* e *weighted*. Ambas são calculadas com base na distância entre as bactérias na árvore filogenética no qual o quanto mais próximas elas forem umas das outras mais similar são entre si. Para calcular o *unweighted* é apenas considerado a distância filogenética entre as diferentes sequências/bactérias (avaliação qualitativa), e para o *weighted* leva-se em conta as abundâncias relativas entre os microrganismos na árvore filogenética (avaliação quantitativa)^{76,77}.

De modo geral, a microbiota humana consiste em bactérias que são comuns em todos indivíduos e uma outra que é variável, esta vai depender dos hábitos de vida e diferenças fisiológicas de cada pessoa⁷⁸. Em pesquisas relacionadas ao câncer, o estudo das bactérias através da metagenômica já produziu diversas descobertas em relação à presença de bactérias que estão mais predominantes na doença. No carcinoma colorretal, por exemplo, foi observado que este tumor apresenta uma maior frequência de *Fusobacterium nucleatum* em relação ao controle. Esta mesma bactéria também já foi associada a doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn e colite ulcerativa, sugerindo uma relação entre essas doenças e o câncer⁷⁹⁻⁸¹. Ainda, no câncer cervical embora já seja bem estabelecida a sua relação com o HPV, foi observado através do sequenciamento que mulheres HPV-positivas apresentaram uma maior diversidade bacteriana além de apresentarem uma maior quantidade de *Gardnerella vaginalis* e

Lactobacillus gasseri quando comparadas a mulheres HPV-negativas. Com isso, os autores sugeriram que a presença de uma microbiota mais complexa pode agir como um co-fator para a aquisição do HPV⁸².

Na cavidade oral, especificamente é descrito que as bactérias mais comuns em indivíduos saudáveis incluem, dentre outras, a *Lactobacillus*, *Rothia*, *Streptococcus*, *Neisseria* e *Veillonella*⁸³. No CB, através da metagenômica, já foi observado uma maior abundância dos gêneros *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga* e *Pseudomonas* quando comparados aos controles, sugerindo que estas bactérias estão associadas a esta neoplasia^{84,85}. Uma revisão realizada recentemente⁸⁶ avaliando a aplicação da metagenômica em trabalhos relacionados ao câncer de cabeça e pescoço ressaltou que este é um campo promissor que deve ser explorado extensamente por pesquisadores. Eles enfatizaram que esta técnica permite melhor compreender a microbiota oral e seu potencial uso como preditor e fator etiológico de doenças de boca.

1.4.2 Microbiota Oral e Infecção do Sítio Cirúrgico

Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à cirurgia, as bactérias já associadas a ISC, estudadas por técnicas de cultivo, incluem principalmente a *Staphylococcus aureus* e os bacilos gram-negativos *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Outras bactérias também já encontradas no momento da infecção são a *Acinetobacter*, *Difteroides* e *Staphylococcus epidermidis*^{32,34,38,87}. A maioria dessas bactérias são do tipo gram-negativas que são caracterizadas por apresentarem uma face externa envolta por lipopolissacarídeos. Esta estrutura é conhecida por desencadear uma resposta imunológica que ativa citocinas e acaba promovendo danos aos tecidos, e por tal motivo são comumente associadas a eventos negativos como a ISC⁸⁸.

Um estudo realizado em 2016⁸⁹ avaliou mudanças no microbioma em pacientes com rinossinusite crônica submetidos à cirurgia endoscópica do seio. Através de *swabs*, foram coletadas amostras do seio etmoidal, nasofaringe e narinas anteriores, em três momentos: antes da cirurgia, duas semanas após a cirurgia e 6 semanas após a cirurgia. Todos os pacientes utilizaram antibióticos até a segunda semana pós-operatória e a análise da microbiota foi feita por sequenciamento em larga escala. Os autores observaram uma maior quantidade de bactérias em duas semanas após a cirurgia do que em 6 semanas, sendo esta última mais semelhante à primeira coleta (antes da cirurgia). Os autores

concluíram que a cirurgia, assim como o uso de antibiótico, altera a composição da microbiota, mas que esta recupera seu estado basal em cerca de 6 semanas.

Na tentativa de prever o risco de ISC em tumores de cabeça e pescoço, Candau-Alvarez et al.⁹⁰ acompanharam pacientes operados e coletaram amostras dos drenos no 1º, 3º, 5º e 7º dia após a cirurgia. Eles observaram que se nenhuma bactéria crescesse na coleta do terceiro dia, o risco do paciente desenvolver ISC seria baixo. Limitações observadas neste estudo incluíram: o baixo número de pacientes (34 sem versus 6 com ISC); somente 13 tipos de bactérias foram cultivadas; e não foi considerado na análise o tipo de bactérias que cresceram em cada coleta. Os resultados foram promissores, mas indicam ser necessário mais estudos. Aparte deste trabalho, os estudos na literatura identificam as bactérias somente no momento da ISC, e através de culturas bacterianas^{32,34,38,87}. A avaliação da microbiota através do sequenciamento vai ajudar a melhor entender como o complexo microbiano atua no desenvolvimento da ISC, potencialmente encontrado indícios que possam ser usados para indicar pacientes com maior risco de ISC.

1.4.3 Microbiota Oral e Mucosite Oral

Estudos anteriores sugeriam que microbiota teria uma participação secundária na MO, causando uma infecção oportunista frente ao surgimento de lesões ulcerativas na cavidade oral, sem nenhum papel importante na iniciação da mucosite⁹¹. Todavia, tem sido sugerido que agentes antineoplásicos danificam a barreira epitelial da mucosa, levam à supressão da vigilância imunológica, e na presença de certos tipos de bactérias estes efeitos são agravados⁹². Ainda, Wang et al.⁹³, por exemplo, levantaram a hipótese de que a quimioterapia inibe as bactérias comensais da boca, induzindo alteração na composição microbiana que facilita o crescimento de bactérias gram-negativas anaeróbicas. Estas por terem um fenótipo agressivo geram um processo inflamatório que levaria ao surgimento da MO.

Avaliando a possível relação entre MO e bactérias, Laheij et al.⁹⁴ observaram por PCR em tempo real que *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Treponema denticola* e *Fusobacterium nucleatum* estão associadas positivamente com a presença de MO em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas. Baseado nesses resultados, os autores concluíram que a microbiota parece ter um papel importante na

ocorrência de MO em pacientes submetidos a este tipo de tratamento. Outro estudo⁹⁵, usando amostras coletadas antes e durante a quimioterapia em pacientes pediátricos observou por pirosequenciamento, que os pacientes que desenvolveram MO apresentavam maior diversidade microbiana antes da primeira quimioterapia que ao decorrer do tratamento foi diminuindo sugerindo que os pacientes que sofreram uma maior mudança na composição microbiana eram mais suscetíveis a desenvolver MO.

Ainda, buscando investigar o papel da microbiota oral na MO, pesquisadores estudaram o papel de agentes antimicrobianos nestas lesões acreditando que a redução da microbiota oral poderia levar a uma redução concomitante da MO. No entanto, estudos realizados com antissépticos bucais antimicrobianos a base de clorexidina ou mesmo antimicrobianos sistêmicos não mostraram resultados favoráveis^{96,97}. Todavia, Laheij e De Soet⁹⁸ destacam que isso não significa que a microbiota não atue na MO, afirmando que talvez bactérias específicas influenciem a mucosite através de determinadas vias. Eles ressaltam que agentes antimicrobianos podem eliminar microrganismos importantes para uma microbiota equilibrada, fazendo com que potenciais patógenos se expandam ainda mais. Por isso, é preciso estudar as alterações específicas da microbiota. Caso a relação entre microbiota oral e MO seja comprovada, o desenvolvimento de agentes antimicrobianos para inibir especificamente patógenos emergentes, ou restaurar a eubiose da cavidade oral poderão ser formulados evitando a ocorrência ou diminuindo a intensidade da MO.

A nível molecular, acredita-se que a microbiota oral pode estar envolvida no processo inflamatório da mucosite através da ativação de receptores como os Toll-like (TLR). Estes ficam localizados na membrana externa do epitélio ou nas vesículas intracelulares e atuam reconhecendo uma ampla quantidade de patógenos microbianos. Os TLRs são ativados por componentes microbianos tais como peptidoglicanos, lipopolissacarídeos e DNA bacteriano, e desencadeiam uma cascata de sinais que resultam na secreção de citocinas próinflamatórias como as interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral-alfa e metaloproteinases da matriz. Acredita-se que em especial a presença de bactérias gram-negativas em pacientes que serão submetidos a um tratamento oncológico poderia induzir este quadro inflamatório por serem mais patogênicas, consequentemente agravando a MO⁹⁹⁻¹⁰¹.

A avaliação da associação entre a microbiota oral e a MO induzida pela radioterapia de cabeça e pescoço através do sequenciamento do gene 16S-rDNA, para o nosso conhecimento, foi avaliada por apenas um estudo¹⁰². Este envolveu 19 pacientes com carcinoma de nasofaringe antes e ao longo do tratamento radioterápico. Em relação ao índice de Shannon (diversidade alfa) nenhuma diferença foi observada antes e durante o tratamento. Todavia, em relação à diversidade beta (*unweighted* Unifrac) foi observado que à medida que a MO foi progredindo a composição bacteriana entre os grupos foi ficando mais distinta, sugerindo que a severidade da mucosite pode estar associada com mudanças na comunidade bacteriana. Quanto às bactérias, foi observado que pacientes que desenvolveram MO severa até o final da radioterapia, apresentaram desde as primeiras lesões de MO uma abundância maior dos gêneros *Actinobacillus*, *Mannheimia* e *Streptobacillus* do que os pacientes que tiveram apenas uma mucosite leve. De modo geral, foi concluído que mudanças na comunidade bacteriana estão correlacionadas com a progressão e o agravamento da mucosite.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição da microbiota oral no tratamento do CB - antes e após a cirurgia, e pré e trans-radioterapia associada ou não à quimioterapia - buscando compreender seu possível papel no desenvolvimento da ISC e MO.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a incidência de ISC em pacientes submetidos à excisão cirúrgica do tumor;
- Determinar se a microbiota pré- e pós-cirúrgica está relacionada com a incidência de ISC antes que a mesma ocorra e quais microrganismos prevalecem na ferida cirúrgica infectada;
- Determinar a incidência de MO em pacientes submetidos à radioterapia associada ou não à quimioterapia;
- Determinar se a composição bacteriana – pré e trans-radio-quimioterapia - é capaz de prever o desenvolvimento da MO e o seu grau de severidade;
- Avaliar através da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real a relação quantitativa entre DNA bacteriano e humano em cada amostra, ao longo do tratamento, de modo a investigar a sua relação com a ISC e MO.
- Estudar as flutuações da microbiota oral ao longo de todo o tratamento oncológico – desde o diagnóstico até o final da radio-quimioterapia.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center sob número 2188/16 (Anexo 1). O estudo foi apresentado a todos os pacientes e os mesmos foram convidados a participar, tendo recebido para leitura o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). A participação voluntária foi documentada pela assinatura do TCLE e apenas após esta assinatura iniciamos a coleta de dados e amostras (Apêndice 1).

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

O presente estudo foi do tipo prospectivo sendo incluídos pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide oral (CEO) que seriam tratados no A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo-SP no período entre os anos de 2016 e 2019.

3.3 AMOSTRA

O projeto foi dividido em dois módulos: I) ISC (estudo realizado no tratamento cirúrgico) e II) MO (estudo realizado no tratamento da radioterapia associada ou não à quimioterapia). A amostra foi por conveniência visto o caráter inovador do estudo que avaliou um universo bacteriano ainda desconhecido em termos de composição e frequência. Assim, por não haver embasamento na literatura que permitisse calcular um tamanho amostral ideal, foi considerado um N respaldado pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do hospital, que fosse factível diante da casuística de pacientes com CEO na instituição por ano, correspondendo a cerca de 80 casos. Considerando os critérios de inclusão e exclusão foi estipulado em torno de 40 casos para cada parte do projeto.

A amostra final do estudo incluiu um total de 68 pacientes, somando ambas as partes do estudo. Destes, 45 participaram do módulo I (ISC) e 44 do módulo II (MO). Vinte e um pacientes (31%) participaram de ambos os módulos. Ressalta-se que para todos os pacientes incluídos neste projeto a cirurgia sempre foi o primeiro tratamento, seguido ou não da radioterapia. Os pacientes que só participaram do módulo II do projeto também já haviam sido operados antes, porém nestes casos a cirurgia foi realizada em um outro hospital ou não foi possível o contato antes da cirurgia. Além disso, nem todos os pacientes do módulo I necessitaram fazer radioterapia adjuvante após a cirurgia e por isso não participaram do módulo II do estudo (**Figura 2**).

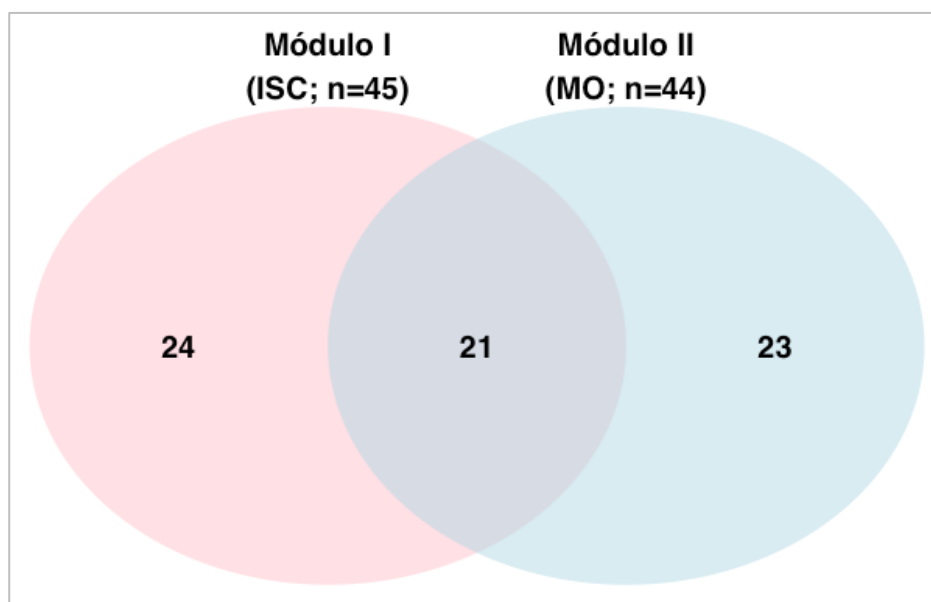


Figura 2 - Número de pacientes de acordo com o módulo do estudo (ISC: infecção do sítio cirúrgico; MO: mucosite oral).

A **Figura 3** descreve como foi feita a divisão dos pacientes de acordo com sua participação no estudo. Para a radioterapia, os pacientes foram estratificados em dois braços (A e B) de acordo com o uso ou não de quimioterapia concomitante à radioterapia. Para os pacientes submetidos à quimioterapia consideramos os dois tipos de regimes mais usuais: 1) Cisplatina 100mg/m², 21 em 21 dias, 3 ciclos ou 2) Cisplatina até 50mg (dose cheia) semanal, sendo 5 ou 6 ciclos - resultando desta forma em três grupos: Grupo A (Radioterapia exclusiva); Grupo B (Radioterapia + Regime 1 da quimioterapia) e Grupo C (Radioterapia + Regime 2 da quimioterapia).

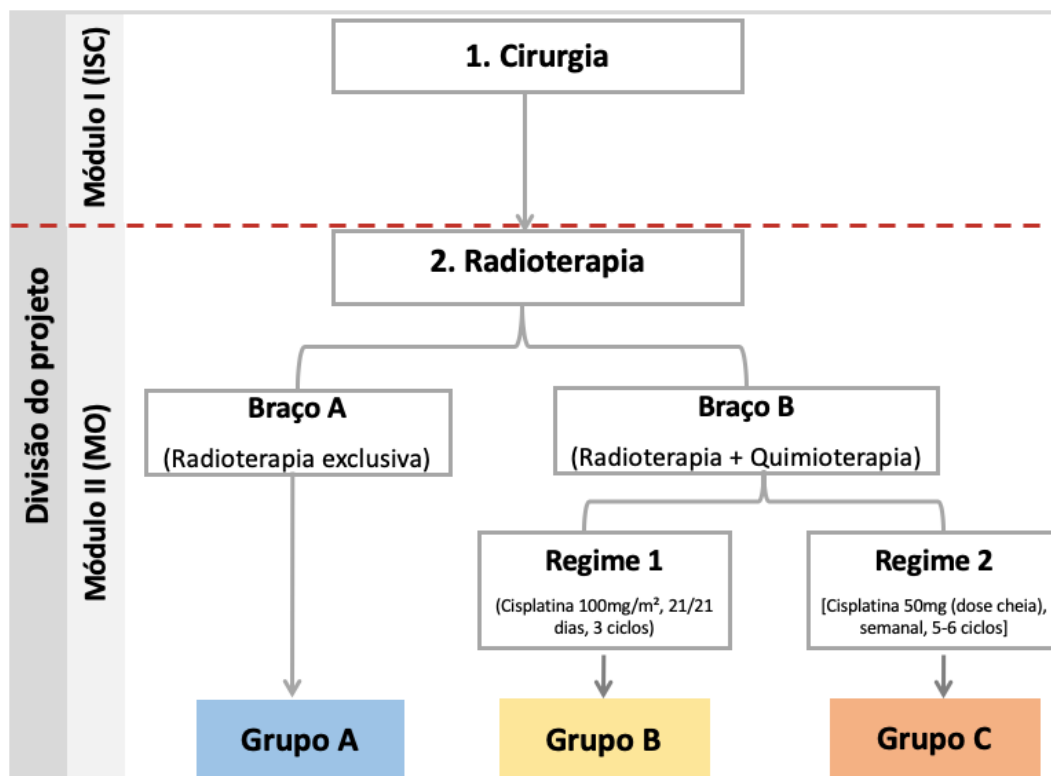


Figura 3 - Divisão do projeto de acordo com o tipo de tratamento do paciente (ISC: infecção do sítio cirúrgico; MO: mucosite oral).

3.3.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com CEO primários que seriam submetidos à cirurgia, sendo seguido ou não da radioterapia. A radioterapia poderia ser de caráter exclusivo, ou associada à quimioterapia;
- A radioterapia realizada 3-5 vezes por semana e, os pacientes receberiam ao final do tratamento uma dose em campos faciais iguais ou superiores a 36Gy.
- Pacientes submetidos à radioterapia + quimioterapia com cisplatina 100mg/m² de 21 em 21 dias, totalizando 3 ciclos;
- Pacientes submetidos à radioterapia + cisplatina até 50mg (dose cheia) semanal, totalizando 5 ou 6 ciclos.

3.3.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes incapazes de compreender o estudo;
- Pacientes que se recusaram a participar do estudo e não assinaram o TCLE;

- Pacientes submetidos previamente à radioterapia de cabeça e pescoço ou quimioterapia.

3.4 PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE DADOS

3.4.1 Coleta de Dados Clínicos

Inicialmente, coletamos informações gerais, tais como: sexo, idade, grau de ensino, presença de comorbidades de acordo com o NCI¹⁰³ (**Quadro 1**), localização do tumor e estadiamento clínico baseado na sétima edição da classificação TNM dos tumores malignos¹⁰⁴ (**Quadro 2**). Para avaliar o uso de tabaco e álcool os pacientes foram categorizados segundo os critérios estabelecidos pelo CDC. Para o fumo os pacientes foram divididos em 3 grupos: não-fumantes (não fumaram mais de 100 cigarros na vida); fumantes (fumaram mais de 100 cigarros na vida, e ainda fumava no momento da entrevista) e ex-fumantes (fumaram mais de 100 cigarros na vida, mas não fumavam mais na época da entrevista)¹⁰⁵. Quanto ao consumo de álcool eles foram divididos em: não-etilistas (beberam menos de 12 bebidas na vida); etilistas (beberam pelo menos 1 vez no último ano) e ex-etilistas (beberam mais de 12 bebidas na vida mas não bebem nada há pelo menos 1 ano)¹⁰⁶.

No primeiro momento realizamos ainda um exame clínico oral para avaliar a condição dental e periodontal do paciente. A condição dental foi avaliada segundo a soma do número de dentes cariados, perdidos e obturados (restaurados) (CPO-D), originalmente elaborado por Klein e Palmer¹⁰⁷. Já a saúde periodontal foi avaliada com auxílio de uma sonda periodontal milimétrica e baseada nos parâmetros de Lindhe e Nyman¹⁰⁸: profundidade de sondagem (PS) – distância da margem gengival ao fundo da bolsa periodontal; recessão gengival (RG) - distância da margem gengival à junção esmalte-cimento. As maiores medidas por dente foram registradas e a partir delas o nível de inserção clínica (NIC) foi calculado (somatório do PS e RG) para indicar a perda total de inserção do periodonto. Este exame era realizado antes da cirurgia e radioterapia. Destaca-se que todos os pacientes que fariam a radioterapia eram antes avaliados, como de rotina do hospital, pelo Departamento de Estomatologia, para realizar a adequação do meio bucal que incluía realizar a extração, restauração, raspagem periodontal ou outros

procedimentos quando indicados. Assim, o CPO-D e NIC só eram avaliados para o estudo após a liberação do referido serviço.

Quadro 1 – Lista de comorbidades de acordo com o NCI.

Comorbidades	
Anemia	Obesidade
Artrite	Osteoporose
Asma	Parkinsonismo
Doença Pulmonar obstrutiva crônica	Câncer prévio
Trombose venosa profunda	Falência renal
Demência	Acidente vascular cerebral
Depressão	Desordens da tireoide ou glandulares
Diabetes <i>mellitus</i>	Problemas do trato urinário
Problemas oculares ou doenças oftálmicas	Tuberculose
Fratura	Septicemia
Problemas da vesícula biliar	Pneumonia
Problemas de trato gastrointestinal	Fibrose pulmonar pós-inflamatória
Condições relacionadas ao coração	Lúpus eritematoso sistêmico
Hipertensão arterial	Esclerose sistêmica
Problemas relacionados a lipídeos	Polimiosite
Doenças do fígado	Anorexia
Problema de saúde mental	

Fonte: Adaptado de Yancik et al.¹⁰³.

Quadro 2 - Sistema de estadiamento clínico TNM do câncer de boca.

T – TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em seu diâmetro maior
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca ou pele da face (queixo ou nariz)
T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides, base do crânio ou artéria carótida interna
N – ENVOLVIMENTO DE LINFONODOS REGIONAIS	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, ≤3 cm em sua maior dimensão
N2	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral > 3 cm e até 6 cm na maior dimensão
	N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles >6 cm em sua maior dimensão
	N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles >6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo >6 cm em sua maior dimensão
M – METÁSTASE À DISTÂNCIA	
MX	Metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: Edge et al.¹⁰⁴.

Dados específicos em relação ao tratamento oncológico também foram registrados. Na cirurgia, dados pré-operatórios incluíram a avaliação do risco cirúrgico de acordo com a classificação da ASA¹⁰⁹ (**Quadro 3**), enquanto os pós-operatórios foram os tipos de tecidos removidos (mole ou mole e duro), realização de esvaziamento cervical, reconstrução e transfusão sanguínea, e tempo de cirurgia e internação. Registramos ainda o tipo de radioterapia (3D ou IMRT), as doses e campos de radiação, número de sessões, confecção do abridor de boca, assim como os esquemas da quimioterapia.

Quadro 3 - Classificação da Sociedade Americana de Anestesia.

Classe	Descrição
I	Saudável
II	Doença sistêmica branda (<i>i.e.</i> , hipertensão arterial sistêmica controlada, idade > 70 anos, obesidade)
III	Doença sistêmica grave não incapacitante (<i>i.e.</i> , obesidade mórbida, doença respiratória sintomática)
IV	Doença sistêmica grave incapacitante com risco de vida (<i>i.e.</i> , ICC descompensada, falência hepato-renal)
V	Paciente moribundo com expectativa de vida menor do que 24 horas
VI	Paciente com morte cerebral candidato a transplante de órgão

Fonte: Hurwitz et al.¹⁰⁹.

À medida que o paciente era acompanhado outros dados eram registrados como data e local da coleta, tipo de alimentação (sólido/líquido/pastoso), uso de antibiótico e anti-inflamatório e realização da higienização oral. Para a radioterapia anotamos ainda outras informações tais como uso de bochechos orais (água bicarbonatada e maalox) que são prescritos pelo Departamento de Estomatologia para uso durante a radioterapia, e aplicação do laser para prevenir e/ou tratar a MO.

- Avaliação de infecção do sítio cirúrgico

A ISC foi avaliada tendo como base uma adaptação dos critérios descritos pelo CDC⁴³ onde consideramos presença de ISC como a ocorrência de algum dos seguintes eventos: presença de material purulento na incisão ou dreno do paciente, ou diagnóstico de ISC pelo médico (cirurgião ou infectologista) que geralmente foi baseado na presença de deiscência espontânea da ferida cirúrgica com sinais ou sintomas de ISC (dor, eritema, vermelhidão e/ou edema na região operada, febre, ou elevação na contagem de leucócitos). Infecção acompanhada pelo desenvolvimento de fístula orocutânea também foi considerada ISC. A presença de ISC foi considerada em até 30 dias após a cirurgia.

- Avaliação de mucosite oral

Os pacientes foram acompanhados durante a radioterapia para verificar o possível desenvolvimento e/ou progressão de MO de acordo com o Sistema de Gradação de Mucosite proposto pela OMS⁵⁵ (**Quadro 4**) e NCI⁵⁶ (**Quadro 5**).

Quadro 4 - Sistema de gradação de mucosite proposto pela OMS.

Classe	Descrição
0	Ausente
I	Eritema e queixa de ardência
II	Eritema e úlceras, mas o paciente ainda é capaz de se alimentar por via oral
III	Úlceras e o paciente faz apenas uso de dieta líquida
IV	Úlceras e alimentação via oral não é possível

Fonte: Organização Mundial de Saúde (OMS)⁵⁵.

Quadro 5- Sistema de gradação de mucosite proposto pelo NCI.

Classe	Descrição
0	Ausente
I	Eritema e queixa de ardência
II	Reação pseudomembranosa focal (geralmente menores do que 1,5 cm de diâmetro e não contíguas)
III	Reação pseudomembranosa confluyente (áreas contíguas, geralmente maiores do que 1,5 cm de diâmetro)
IV	Necrose ou ulceração profunda, pode incluir sangramento não induzido por trauma menor ou abrasão

Fonte: National Cancer Institute (NCI)⁵⁶.

3.4.2 Coleta de Amostras para Estudo da Microbiota

Para as coletas do estudo usamos *swabs* de nylon (FLOQSwab 519C, COPAN Diagnostics, EUA), embalados em tubos estéreis sem meio de cultura. O *swab* foi passado em diferentes regiões da boca dependendo da parte do estudo (módulo 1 ou 2). Para avaliar o estudo de ISC, o *swab* foi passado na região adjacente às bordas do tumor e, após a excisão cirúrgica foi coletado de região próxima às feridas cirúrgicas. Para analisar a MO, a amostra foi coletada da mucosa jugal (direita e esquerda), borda de língua (direita e esquerda) e mucosa labial (superior e inferior), regiões comumente acometidas pela MO. Um único *swab* foi passado em todas essas regiões no momento pré- e trans-radioterapia (neste último caso se o paciente não tiver MO no momento da coleta). Quando um paciente apresentava MO em algum local, um outro *swab* era coletado passando o mesmo em regiões próximas às lesões (nunca sobre elas para evitar desconforto ao paciente). Quando os pacientes apresentavam MO, dois *swabs* eram coletados, um ao redor da MO e outro nas regiões sem MO (para controle). A finalidade dessas duas coletas foi observar

se há diferenças entre a microbiota de áreas sem e com MO, e se isto pode influenciar o surgimento da mesma.

Realizamos as coletas em 7 momentos distintos (**Quadro 6**). Para avaliar a primeira parte do projeto coletamos amostras nos momentos de I a IV. Enquanto para avaliar o módulo II consideramos os momentos V a VII. O objetivo da coleta I foi servir de *baseline* antes de qualquer tratamento oncológico, e a coleta II foi avaliar a microbiota logo antes da cirurgia e observar se houve alguma mudança em relação a coleta I (a média de tempo entre essas duas coletas é quase 1 mês e neste período o paciente pode alterar hábitos como alimentação e higienização oral). As coletas III e VI tiveram intuitos semelhantes: observar se a microbiota oral pós-operatória ou no início da radioterapia, respectivamente, já apresenta alterações e se estas podem ser usadas para prever pacientes que vão desenvolver ISC ou um pior grau de MO. E as coletas IV e VII são as coletas referentes aos desfechos específicos: momentos onde respectivamente pode ocorrer a ISC e a MO.

Quadro 6 - Descrição dos momentos de coletas.

Momento	Tempo da coleta
I	<i>Baseline</i> (ambulatorial)
II	Pré-operatório (internação)
III	Até 5 dias após a cirurgia
IV	Entre o 6-15º dia após a cirurgia (em geral)
V	Antes do início da radioterapia
VI	1 semana após o início da radioterapia
VII	Antes do fim da radioterapia

Ressaltamos que nos grupos submetidos à radioterapia e quimioterapia (Grupos B e C) os tratamentos foram concomitantes, sendo iniciados e finalizados aproximadamente no mesmo período. Nestes casos, as amostras sempre foram coletadas tendo como base o tratamento radioterápico. Em relação ao momento I coletamos dois *swabs*: um para servir de *baseline* para a cirurgia (ao redor do tumor) e outro para a radioterapia (as regiões pré-determinadas descritas acima). Isto porque caso esse paciente fosse encaminhado para a radioterapia após a cirurgia haveria uma amostra prévia a qualquer tratamento oncológico para poder ser comparada às coletas V-VII. Todavia, para os pacientes que só participaram do módulo II do estudo a primeira coleta correspondeu ao momento V.

Após as coletas, os *swabs* eram reinseridos em seus respectivos tubos e 2ml de uma solução estabilizadora era adicionada em cada tubo para cobrir a ponta dos *swabs* contendo o material coletado. Esta solução é composta de NaCl (0,1M), TrisHCl (0,01M; pH 7,5), EDTA (0,01M), SDS 0,5% e proteinase K (0.1mg/ml)¹¹⁰. Todos os tubos foram agitados em vórtex por 10s e armazenados na geladeira até a extração (em geral uma a duas semanas). Para extração de DNA usamos o kit *DNeasy PowerSoil Kit 12888* (MoBio, Qiagen, EUA) e em seguida todas as amostras foram quantificadas no *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

3.5 PCR EM TEMPO REAL: ANÁLISE QUANTITATIVA DO DNA BACTERIANO E HUMANO

Além da avaliação da microbiota oral pelo sequenciamento, também analisamos quantitativamente o DNA bacteriano, assim como o DNA humano e a relação entre ambos, usando PCR em tempo real, usando protocolo desenvolvido por nosso grupo, e ainda não publicado. Para isto usamos dois pares de iniciadores: um voltado para uma pequena região interna do gene V1 16S-rDNA (F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' e R: 5'-TTACTCACCCGTICGCCRCT-3') e outro par visando detectar um fragmento do gene da beta-actina humana (F: 5'-CCATCTACGAGGGGTATGC-3' e R: 5'-GGTGAGGATCTTCATGAGGTA-3'). Cada par permite gerar fragmentos ao redor de 113bp (16S-V1) ou 90bp (beta-actina). Nesta avaliação, para cada reação usamos 5ng de DNA e a enzima *Fast SYBR™ Green Master Mix* (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) (**Quadro 7**). O protocolo de amplificação foi realizado na plataforma *7500 Fast* e iniciou-se com uma desnaturação a 95°C por 20s, seguido de 95°C por 3s e 60°C por 30s (40 ciclos).

Quadro 7 - Amplificação do gene bacteriano 16S-rDNA e humano beta-actina.

Reação	Volume (µl)
16S-rDNA (V1)	
Iniciador V1F (2uM)	1,0
Iniciador V1R (2uM)	1,0
<i>Fast SYBR Green 2x</i>	5,0
Amostra (5ng) + H ₂ O	3,0
Beta-actina	
Iniciador beta-actina F (5uM)	0,4
Iniciador beta-actina R (5uM)	0,4
<i>SYBR Green</i>	5,0
H ₂ O	1,2
Amostra (5ng) + H ₂ O	3,0
Volume final	10,0

3.6 SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S-rDNA BACTERIANO

3.6.1 Amplificação do Gene Alvo (16S-rDNA) e Sequenciamento

Para avaliar o conteúdo bacteriano amplificamos e sequenciamos as regiões V3-V4 do gene 16S DNA ribossomal (rDNA). Os iniciadores usados possuem adaptadores adequados para sequenciamento na plataforma *Illumina*, e geram *amplicons* com um tamanho médio de 510 pares de bases. Suas respectivas sequências (iniciadores sublinhados e sequências complementares ao gene bacteriano em negrito), são: U341F: 5'-CACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT**CCTACGGG**RS**GCAGCAG**-3' e 806R: 5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT**GGACTACHVGGGTWTCTAAT** 3'). A enzima *KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2X)* (Kapa Biosystems, Sigma Aldrich, EUA) foi utilizada para amplificação. A reação final e condições estabelecidas estão nos **Quadros 8 e 9**. Como controle positivo sempre usamos DNA de *Escherichia coli* e para o negativo é usado apenas H₂O (*Sigma*).

Quadro 8 - Amplificação do gene bacteriano 16S-rDNA.

Reação	Volume (µl)
Iniciador U341F (2,5uM)	1,5
Iniciador 806R (2,5uM)	1,5
KAPA HotStart ReadyMix (2X)	7,5
Amostra (16ng) + H ₂ O	4,5
Volume final	15ul

Quadro 9 - Termociclagem para a amplificação do gene 16S-rDNA.

Termociclador	Tempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturação inicial	2 min	95°C	1x
Desnaturação	20s	95°C	28x
Anelamento	15s	54°C	
Extensão final	5 min	72°C	1x

Posteriormente, os *amplicons* foram purificados com o *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter, Indianapolis, EUA) e quantificados no *Qubit dsDNA High Sensitivity* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). As amostras foram enviadas para a empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil) que foi responsável pela construção das bibliotecas e sequenciamento. Segundo o protocolo da empresa¹¹¹, para a construção de cada biblioteca uma nova amplificação foi realizada em triplicata usando 5ng de *amplicon* purificado por reação, a enzima *Taq Platinum* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) sendo adicionados *barcodes* específicos para cada amostra (condição de amplificação: 95°C por 5 min, seguindo de 10 ciclos de 95°C por 46s, 66°C por 30s e 72°C por 45s, e uma extensão final de 72°C por 2min). As triplicatas foram unidas e purificadas com o *Ampure XP Beads* (Beckman Coulter, Indianapolis, EUA), e em seguida foi feito o *pool* das bibliotecas usando volume iguais de cada amostra. A quantificação do *pool* foi feita por PCR quantitativo em tempo real com o *KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms* (KAPA Biosystems, Wilmington, EUA). Para o sequenciamento foi usado o kit *MiSeq Reagent v2 (500-cycles)* da Illumina, *paired-end* (300nt *read* 1 e 210nt *read* 2) na plataforma *MiSeq* (Illumina, San Diego, EUA), visando gerar $\geq 50,000$ *reads* por amostra.

3.6.2 Processamento e Filtragem das Amostras Sequenciadas

O processamento das sequencias foi feita pelo Núcleo de Biologia Computacional do A.C.Camargo Cancer Center, após estruturação do *pipeline* em conjunto com o Laboratório de Genômica Médica da mesma instituição. O processamento seguiu os seguintes passos: 1-remoção de adaptadores e *iniciadores*; 2-remoção de *reads* que mapearam com o genoma humano; 3-importação dos *reads* para o programa *Quantitative insights into microbial ecology 2 (Qiime2)*; 4-realização da junção dos *reads* pareados e filtro de qualidade (*phred score* ≥ 10); 5- remoção de ruídos das *reads* através do *deblur* (controle de qualidade usando a referência do 16S como filtro positivo). As sequências foram então clusterizadas como *Operational Taxonomic Units* (OTUs) quando apresentavam 97% de similaridade entre elas, seguida de busca de similaridade contra sequencias presentes no banco de dados SILVA¹¹² visando a classificação taxonômica das OTUs. Após a aplicação dos filtros, foram feitas as curvas de saturação para observar se todas as amostras saturaram e poderiam seguir para análise. Antes de serem analisadas propriamente, descartamos os OTUs que tiveram menos de 3 *reads* com intuito de remover possíveis erros remanescentes do sequenciamento.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para registrar todas as informações coletadas neste projeto criamos um banco de dados usando o sistema *Research Electronic Data Capture* (REDCap), onde inserimos campos com todas as informações pertinentes do projeto, tanto para dados clínicos como laboratoriais. A partir dele exportamos os dados para o programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) para análise das variáveis clínicas e resultados da PCR em tempo real. O teste de kappa foi usado para definir a concordância entre as gradações de MO da OMS e NCI. Para análise de associação entre as variáveis clínicas e ISC e MO utilizamos os testes de Fisher e Qui-quadrado para dados categóricos e o U de Mann-Whitney para os contínuos. Assumindo a não-normalidade da amostra, o teste de Friedman foi usado para avaliar a relação do *cycle threshold* (CT) médio do PCR em tempo real com o momento da coleta em relação à ISC, MO e tratamento oncológico. Para avaliar a relação da ISC e MO com o CT e o momento de coleta utilizamos o teste U de Mann-Whitney. Para análise dos dados metagenômicos utilizamos o pacote

phyloseq no programa *RStudio* (versão 3.5.1; *RStudio: Integrated Development for R*. *RStudio*, Inc., Boston, MA, EUA). Assumindo a não-normalidade da amostra foi utilizado o teste U de Mann-Whitney para avaliar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre ISC e MO, e a alfa-diversidade (*Observed*, Shannon e Simpson). E em relação à diversidade beta (índice de Bray-Curtis e distâncias *unweighted* e *weighted* Unifrac), foi usado o teste multivariado *Analysis of Similarities* (ANOSIM). O software *Linear discriminant analysis Effect Size* (LEfSe)¹¹³ foi usado para avaliar diferenças na composição microbiana entre os grupos em cada coleta tendo como base a frequência das bactérias e o escore LDA gerado pelo programa. Para avaliar se há diferenças entre coletas realizadas no mesmo momento, mas em regiões diferentes (controle versus mucosite; e *baseline* da cirurgia e radioterapia) foi usado o teste de Wilcoxon. Modelo de regressão logística simples foi usado para avaliar a chance de desenvolver ISC ou MO com bases nos dados clínicos, quantitativos (PCR em tempo real) e resultados do sequenciamento (diversidade e frequência bacteriana). Para agrupar variáveis contínuas (tempo de cirurgia, frequência da *Aggregatibacter*, *Actinomyces* e *Granulicatella*) foi estabelecido pontos de corte com base na curva ROC. Para todos os testes estatísticos, foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MÓDULO I: INFECÇÃO DO SÍTIO CIRÚRGICO

4.1.1 Dados Clínicos

4.1.1.1 Caracterização dos dados clínicos

Cinquenta e um pacientes foram inicialmente incluídos neste estudo. Destes, seis foram excluídos por terem suas cirurgias canceladas devido a: i) detecção de doença metastática no pulmão (3 casos); ii) desistência voluntária da cirurgia (2 casos) e iii) observação de comprometimento da artéria carótida pelo tumor (1 caso). Exceto para os casos de desistência voluntária, os demais foram encaminhados para a oncologia clínica para serem submetidos à quimioterapia de indução. Assim, ao final, 45 pacientes (88,2%) permaneceram no estudo.

A **Tabela 1** descreve os dados clínicos gerais destes pacientes. A maioria foi do sexo masculino (71,1%) com idade média de 63 anos. A maior parte dos pacientes tinha escolaridade apenas até o ensino fundamental (n=20; 44,4%), seguido do ensino médio (n=17; 37,8%) e superior (n=8; 17,8%). Dos pacientes fumantes/ex-fumantes (60%), houve um consumo médio de 25 cigarros por dia durante 38 anos. Em relação aos etilistas/ex-etilistas (73,4%), o tempo médio de consumo também foi de 38 anos. As comorbidades mais frequentes foram a hipertensão arterial (n=25; 55,6%) e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (n=13; 28,9%). Em relação ao tumor, através da avaliação clínica e de imagem, a língua foi evidenciada como o sítio primário mais comum (44,4%). Para os tumores estadiados (n=38; 84,4%), a maioria foi categorizada como T4 (n=19; 50%), seguido de T2 (n=9; 23,6%), T1 (n=5; 13,2%) e T3 (n=5; 13,2%); e na avaliação dos linfonodos regionais, 21 casos (55,3%) foram classificados com metástase linfonodal versus 17 (44,7%) sem.

Vinte e dois pacientes (48,9%) faziam uso ou já tinham usado algum tipo de prótese oral, contra 23 (51,1%) que nunca tinham usado. O exame clínico oral constatou que 7 pacientes eram edêntulos (15,6%), e para os 38 pacientes restantes (84,4%) a média de dentes foi de 18, sendo 28 dentes o número máximo (não considerados os terceiros

molares). O CPO-D médio foi de 20,5. Em relação a avaliação periodontal não foi possível realizar este exame em dois pacientes (4,4%) e os 7 pacientes edêntulos não participaram desta avaliação. Assim, considerando os 36 pacientes, o NIC médio foi de 2,8mm.

A maioria das cirurgias envolveu mais de um sítio anatômico na boca (n=31; 68,9%), sendo a língua e assoalho os locais mais comumente operados (n=26; 57,8%) e a técnica cirúrgica mais frequente a pelveglossomandibulectomia marginal e pelveglossectomia parcial (ambos com 8 casos cada). A maior parte dos pacientes foi submetida ao esvaziamento cervical bilateral (n=20; 44,4%) enquanto 35,6% foram submetidos ao ipsilateral (n=16; 35,6%). Na reconstrução cirúrgica os retalhos de tecidos moles incluíram a coxa (n=11; 24,4%), peitoral (n=7; 15,6%), lateral de braço (n=5; 11,1%), antebraço (n=1; 2,2%), dorso (n=1; 2,2%), fásquio-cutâneo supraclavicular (n=1; 2,2%) e local (n=2; 4,4%). Para quatro pacientes (8,9%) foi utilizado tecido ósseo (fíbula).

O esquema de antibiótico profilático intravenoso mais usado foi a clindamicina 600mg e gentamicina 240mg (n=28; 62,2%) com a primeira dose antes de iniciar a cirurgia e a última até 48h após o início da cirurgia. Outros protocolos informados incluíram o uso somente de clindamicina (n=9; 20%) (indicado para cirurgias menos extensas), clindamicina e ceftriaxona (n=3; 6,7%), clindamicina e garamicina (n=1; 2,2%), clindamicina e ciprofloxacino (n=1; 2,2%) e tazocin (n=1; 2,2% - indicado para uma cirurgia extensa feita em dois tempos operatórios). O tempo médio de cirurgia foi de 9 horas e a internação na UTI teve uma média de 3,6 dias.

Em relação à variável de maior interesse deste estudo, 14/45 pacientes (31,1%) apresentaram ISC (**Tabela 2**). Cultura de secreção foi feita para 3/14 (21,4%) dos pacientes com ISC dos quais uma foi positiva para a espécie *Streptococcus viridans* alfa-hemolítico enquanto na cultura dos outros dois pacientes nenhuma espécie cresceu.

Tabela 1 - Dados clínicos dos 45 pacientes submetidos à cirurgia.

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	32	71,1
Feminino	13	28,9
Cor da pele		
Branco	26	57,8
Parda	14	31,1
Preta	2	4,4
Amarela	3	6,7
Atendimento		
SUS	23	51,1
Convênio	22	48,9
Alfabetizado		
Sim	43	95,6
Não	2	4,4
Fumante		
Não	18	40,0
Sim	16	35,6
Ex-fumante	11	24,4
Etilista		
Não	12	26,7
Sim	25	55,6
Ex-etilista	8	17,8
Comorbidade		
Não	9	20,0
Sim	36	80,0
Local do tumor		
Língua	20	44,4
Assoalho oral	9	20,0
Mucosa jugal/região retromolar	7	15,6
Gengiva	1	2,2
Palato duro	2	4,5
Lábio inferior	6	13,3
Estágio clínico		
I	5	11,1
II	9	20,0
III	5	11,1
IV	19	42,2
Não estadiado	7	15,6
ASA		
I	1	2,2
II	31	68,9
III	12	26,7
IV	1	2,2

Tabela 2 - Dados cirúrgicos dos 45 pacientes submetidos à cirurgia.

Variáveis	n	%
Sítios anatômicos operados em boca		
1	14	31,1
2 ou mais	31	68,9
Tipo de tecido removido		
Mole	24	53,3
Mole e duro	21	46,7
Ampliação para pele ou orofaringe		
Não	34	75,6
Sim	11	24,4
Extração de dente intraoperatória		
Não	32	71,1
Sim	15	28,9
Esvaziamento cervical		
Não	9	20,0
Sim	36	80,0
Reconstrução cirúrgica		
Não	13	28,9
Sim	32	71,1
Traqueostomia		
Não	14	31,1
Sim	31	68,9
Esquema de antibiótico profilático		
Clindamicina e Gentamicina	28	62,2
Outros	15	33,4
Nenhum	1	2,2
Não informado	1	2,2
Enxaguante bucal profilático		
Não	29	64,4
Sim	15	33,3
Não informado	1	2,0
Transfusão sanguínea intraoperatória		
Não	38	84,4
Sim	7	15,6
Internação na UTI		
Não	11	24,4
Sim	34	75,6
Infecção do sítio cirúrgico		
Não	31	68,9
Sim	14	31,1

De modo geral, as frequências estão corroborando com a literatura^{114–116}, no qual a maioria dos casos de CB ocorrem pessoas do sexo masculino, idosas e com histórico de fumo ou etilismo, sendo a língua o local mais comum e com estágio avançado no diagnóstico. Do mesmo modo, como já descrito^{26,31}, a maioria dos pacientes foi submetida ao esvaziamento cervical e precisou de retalho. Em relação à ISC, 31,1% dos pacientes desenvolveram esta complicação estando dentro do observado em outros trabalhos (entre 19,8 e 40,6%)^{22,33,34}.

4.1.1.2 Análise estatística dos dados clínicos

A avaliação da associação entre as variáveis clínicas e a ISC é apresentada nas **Tabelas 3 e 4**. Para uma melhor análise desta relação foi feita a categorização das seguintes variáveis: Cor da pele em branco (n=26; 57,8%) x não branco (n=19; 42,2%); grau de ensino em até ensino médio incompleto (n=21; 46,7%) e ensino médio completo e superior (completo ou incompleto) (n=24; 53,3%); tamanho do tumor em T1/T2 (n=18; 47,4%) e T3/T4 (n=20; 52,6%); estágio clínico em I/II (n=14; 36,8%) x III/IV (n=24; 63,2%); ASA em I/II (n=32; 71,1%) x III/IV (n=13; 28,9%), e antibiótico profilático em clindamicina e gentamicina (n=28; 65,1%) x outros (n=15; 34,9%).

Foi observado que a ISC ocorreu com maior frequência nos pacientes mais jovens, nos estágios clínicos III/IV, submetidos ao esvaziamento cervical e reconstrução cirúrgica, e com maior tempo operatório ($p<0,05$). Além disso, através da regressão logística foi observado que pacientes com tumores maiores (T3/T4) e estágio clínico avançado (III/IV) apresentam 6,5 e 9,3 vezes mais chances de desenvolver ISC do que os pacientes com tumores menores e estágio I/II, respectivamente, sendo estes valores estatisticamente significativos. E em relação a idade foi observado que pacientes mais jovens apresentaram maior risco de desenvolver ISC (OR: 0,93; IC: 0,88-0,99).

Tabela 3 - Análise das variáveis clínicas em relação à infecção do sítio cirúrgico.

Variáveis	Infecção do sítio cirúrgico		Valor de p^1	OR	IC 95%	Valor de p^2
	Não	Sim				
Qualitativas						
Sexo						
Masculino	22 (71,0%)	10 (71,4%)		1,00		
Feminino	9 (29,0%)	4 (28,6%)	0,999 ^a	0,98	0,24-3,94	0,975
Cor da pele						
Branco	18 (58,1%)	8 (57,1%)		1,00		
Não branco	13 (41,9%)	6 (42,9%)	0,999 ^b	1,04	0,28-3,72	0,954
Atendimento						
SUS	15 (48,4%)	8 (57,1%)		1,00		
Convênio	16 (51,6%)	6 (42,9%)	0,824 ^b	0,70	0,20-2,50	0,587
Grau de ensino						
Até ensino médio incompleto	17 (54,8%)	4 (28,6%)		1,00		
Ensino médio completo e superior	14 (45,2%)	10 (71,4%)	0,189 ^a	3,04	0,78-11,80	0,109
Fumante						
Não	15 (48,4%)	3 (21,4%)		1,00		
Sim	9 (29,0%)	7 (50,0%)		3,89	0,80-18,98	0,093
Ex-fumante	7 (22,6%)	4 (28,6%)	0,249 ^a	2,86	0,50-16,36	0,238
Etilista						
Não	10 (32,3%)	2 (14,3%)		1,00		
Sim	17 (54,8%)	8 (57,1%)		2,35	0,42-13,34	0,334
Ex-etilista	4 (12,9%)	4 (28,6%)	0,277 ^a	5,00	0,64-39,06	0,125
Comorbidade						
Não	5 (16,1%)	4 (28,6%)		1,00		
Sim	26 (83,9%)	10 (71,4%)	0,428 ^a	0,481	0,11-2,16	0,340
Hipertensão arterial						
Não	13 (41,9%)	7 (50,0%)		1,00		
Sim	18 (58,1%)	7 (50,0%)	0,857 ^b	0,72	0,20-2,57	0,615
DPOC						
Não	22 (71,0%)	10 (71,4%)		1,00		
Sim	9 (29,0%)	4 (28,6%)	0,999 ^a	0,98	0,24-3,94	0,975
Tamanho do tumor [†]						
T1/T2	16 (59,3%)	2 (18,2%)		1,00		
T3/T4	11 (40,7%)	9 (81,8%)	0,052 ^b	6,54	1,18-36,32	0,032 [*]
Metástase linfonodal [†]						
N0	17 (63,0%)	4 (36,4%)		1,00		
N1/N2/N3	10 (37,0%)	7 (63,6%)	0,167 ^a	2,98	0,69-12,76	0,142
Estágio clínico [†]						
I/II	13 (48,1%)	1 (9,1%)		1,00		
III/IV	14 (51,9%)	10 (90,9%)	0,030 ^{a,*}	9,29	1,04-82,96	0,046 [*]
ASA						
I/II	23 (74,2%)	9 (64,3%)		1,00		
III/IV	8 (25,8%)	5 (35,7%)	0,502 ^a	1,60	0,41-6,21	0,499
Quantitativas						
Idade						
Média (DP)	66,6 (12,9)	54,9 (12,7)				
Mediana (min-max)	67,4 (39,3-88,7)	53,2 (25,9-76,3)	0,011 ^{c,*}	0,93	0,88-0,99	0,016 [*]
Número de comorbidades						
Média (DP)	2,1 (1,7)	1,9 (2,2)				
Mediana (min-max)	2,0 (0-6)	1,0 (0-7)	0,275 ^c	0,92	0,65-1,31	0,649
IMC						
Média (DP)	26,0 (4,3)	23,3 (4,2)				
Mediana (min-max)	25,8 (17,5-37,9)	22,6 (16,9-31,1)	0,050 ^c	0,85	0,71-1,00	0,057
CPO-D						
Média (DP)	21,7 (5,6)	17,93 (7,7)				
Mediana (min-max)	24,0 (11-28)	19,0 (2-28)	0,135 ^c	0,92	0,79-1,03	0,125
NIC [†]						
Média (DP)	2,6 (1,3)	3,3 (2,3)				
Mediana (min-max)	2,3 (1-6,4)	2,2 (1,2-9,3)	0,548 ^c	1,47	0,91-2,39	0,117

¹: Teste de independência; ²: Modelo de regressão logística simples; ^a: Teste exato de Fisher; ^b: Teste de Qui-quadrado com correção de continuidade; ^c: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney; [†]: Pacientes sem esta informação foram excluídos; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; min: mínimo; max: máximo; OR: odds ratio.

Tabela 4 - Análise das variáveis cirúrgicas em relação à infecção do sítio cirúrgico.

Variáveis	Infecção do sítio cirúrgico		Valor de p^1	OR	IC 95%	Valor de p^2
	Não	Sim				
Qualitativas						
Sítios anatômicos operados em boca						
1	12 (38,7%)	2 (14,3%)		1,00		
2 ou mais	19 (61,3%)	12 (85,7%)	0,165 ^a	3,79	0,72-19,98	0,116
Tipo de tecido removido						
Mole	17 (54,8%)	7 (50,0%)		1,00		
Mole e duro	14 (45,2%)	7 (50,0%)	0,999 ^b	1,21	0,34-4,30	0,763
Ampliação para pele ou orofaringe						
Não	26 (83,9%)	8 (57,1%)		1,00		
Sim	5 (16,1%)	6 (42,9%)	0,071 ^a	3,90	0,94-16,25	0,062
Extração de dente intraoperatória						
Não	23 (74,2%)	9 (64,3%)		1,00		
Sim	8 (25,8%)	5 (35,7%)	0,502 ^a	1,60	0,41-6,21	0,499
Esvaziamento cervical						
Não	9 (29,0%)	0 (0,0%)				
Sim	22 (71,0%)	14 (100,0%)	0,040 ^{a,*}	NA		
Extensão do esvaziamento cervical						
Ipsilateral	12 (54,5%)	4 (28,6%)		1,00		
Bilateral	10 (45,5%)	10 (71,4%)	0,236 ^b	3,00	0,72-12,56	0,132
Reconstrução cirúrgica						
Não	13 (41,9%)	0 (0,0%)				
Sim	18 (58,1%)	14 (100,0%)	0,004 ^{a,*}	NA		
Traqueostomia						
Não	12 (38,7%)	2 (14,3%)		1,00		
Sim	19 (61,3%)	12 (85,7%)	0,165 ^a	3,79	0,72-19,98	0,116
Esquema de antibiótico profilático [†]						
Clindamicina e Gentamicina	16 (55,2%)	12 (85,7%)		1,00		
Outros	13(44,8%)	2 (14,3%)	0,104 ^b	0,205	0,04-1,09	0,062
Enxaguante bucal profilático [†]						
Não	22 (71,0%)	7 (53,8%)		1,00		
Sim	9 (29,0%)	6 (46,2%)	0,313 ^a	2,01	0,55-7,99	0,279
Transfusão sanguínea intraoperatória						
Não	28 (90,3%)	10 (71,4%)		1,00		
Sim	3 (9,7%)	4 (8,6%)	0,180 ^a	3,73	0,71-19,67	0,120
Internado na UTI						
Não	10 (32,3%)	1 (7,1%)		1,00		
Sim	21 (67,7%)	13 (92,9%)	0,132 ^a	6,19	0,71-54,16	0,099
Quantitativa						
Tempo de cirurgia (horas)						
Média (DP)	8,2 (5,4)	11,3 (3,6)				
Mediana (min-max)	9,2 (1,3-18,0)	10,9 (6,33-17,0)	0,048 ^{a,*}	1,14	0,10-1,31	0,057

¹: Teste de independência; ²: Modelo de regressão logística simples; ^a: Teste exato de Fisher; ^b: Teste de Qui-quadrado com correção de continuidade; ^c: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney; [†]: Pacientes sem esta informação foram excluídos; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; min: mínimo; max: máximo; NA: não aplicável; OR: *odds ratio*.

A associação da ISC com estágio clínico avançado, esvaziamento cervical, reconstrução cirúrgica e maior tempo de cirurgia já foi observado por Belusic-Gobic et al.²⁶ e Ogihara et al.³⁹. Estas variáveis indicam que nestes casos as cirurgias são mais complexas e extensas do que as de tumores com estágio I/II, sem esvaziamento e reconstrução, e menor tempo operatório, o que facilita a ocorrência de ISC. Em relação à idade, os trabalhos relatam que a ISC é mais frequente em pacientes mais velhos visto que estes em geral têm pior status imune, facilitando o desenvolvimento de infecções⁴⁶. Porém, nosso

estudo revelou o oposto, pacientes mais novos tiveram uma maior ocorrência de ISC. Para entender melhor este resultado fizemos uma análise de associação entre a idade, e o tamanho e estágio clínico do tumor visto que essas duas últimas variáveis aumentaram a chance de ISC segundo a análise do modelo de regressão.

Na **Tabela 5** observa-se que, de modo geral, os pacientes mais jovens tinham tumores mais avançados e maiores (T3/T4), quando comparados aos tumores menores (T1/T2) e de estágios mais iniciais, diagnosticados nos pacientes mais velhos, sendo esta diferença estatisticamente significativa para o tamanho do tumor (mediana de 57,2 anos x 72,9 anos; $p=0,033$). Isto sugere que a associação encontrada entre pacientes mais jovens e a ISC, foi tendência uma vez que pacientes mais novos chegaram ao serviço já com tumores maiores do que os mais velhos, o que indica que o tratamento cirúrgico destes deveria ser mais agressivo, com uma cirurgia mais longa que consequentemente facilitaria a ocorrência de ISC.

Tabela 5 - Análise de associação entre a idade e as variáveis de tamanho e estágio clínico do tumor.

Variáveis	n	Idade		Valor de p^1
		Média (DP)	Mediana (min-max)	
Tamanho do tumor [†]				
T1/T2	18	68,19 (14,47)	72,88 (39,28-88,69)	0,033*
T3/T4	20	59,42 (10,11)	57,20 (43,97-81,35)	
Estágio clínico [†]				
I/II	14	67,25 (15,18)	69,46 (39,28-88,69)	0,173
III/IV	24	61,43 (11,29)	58,80 (43,97-81,35)	

¹: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney; [†]: Pacientes sem esta informação foram excluídos; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; min: mínimo; max: máximo; OR: *odds ratio*.

4.1.1.3 Dados das amostras coletadas

Para os 45 pacientes do módulo de ISC, coletamos um total de 175 amostras, com apenas 5 coletas a menos (-2,8%) do planejamento inicial tendo 4 coletas por paciente. Duas coletas foram perdidas por falta de local adequado para fazer a coleta I (nestes casos a primeira coleta foi feita no momento II do pré-operatório); as outras três coletas não foram feitas pois os pacientes receberam alta antes do momento previsto, levando à perda da coleta III (coleta até 5 dias após a cirurgia). Para analisar o tempo transcorrido entre coletas nos baseamos no dia da cirurgia (denominado C0). A **Figura 4** exemplifica a média de dias entre cada ponto de coleta. A primeira coleta foi feita em ambulatório, em média,

~29 dias antes da cirurgia. A segunda coleta foi feita um dia antes da cirurgia (na internação) ou no mesmo dia da cirurgia. As coletas III e IV foram feitas em média 4 e 12 dias após a cirurgia, respectivamente.

Para avaliar as coletas de cada paciente detalhadamente, foi feita uma adaptação do *swimmer plot* (**Figura 5**). Observa-se que exceto pelos pacientes de número #21 e #25, os outros apresentaram ISC no momento IV como esperado. Observamos ISC no paciente #21 após o período acompanhado, enquanto o paciente #25 apresentou ISC desde a coleta III. Para este último caso, no momento da coleta IV este paciente ainda apresentava ISC. No entanto, como a ISC já estava em remissão, ela foi desconsiderada, e a coleta III que foi analisada em conjunto com as demais amostras positivas para ISC. Deste modo, 174 amostras (99,4%) seguiram para a parte laboratorial, sendo 43, 45, 41 e 45 amostras alocadas nos momentos I, II, III e IV, respectivamente.

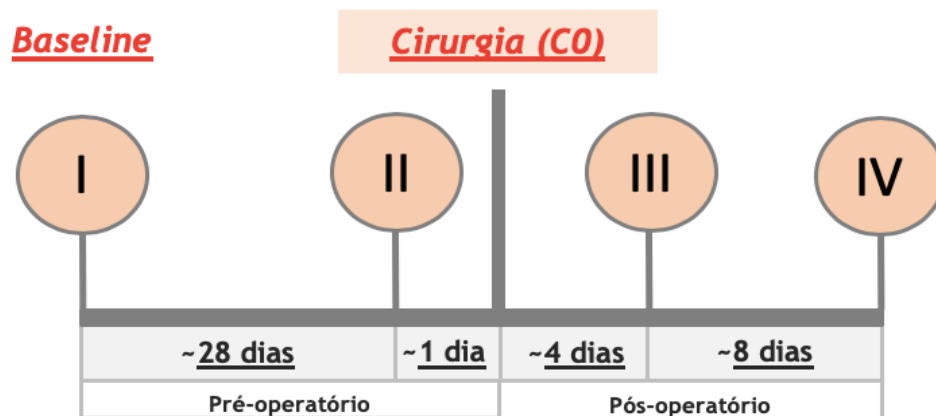


Figura 4 - Descrição da média de dias entre os momentos de coletas (I-IV) de acordo com o dia da cirurgia (C0).

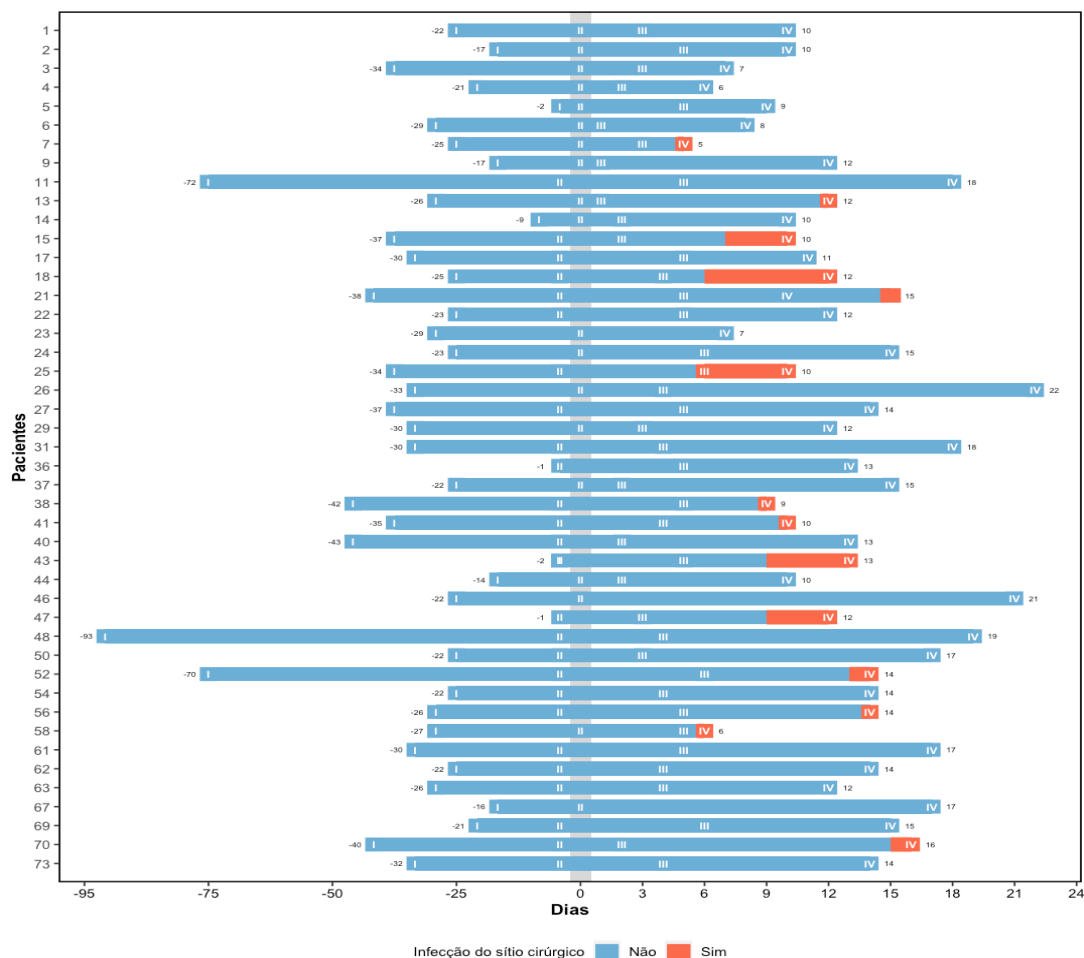


Figura 5 - Descrição das coletas de cada paciente de acordo com o dia da cirurgia (C0). Os números I a IV nas barras indicam os momentos precisos das coletas, e a cor azul e alaranjada se referem respectivamente aos momentos sem e com infecção do sítio cirúrgico.

4.1.2 Análise quantitativa das bactérias por PCR em tempo real

A análise quantitativa das bactérias foi feita para 170/174 amostras (97,7%); os 4 casos faltantes não foram incluídos por não haver mais DNA disponível (a totalidade foi usada para gerar os *amplicons* necessários para o sequenciamento). Estas amostras eram dos pacientes #9 (coleta I, III e IV) e #61 (coleta IV). Ao final, para os momentos I, II, III e IV, coletamos respectivamente 42, 43, 40 e 44 amostras. Para uma primeira análise avaliamos o *cycle threshold* (C_T) médio das amostras em relação ao alvo da amplificação (gene 16S-rDNA, beta-actina humano e razão entre eles), contrastado com o momento de coleta (**Tabela 6**). O objetivo foi observar se há uma mudança na quantidade total de DNA bacteriano, humano ou na relação entre eles de acordo com o ponto de coleta, de modo independente da ocorrência de ISC. Esta foi uma análise de dependência e, deste modo,

nela foram incluídos apenas os pacientes com os 4 pontos de coletas – resultando em 148 amostras derivadas de 37 pacientes.

Observamos uma diferença significativa entre os momentos de coletas e o C_T do gene 16S-rDNA, beta-actina e a razão entre eles (**Tabela 6**). Quando comparamos cada par para avaliar melhor quais pontos resultaram em uma significância estatística, observamos que a significância ocorreu entre os momentos pré-operatórios (I e II) versus os pós-operatórios (III e IV) ($p < 0,05$), tanto para os C_T s do 16S-rDNA, beta-actina como da razão entre eles. Para o gene 16S-rDNA foi observado um menor C_T antes da cirurgia do que no pós-operatório o que indica uma menor quantidade de bactérias no momento pós-cirúrgico. Para beta-actina, o oposto ocorreu mostrando uma maior quantidade de células humanas coletadas no *swab* após a cirurgia. Em uma segunda análise, fizemos esta mesma avaliação agora considerando a ocorrência de ISC. Este mesmo padrão (DNA bacteriano diminuindo e DNA humano aumentando após a cirurgia) se repetiu de modo independente e sem diferenças significativas entre os grupos sem ou com ISC (**Figura 6A e B**).

Tabela 6 - Avaliação do C_T médio em relação ao gene-alvo e momento de coleta do estudo de infecção do sítio cirúrgico.

Iniciador	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p^1
Cr do 16S-V1				
I	37	18,07 (2,08)	18,41 (13,80-21,70)	<0,001*
II	37	19,10 (3,14)	19,02 (14,46-27,02)	
III	37	21,42 (3,40)	21,63 (16,25-30,96)	
IV	37	22,78 (3,73)	22,53 (16,76-32,25)	
Cr da beta-actina				
I	37	28,65 (1,95)	27,94 (25,80-33,17)	<0,001*
II	37	28,57 (1,59)	28,51 (25,96-33,31)	
III	37	28,07 (2,34)	27,83 (25,41-38,49)	
IV	37	27,62 (1,31)	27,45 (25,31-30,41)	
Razão dos Cts (beta-actina/16S-V1)				
I	37	1,60 (0,18)	1,60 (1,29-2,10)	<0,001*
II	37	1,53 (0,21)	1,51 (1,04-2,01)	
III	37	1,33 (0,17)	1,30 (0,99-1,63)	
IV	37	1,24 (0,19)	1,26 (0,84-1,68)	

¹: Teste não paramétrico de Friedman; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; min: mínimo; max: máximo

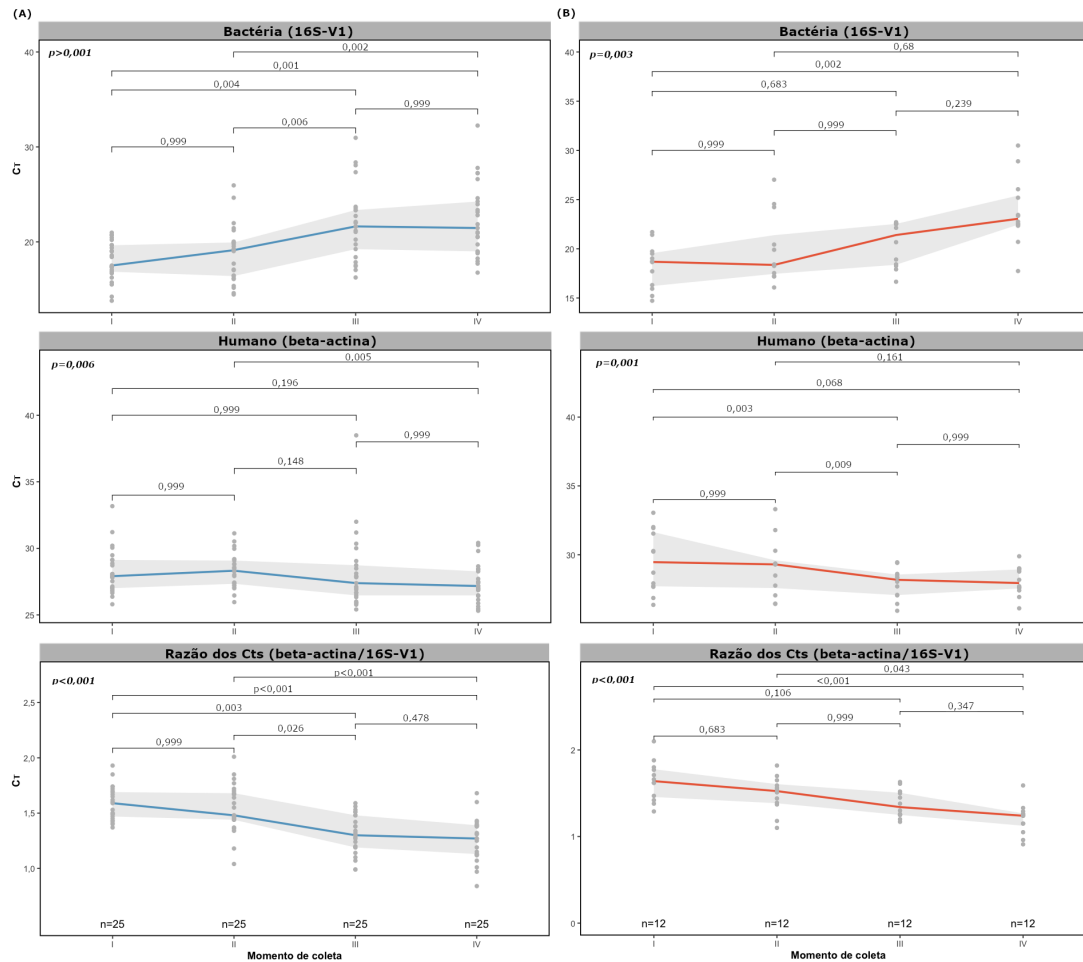


Figura 6 - Gráfico de perfil dos CTs (bacteriano, humano e sua razão) conforme o momento da coleta (I a IV) estratificado por infecção do sítio cirúrgico (A, linhas em azul – ausência de infecção) e (B, linhas em vermelho – presença de infecção) (linha contínua representa a mediana e região sombreada o percentil 25 e 75; teste não paramétrico de Friedman).

De modo geral, estes resultados sugerem que a diminuição da quantidade bacteriana após a cirurgia não está relacionada aos pacientes que terão ou não ISC. Possivelmente isto ocorre devido aos procedimentos de assepsia peri-operatória, antibioticoterapia profilática e a remoção de grande quantidade de tecido mole e/ou duro nas cirurgias que consequentemente leva em conjunto as bactérias a eles aderidos e causa uma diminuição na microbiota^{117,118}. Da mesma forma, devido à cirurgia uma grande quantidade de células atua na reparação da ferida cirúrgica (neutrófilos, macrófagos, fator de necrose tumoral-alfa, citocinas, fatores de crescimento e outras)¹¹⁹, o que pode explicar a maior quantidade de DNA humano no pós-operatório. Em seguida, avaliamos se haveria diferenças entre os CTs dos alvos de amplificação no momento de coleta, de acordo com a presença de ISC (**Tabela 7**). Novamente não encontramos diferenças significativas, sugerindo que nem a quantidade de bactérias na cavidade oral nem a relação DNA

humano/bacteriano podem ser usadas para prever pacientes com maior chance de desenvolver ISC.

Tabela 7 - Avaliação do CT médio em relação ao gene-alvo, momento de coleta e presença de infecção do sítio cirúrgico.

Momento da coleta	ISC	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p^1	OR	IC 95%	Valor de p^2
Ct do 16S-V1								
I	Não	29	18,42 (2,29)	18,50 (13,80-24,27)				
	Sim	13	18,18 (2,20)	18,65 (14,72-21,70)	0,881	0,95	0,71-1,28	0,746
II	Não	30	19,21 (2,99)	19,26 (14,46-25,95)				
	Sim	14	19,54 (3,42)	18,36 (15,55-27,02)	0,940	1,04	0,84-1,27	0,732
III	Não	27	22,15 (3,77)	22,01 (16,25-30,96)				
	Sim	13	20,51 (2,19)	20,74 (16,65-22,69)	0,266	0,85	0,68-1,06	0,157
IV	Não	30	22,28 (4,11)	21,24 (16,76-32,48)				
	Sim	14	24,36 (3,56)	23,40 (17,74-30,49)	0,062			
Ct da beta-actina								
I	Não	29	28,33 (1,61)	27,94 (25,80-33,17)				
	Sim	13	29,25 (2,39)	28,70 (25,94-33,05)	0,348	1,29	0,91-1,83	0,154
II	Não	30	28,37 (1,24)	28,29 (25,96-31,13)				
	Sim	14	28,94 (1,94)	28,89 (26,43-33,31)	0,420	1,29	0,84-1,99	0,250
III	Não	27	28,12 (2,71)	27,39 (25,41-38,49)				
	Sim	13	27,90 (1,06)	28,04 (25,93-29,45)	0,554	0,96	0,70-1,30	0,773
IV	Não	30	27,49 (1,34)	27,29 (25,31-30,41)				
	Sim	14	27,99 (1,03)	27,76 (26,11-29,89)	0,158			
Razão dos CTs (beta-actina/16S-V1)								
I	Não	29	1,56 (0,16)	1,50 (1,26-1,93)				
	Sim	13	1,63 (0,23)	1,62 (1,29-2,10)	0,348	1,02	0,99-1,06	0,221
II	Não	30	1,51 (0,22)	1,46 (1,04-2,01)				
	Sim	14	1,51 (0,21)	1,52 (1,10-1,82)	0,753	1,00	0,97-1,03	0,971
III	Não	27	1,29 (0,18)	1,30 (0,99-1,59)				
	Sim	13	1,37 (0,15)	1,34 (1,17-1,63)	0,199	1,03	0,99-1,07	0,170
IV	Não	30	1,27 (0,21)	1,29 (0,81-1,68)				
	Sim	14	1,17 (0,18)	1,20 (0,91-1,59)	0,082			

¹: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney, ²: Modelo de regressão logística simples; DP: desvio padrão; ISC: infecção do sítio cirúrgico; min: mínimo; max: máximo; OR: *odds ratio*.

4.1.3 Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene 16S-rDNA

4.1.3.1 Resultado do processamento dos *reads*

Para esta parte não conseguimos obter a amplificação do gene 16S-rDNA em apenas 2/174 amostras (1,1%). Ambas as amostras eram do mesmo paciente (#9) e foram coletadas nos momentos I e III. As demais 172 amostras (98,8%) seguiram para o sequenciamento, sendo representativas dos momentos I (42 amostras), II (45 amostras), III (40 amostras) e IV (45 amostras). No sequenciamento geramos uma média de 85.352 *reads* brutos/amostra (variando de 23.013 a 314.457 *reads*), restando uma média de 20.205 *reads*/amostra ao final do processamento. A **Figura 7** mostra a curva de saturação dessas amostras usada para determinar a diversidade e o número necessário de *reads* para atingir a saturação.

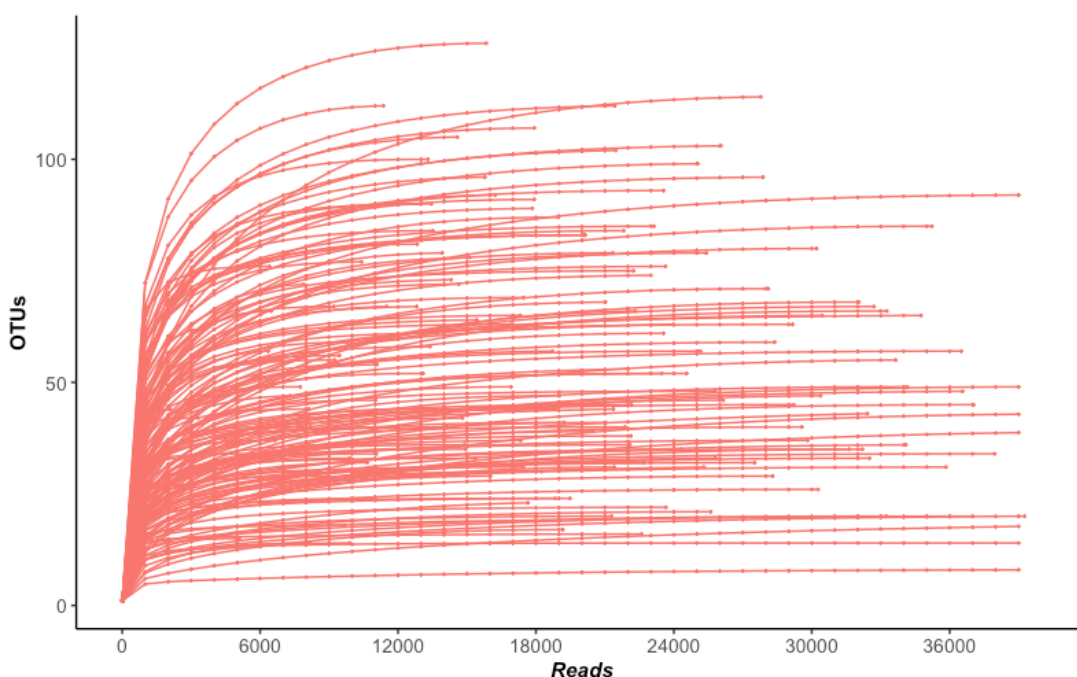


Figura 7 - Curva de saturação das 172 amostras sequenciadas do módulo I.

De modo geral, as amostras saturaram ao redor dos 6.000 *reads*; para quinze amostras (8,7%), obtivemos um número final de *reads* abaixo de 6.000. Estas amostras foram sequenciadas novamente a fim de atingir um melhor resultado; todavia, todas continuaram com número baixo de *reads* o que sugere uma limitação intrínseca a estas amostras e não um problema técnico do sequenciamento. Para otimizar os resultados fundimos os diferentes sequenciamentos dessas amostras a fim de atingir um maior número de *reads*. Após esta junção, 9 amostras ainda ficaram abaixo de 6.000 *reads*;

porém, através da **Figura 8** podemos observar que mesmo com um número de *reads* baixo, todas atingiram saturação, permitindo a inclusão das mesmas nas análises do estudo. Exceto por uma destas amostras, as outras 8 foram coletas do pós-operatório, momento com menor quantidade de bactérias na cavidade oral, conforme descrito anteriormente (item 4.1.2), o que de certo modo justifica a dificuldade em obter um melhor sequenciamento.

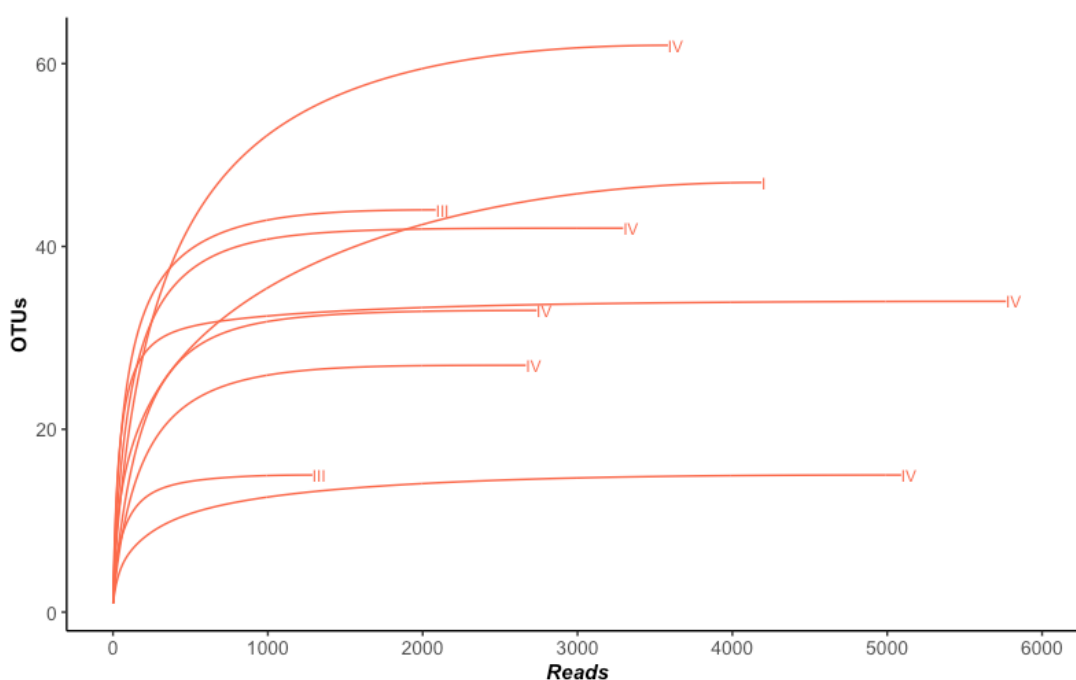


Figura 8 - Curva de saturação das 9 amostras com número de sequencias abaixo de 6.000 *reads* (I é referente a coleta no pré-operatório, e III e IV as do pós-operatório).

Para analisar melhor esta questão consideramos as amostras das coletas III e IV analisadas por PCR em tempo real. Observamos que a média geral dos CTs nestes momentos para 16S-rDNA foi de 22,31 e o da beta-actina foi 27,84 com razão média de 1,28. Todavia, considerando apenas as amostras com baixo número de *reads* no momento III e IV, a média destas para 16S-rDNA foi de 27,17 e o da beta-actina foi 27,78, com razão de 1,04. Isto nos demonstra que realmente as amostras que tivemos dificuldades no sequenciamento tinham uma menor quantidade de bactéria do que a média geral, o que explica a dificuldade de gerar amplicons e a consequente menor quantidade de *reads*.

Nas 172 amostras observamos 16 filos, 24 classes, 45 ordens, 89 famílias, 194 gêneros e 507 espécies bacterianas. Em cada um desses níveis houve bactérias onde a classificação mais detalhada não foi possível. Isto porque, esses casos podem ser referentes

a táxons ainda não identificados na literatura ou porque a região sequenciada não foi suficiente para classificar a bactéria. Para estes casos o SILVA usa diferentes nomenclaturas incluindo: “*Ambiguous taxa*”, “NA”, “*uncultured*”, “*uncultured bacterium*”, “*unidentified*”, e neste trabalho para eles não serem considerados como um mesmo táxon e influenciar nos resultados, incluímos um número identificador após cada nomenclatura para distintas OTUs, de modo a diferenciá-las.

Para avaliar melhor como foi a classificação final das bactérias, na **Figura 9** observamos todas as bactérias encontradas em nível de gênero de acordo com o momento da coleta. Ao todo tivemos 59 gêneros desconhecidos (soma dos distintos casos categorizados como “*Ambiguous taxa*”, “NA”, “*uncultured*”, “*uncultured bacterium*” e “*unidentified*”). Estas bactérias representaram apenas 0,9% de todos os gêneros das 172 amostras da cirurgia. Assim, por ter esta baixa frequência as avaliações deste trabalho puderam serem feitas até o nível de gênero. Destaca-se que esses casos desconhecidos tiveram uma frequência ainda menor a nível de filo, classe, ordem e família; todavia, a nível de espécie representaram cerca de 97% dos casos. A dificuldade para identificar as bactérias neste último nível já era esperada. O uso de apenas um fragmento do gene 16S-rDNA é limitante para um maior aprofundamento filogenético. Para este tipo de especificidade, o sequenciamento do tipo *shotgun* é mais indicado por sequenciar todo o genoma bacteriano, gerando uma imensa quantidade de alvos e maior detalhamento para identificação^{69,120}. Assim, nossas avaliações foram feitas apenas até o nível de gênero.

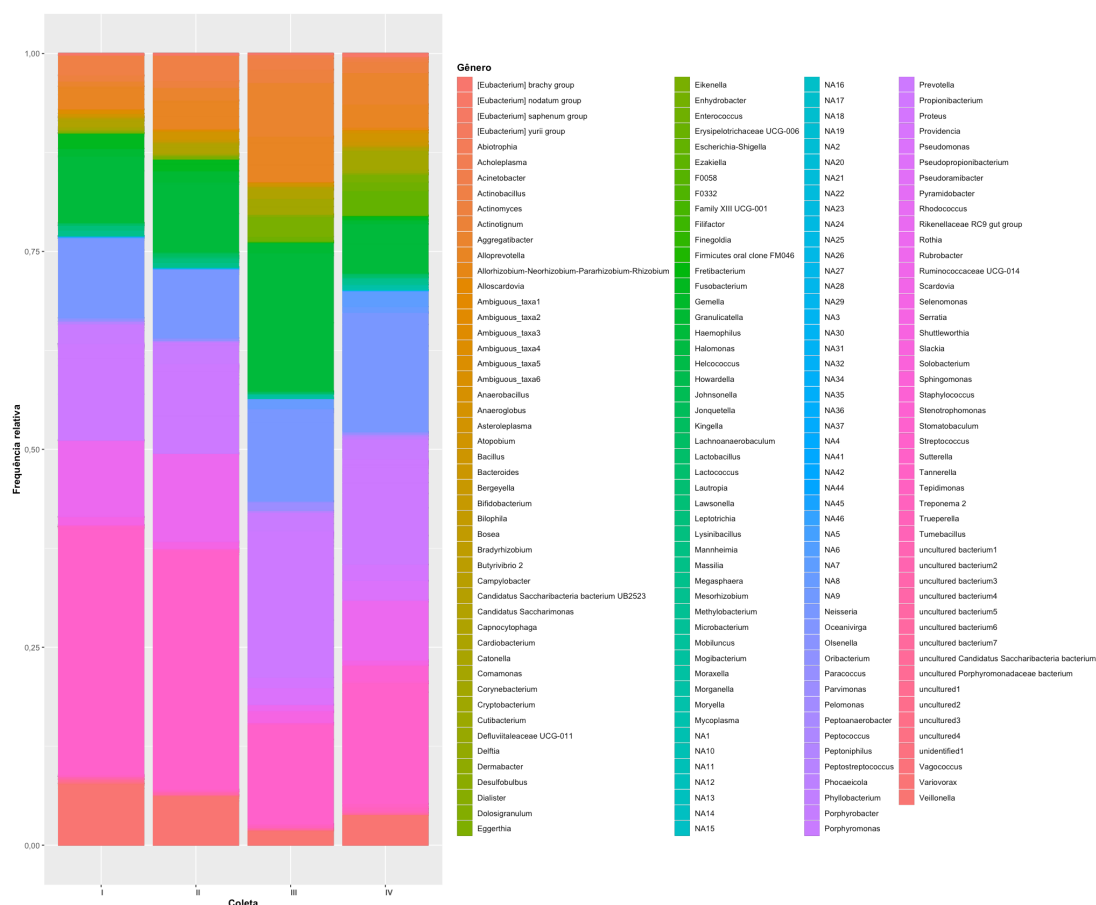


Figura 9 - Frequência relativa das bactérias a nível de gênero de acordo com o momento de coleta (I a IV) do módulo I.

4.1.3.2 Diversidade alfa e beta

Para avaliar a diversidade as amostras foram agrupadas de acordo com os momentos das coletas (I a IV), comparando os pacientes que tiveram ou não ISC. A nível de OTU, na avaliação da diversidade alfa, observamos que no momento IV (12 dias após a cirurgia), os pacientes que tiveram ISC apresentaram uma maior diversidade bacteriana de acordo com os 3 índices analisados (*Observed*, Shannon e Simpson; todos com $p < 0,05$) (**Figura 10**), indicando que os pacientes com ISC apresentam um maior número de bactérias em suas amostras e estas estão mais bem distribuídas em relação a suas frequências do que os sem ISC. Enquanto isso na análise da diversidade beta, através do *Principal Coordinates Analysis* 2D (PCoA-2D), foi observada uma diferença significativa neste mesmo momento na análise *weighted* Unifrac ($p = 0,043$) o que sugere que a quantidade de bactérias é diferente entre os grupos no momento da ocorrência de ISC (**Figura 11**). Em suma, no momento da coleta 4, existe uma maior diversidade bacteriana nos pacientes que apresentam infecção instalada. Fora do momento da infecção as diversidades são similares

e não permitem prever a ocorrência de ISC. De fato, no modelo de regressão logística, nenhuma significância foi obtida sugerindo que não é possível prever pacientes com maior chance de ter ISC através da sua diversidade, uma vez que elas só se diferem na presença da infecção (**Tabela 8**).

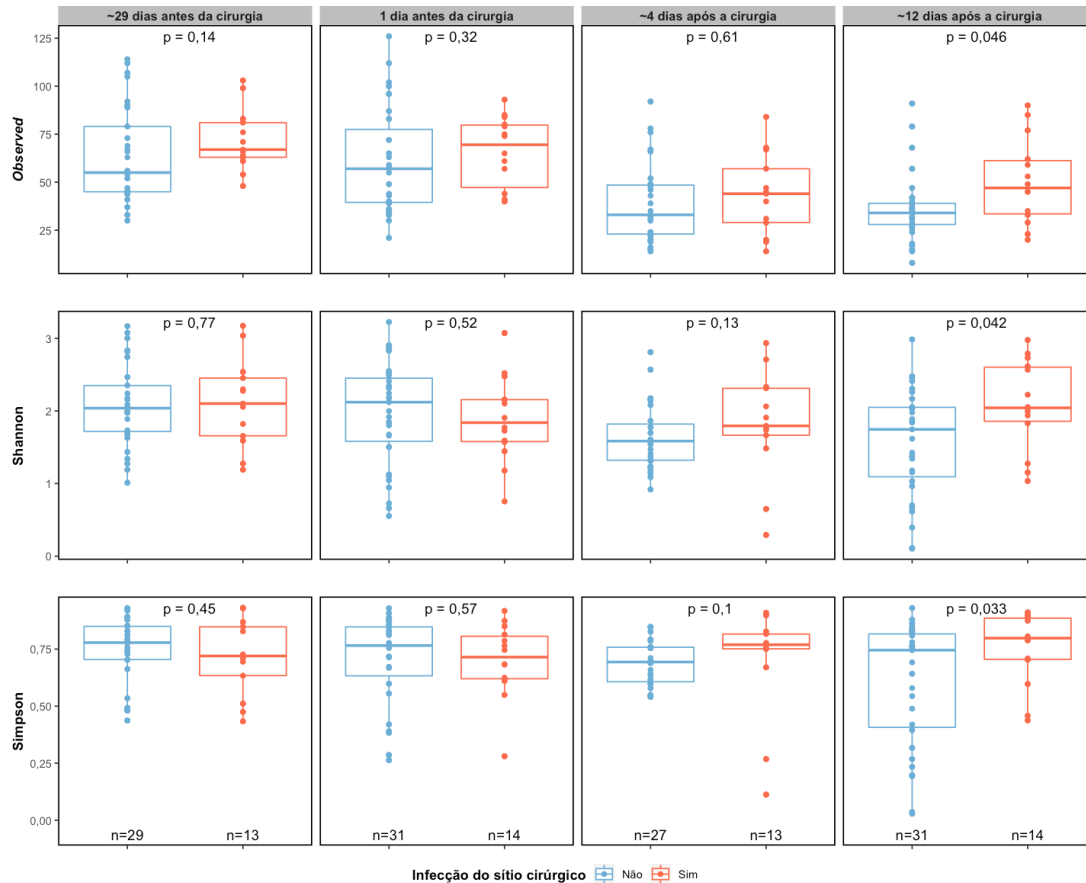


Figura 10 - Diversidade alfa em relação à presença ou ausência de infecção do sítio cirúrgico a nível de OTU nos quatro momentos das coletas (teste não paramétrico U de Mann-Whitney).

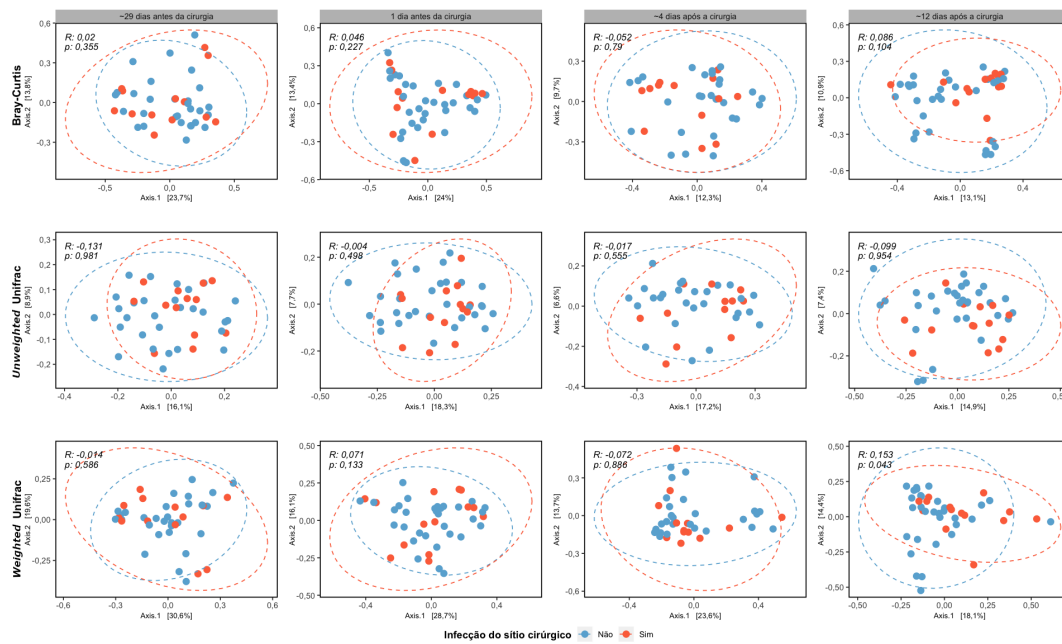


Figura 11 - Diversidade beta em relação à infecção do sítio cirúrgico a nível de OTU nos quatro momentos de coletas (R : coeficiente de similaridade de ANOSIM).

Tabela 8 - Avaliação da diversidade alfa em relação ao momento de coleta e presença de infecção do sítio cirúrgico.

Momento da coleta	ISC	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	OR	IC 95%	Valor de p^1
Observed							
I	Não	29	64,17 (24,59)	55,0 (30-114)	1,02	0,99-1,05	0,295
	Sim	13	72,00 (16,17)	67,0 (48-103)			
II	Não	31	61,10 (27,33)	57,0 (21-126)	1,01	0,98-1,03	0,572
	Sim	14	65,57 (18,58)	69,5 (40-93)			
III	Não	27	39,56 (21,12)	33,0 (14-92)	1,01	0,98-1,04	0,577
	Sim	13	43,46 (21,20)	44,0 (14-84)			
Shannon							
I	Não	29	2,08 (0,57)	2,04 (1,01-3,17)	1,12	0,35-3,54	0,848
	Sim	13	2,11 (0,61)	2,10 (1,19-3,17)			
II	Não	31	1,96 (0,72)	2,12 (0,55-3,22)	0,85	0,33-2,18	0,736
	Sim	14	1,89 (0,59)	1,84 (0,76-3,07)			
III	Não	27	1,64 (0,45)	1,58 (0,92-2,81)	1,82	0,53-6,31	0,344
	Sim	13	1,82 (0,73)	1,79 (0,29-2,93)			
Simpson							
I	Não	29	0,75 (0,14)	0,78 (0,44-0,93)	0,98	0,94-1,02	0,483
	Sim	13	0,72 (0,17)	0,72 (0,43-0,93)			
II	Não	31	0,70 (0,20)	0,76 (0,26-0,93)	1,00	0,96-1,03	0,942
	Sim	14	0,70 (0,16)	0,71 (0,28-0,92)			
III	Não	27	0,69 (0,10)	0,69 (0,54-0,85)	1,00	0,96-1,05	0,827
	Sim	13	0,70 (0,24)	0,77 (0,11-0,91)			

¹: Modelo de regressão logística simples; DP: desvio padrão; IC: Intervalo de confiança; ISC: infecção do sítio cirúrgico; max: máximo; min: mínimo; OR: odds ratio.

Usualmente, é descrito que feridas cirúrgicas são colonizadas por diferentes bactérias originadas de diversas fontes, resultando em um ecossistema polimicrobiano único e complexo. Estas diferentes bactérias em condições favoráveis como a presença de umidade, nutrição e baixa oxigenação são mais propícias a crescerem e se disseminarem. A ocorrência da ISC acontece quando as bactérias em crescimento são virulentas, sua relação então com o hospedeiro muda de simbiótica para patogênica, havendo competição com outros microrganismos do meio enquanto se estabelece uma resistência à resposta imune do hospedeiro^{121,122}. Consequentemente, na ISC observamos um aumento no número e frequência de bactérias patogênicas, de modo consistente com nossos achados.

Para avaliar melhor mudanças na diversidade ao longo das coletas fizemos uma análise de dependência baseada nos valores do *Observed*, Shannon e Simpson. De modo geral, observamos que os pacientes que não tiveram ISC mostraram maior tendência a uma diminuição mais significativa da diversidade bacteriana após a cirurgia (**Figura 12A**). Por outro lado, os pacientes que tiveram ISC não apresentaram diferenças entre as coletas para os índices de Shannon e Simpson. Porém, na avaliação do *Observed* foi notada uma redução significativa no número de OTUs entre a primeira e a terceira coleta (**Figura 12B**). O resultado da avaliação do *Observed* foi semelhante ao observado na amplificação da região V1 do gene 16S-rDNA pela PCR em tempo real. Nesse experimento prévio foi visto que a quantidade de DNA bacteriano diminui depois da cirurgia, e agora, através do sequenciamento, observamos que o número de diferentes bactérias também diminui com a cirurgia. Em ambos os experimentos esse achado ocorreu nos grupos com e sem ISC, enfatizando o grande impacto que a cirurgia de CB tem sobre a microbiota oral ocasionando a diminuição na quantidade e diversidade das bactérias.

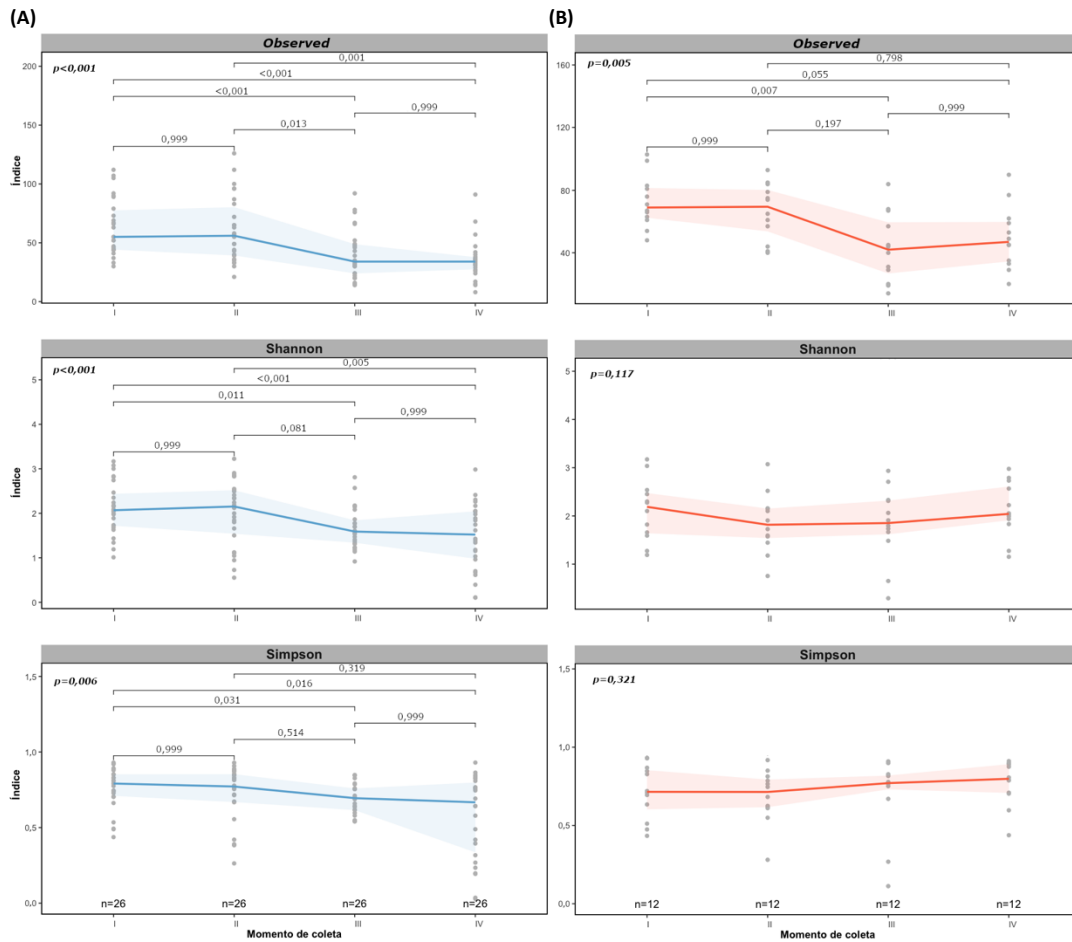


Figura 12 - Gráfico de perfil da diversidade alfa (*Observed*, Shannon, Simpson) em relação ao momento da coleta (I a IV) estratificado por infecção do sítio cirúrgico (A - não) e (B - sim) (linha contínua representa a mediana e região sombreada o percentil 25 e 75; teste não paramétrico de Friedman).

A fim de melhor explorar este resultado fizemos uma análise de associação entre os pacientes com e sem ISC incluindo somente estas amostras pareadas (**Figura 13**). Assim como observado anteriormente na análise com todas as amostras, a diferença ocorreu apenas na coleta do momento da infecção (IV). Porém, esta nova análise sugere que esta associação ocorre porque na presença da ISC o número de bactérias tende a aumentar provavelmente porque esta condição condiciona ao crescimento das bactérias como já explicado. Ressalta-se que todos os resultados das diversidades alfa e beta se mantiveram mesmo sem incluir a amostra do paciente #21 no momento IV (paciente que só apresentam ISC após esta última coleta).

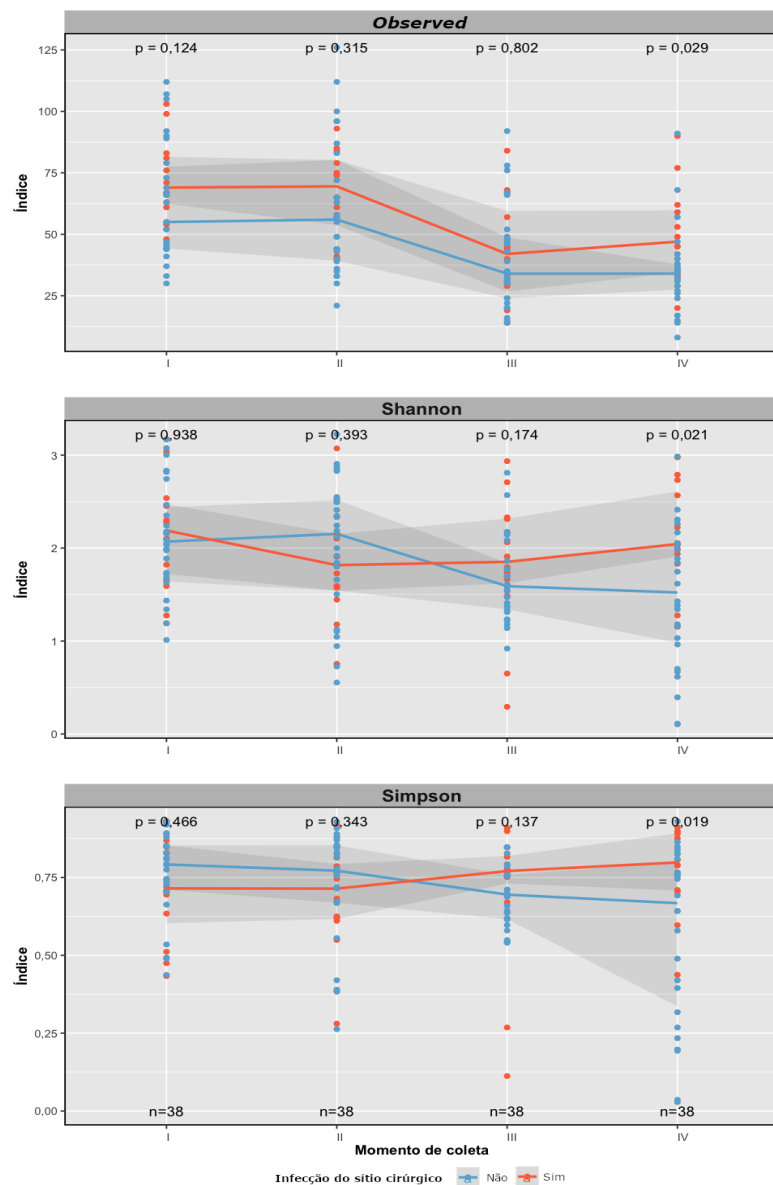


Figura 13 - Gráfico de perfil em relação à diversidade alfa a nível de OTU estratificado por infecção do sítio cirúrgico ao longo das quatro coletas (linha contínua representa a mediana e região sombreada o percentil 25 e 75; teste não paramétrico U de Mann-Whitney).

Além dessas análises, avaliamos também se a diversidade da microbiota em pacientes com alguma característica ou tipo de tratamento em comum (por exemplo, considerando apenas os submetidos ao esvaziamento cervical) seria diferente entre aqueles que apresentaram ou não ISC. Para isso, selecionamos as variáveis clínicas que foram associadas a ISC: estágio clínico, esvaziamento cervical, retalho cirúrgico, idade e tempo de cirurgia. Para facilitar a análise categorizamos as variáveis de idade em não-idoso (< 60 anos; n=22) ou idoso (60 anos ou mais; n=23), e o tempo de cirurgia em até 6,4 horas (n=16) ou acima de 6,4 horas (n=29) baseado no ponto de corte gerado pela curva ROC (sensibilidade=0,93 e especificidade=0,48). Nas análises consideramos apenas os

momentos de coletas pertinentes dependendo dos dados avaliados: para o esvaziamento, reconstrução e tempo de cirurgia incluímos as coletas do momento III; para o estágio clínico as coletas pré-operatórias (I e II); e para idade por ser uma característica intrínseca dos pacientes consideramos os momentos I, II e III. O momento IV não foi considerado por ser uma coleta onde a ISC já está instalada. Em geral, nenhuma significância foi atingida para nenhuma das variáveis tanto na avaliação da diversidade alfa como na beta. Isto, indica que pacientes com o mesmo estadiamento, tratamento, ou idade semelhantes não apresentaram uma microbiota diferente que pudesse facilitar o desenvolvimento de ISC em alguns indivíduos (**Apêndice 2**).

4.1.3.3 Bactérias: frequências e resultados estatísticos

Dos 194 gêneros presentes nas 172 amostras da cirurgia, apenas 12 tipos (6,2%) apresentaram uma frequência média acima de 1%, indicando que a microbiota oral é dominada por apenas alguns grupos bacterianos. Somando as frequências desses 12 gêneros, eles representaram cerca de 89% de todos os *reads*. Os demais 182 gêneros identificados tiveram frequências médias variando entre 0,0000576% e 0,98%. Percebe-se claramente na **Figura 14** a desigualdade entre os gêneros, com um claro predomínio de alguns poucos gêneros em relação aos demais. De modo similar, em um trabalho realizado por Sun et al.¹²³ foi observado que de 163 gêneros em amostras de língua, coletadas com *swabs*, as 15 mais abundantes (9,2%) representaram entre 70,2% e 82% de todos os *reads* em cada amostra. Isto, evidencia que apesar da grande quantidade de gêneros bacterianos na nossa boca, são muito poucos os predominam e representam a maior parte da massa de bactérias da cavidade oral, sendo neste estudo encontrado apenas 12 gêneros acima de 1% em um universo de 194. Pela maior frequência destes subtipos, acreditamos que estas são as bactérias que têm um efeito mais impactante na microbiota oral e assim, na cavidade oral. Bactérias em grande quantidade provavelmente ocupam os nichos ecológicos, controlando o estabelecimento e crescimento de outros micro-organismos, principalmente os que estão presentes em baixa frequência. No entanto, em eventos de disbiose, causados por intervenções, medicamentos ou outros, esta dinâmica pode ser alterada.

De acordo com Kuramitsu et al.¹²⁴, há 5 tipos de interações entre as bactérias da boca: 1-competição por nutrientes; 2-sinergismo (uma bactéria estimula o crescimento ou

sobrevivência de um ou mais subtipos); 3-antagonismo (uma bactéria que inibe o crescimento de outra); 4-neutralização de fatores virulentos de um micro-organismo por outro; 5- interferência nos mecanismos de sinalização dependentes para o crescimento de uma bactéria por outra. De modo geral, essas interações vão influenciar na frequência das bactérias encontradas em diversos ambientes, inclusive na cavidade oral. Já foi observado, por exemplo, que o ácido láctico produzido pela *Streptococcus mutans* pode ser metabolizado por membros da família da Veillonella, facilitando o crescimento desta¹²⁵. Por outro lado, *Streptococcus sanguinis* produz peróxido de hidrogênio que têm um efeito antagonista sob a *Porphyromonas gingivalis*, tendo vista uma correlação negativa entre essas duas bactérias¹²⁶. Provavelmente, as bactérias encontradas em maior quantidade neste estudo apresentam vantagens nas interações com as outras bactérias que facilitam seu crescimento e abundância.

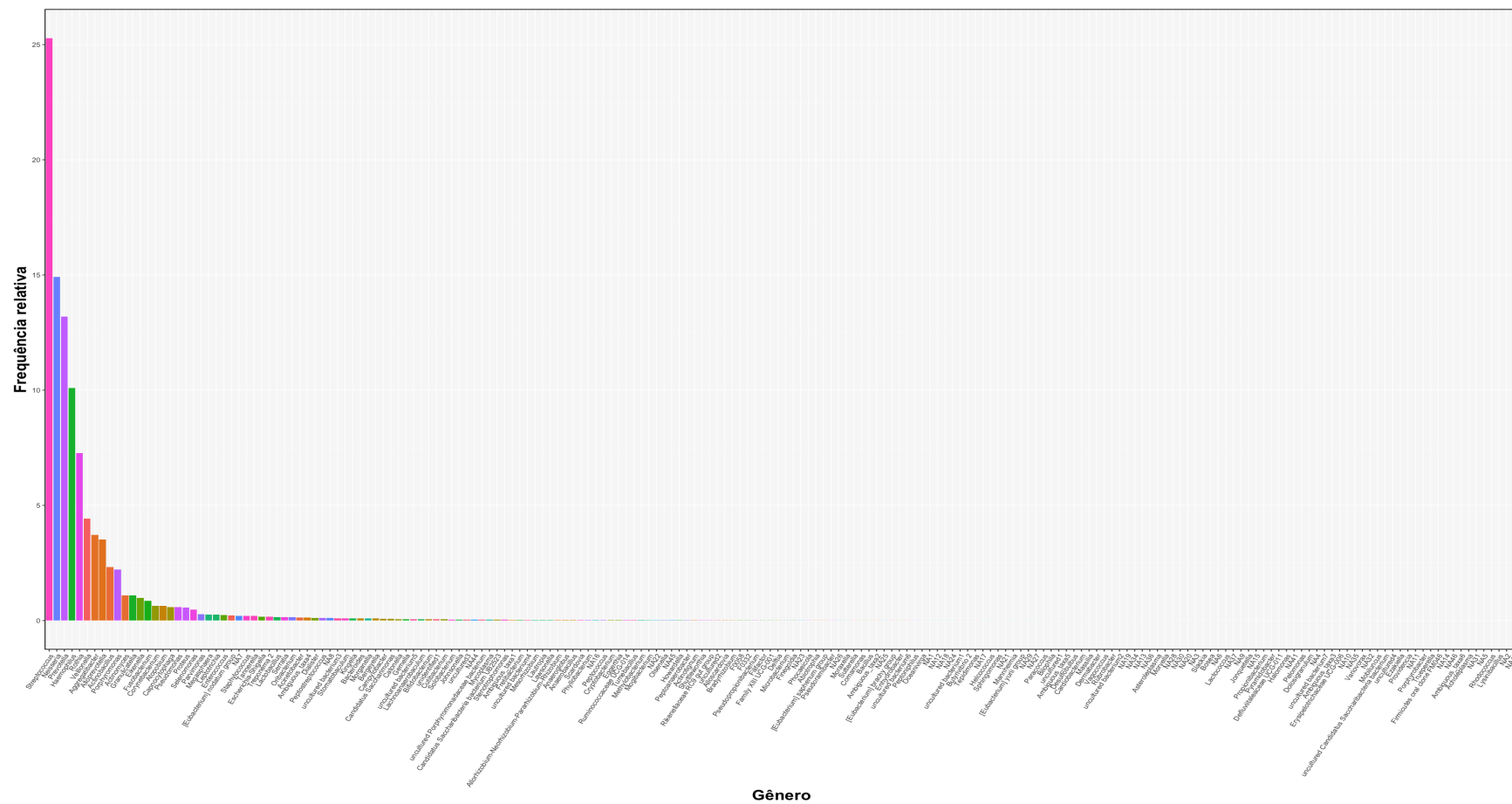


Figura 14 - Frequência relativa dos 194 gêneros bacterianos presentes nas 172 amostras do módulo I do estudo

Considerando o momento de coleta e os pacientes que desenvolveram ou não ISC, descrevemos na **Tabela 9** os 10 gêneros mais frequentes nas amostras. Não incluímos os outros gêneros na lista por apresentarem uma frequência muito baixa como discutido acima. De modo geral, observamos que as bactérias mais frequentes nos dois grupos (com e sem ISC) nos momentos I e II são praticamente as mesmas diferindo pouco as frequências. As bactérias mais comuns nestes momentos foram *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia* e *Neisseria*, estando estas também entre os gêneros mais frequentemente observados em pacientes com CB por Yang et al.¹²⁷. Comparando na coleta I as 10 bactérias mais abundantes, foi observada uma variação mínima, e apenas 1 gênero em cada grupo não estava entre os *top-10* do outro. Para os pacientes sem ISC a *Granulicatella* (10^o posição) que ocupou a 13^o posição entre os pacientes com ISC nesta coleta; para os pacientes com ISC a *Fusobacterium* (9^o posição) foi para a 11^o colocação nos pacientes que não tiveram ISC. Do mesmo modo, na coleta II só essas duas bactérias que diferiram entre os pacientes que tiveram ou não dentre os gêneros mais frequentes; todavia, neste momento foi visto uma maior quantidade de *Granulicatella* em pacientes que tiveram ISC, e *Fusobacterium* nos que não tiveram ISC no pós-operatório, indicando uma leve mudança no perfil, porém sugerindo que de modo geral as bactérias mais predominantes em ambos os grupos são similares no pré-operatório.

Por outro lado, na coleta III uma modificação na composição bacteriana é mais evidente. Nos pacientes sem ISC foi observado que da coleta II para a III, 4 bactérias antes dentre as abundantes (*Rothia*, *Veillonella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* – soma igual a 18,94% de todos os gêneros), reduziram drasticamente em quantidade na coleta III somando apenas 2,51% dos gêneros, enquanto que a *Eikenella*, *Aggregatibacter*, *Pseudomonas* e *Proteus* aumentaram, passando a ocupar a lista dos mais frequentes. Em contrapartida, na coleta IV parece que aos poucos a microbiota bacteriana foi ficando similar ao que era antes da cirurgia. Embora tenha havido o surgimento de duas novas bactérias, *Corynebacterium* e NA7 (gênero desconhecido da família Enterobacteriaceae) que ficaram na posição 9^o e 10^o na tabela, *Rothia* e *Veillonella* voltaram a fazer parte das bactérias mais frequentes representando juntas 15,26% dos gêneros, o que sugere que pacientes que não desenvolvem ISC tenderam a iniciar um processo de restabelecimento da microbiota oral após 5 dias da cirurgia, no qual o perfil bacteriano começa a se assemelhar com o padrão observado antes da operação. Este achado corrobora Hauser et

al.⁸⁹ que notou que com 6 semanas após a cirurgia de rinossinusite crônica a microbiota dos pacientes volta a ter o mesmo perfil do pré-operatório.

Tabela 9 - Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com a coleta e pacientes que tiveram ou não infecção do sítio cirúrgico.

Top 10	Não teve ISC		Teve ISC	
	Gênero	Frequência (%)	Gênero	Frequência (%)
Coleta I				
1º	<i>Streptococcus</i>	31,93	<i>Streptococcus</i>	39,6
2º	<i>Prevotella</i>	12,23	<i>Neisseria</i>	13,84
3º	<i>Rothia</i>	11,56	<i>Prevotella</i>	9,03
4º	<i>Neisseria</i>	9,62	<i>Rothia</i>	7,34
5º	<i>Haemophilus</i>	8,94	<i>Veillonella</i>	6,02
6º	<i>Veillonella</i>	7,84	<i>Haemophilus</i>	5,62
7º	<i>Actinobacillus</i>	3,31	<i>Porphyromonas</i>	2,85
8º	<i>Porphyromonas</i>	2,19	<i>Alloprevotella</i>	2,64
9º	<i>Alloprevotella</i>	1,95	<i>Fusobacterium</i>	1,74
10º	<i>Granulicatella</i>	1,31	<i>Actinobacillus</i>	1,44
Coleta II				
1º	<i>Streptococcus</i>	38,58	<i>Streptococcus</i>	29,33
2º	<i>Prevotella</i>	9,78	<i>Rothia</i>	12,05
3º	<i>Rothia</i>	9,04	<i>Prevotella</i>	11,04
4º	<i>Neisseria</i>	8,55	<i>Haemophilus</i>	10,83
5º	<i>Haemophilus</i>	7,36	<i>Neisseria</i>	8,55
6º	<i>Veillonella</i>	5,83	<i>Actinobacillus</i>	5,39
7º	<i>Actinobacillus</i>	4,15	<i>Veillonella</i>	4,91
8º	<i>Alloprevotella</i>	2,52	<i>Alloprevotella</i>	3,95
9º	<i>Porphyromonas</i>	2,15	<i>Granulicatella</i>	2,14
10º	<i>Fusobacterium</i>	1,92	<i>Porphyromonas</i>	1,94
Coleta III				
1º	<i>Haemophilus</i>	18,61	<i>Neisseria</i>	26,8
2º	<i>Streptococcus</i>	16,97	<i>Prevotella</i>	18,84
3º	<i>Prevotella</i>	15,40	<i>Aggregatibacter</i>	14,26
4º	<i>Neisseria</i>	14,78	<i>Streptococcus</i>	11,33
5º	<i>Alloprevotella</i>	5,46	<i>Haemophilus</i>	10,74
6º	<i>Eikenella</i>	3,62	<i>Alloprevotella</i>	6,00
7º	<i>Aggregatibacter</i>	3,07	<i>Porphyromonas</i>	3,47
8º	<i>Pseudomonas</i>	2,57	<i>Veillonella</i>	2,18
9º	<i>Proteus</i>	2,47	<i>Acinetobacter</i>	1,02
10º	<i>Actinobacillus</i>	2,43	<i>Eikenella</i>	0,72
Coleta IV				
1º	<i>Neisseria</i>	26,87	<i>Prevotella</i>	31,69
2º	<i>Streptococcus</i>	20,10	<i>Streptococcus</i>	7,71
3º	<i>Rothia</i>	11,77	<i>Aggregatibacter</i>	7,48
4º	<i>Prevotella</i>	8,91	<i>Porphyromonas</i>	7,48
5º	<i>Haemophilus</i>	7,28	<i>Neisseria</i>	6,26
6º	<i>Aggregatibacter</i>	3,80	<i>Veillonella</i>	4,69
7º	<i>Veillonella</i>	3,49	<i>Atopobium</i>	3,23
8º	<i>Alloprevotella</i>	3,40	<i>Staphylococcus</i>	2,82
9º	<i>Corynebacterium</i>	1,54	<i>Alloprevotella</i>	2,64
10º	NA7	1,20	<i>Haemophilus</i>	2,64

ISC: infecção do sítio cirúrgico.

Nos pacientes que tiveram ISC, dentre as bactérias mais frequentes, foi observado que de modo semelhante aos sem ISC houve uma diminuição na quantidade de *Rothia* da coleta II para III, e além disso de *Actinobacillus* e *Granulicatella* (somavam antes 19,58% e ficaram com 0,65% na coleta III); e houve o aumento da *Eikenella*, *Aggregatibacter* e *Acinetobacter*. Porém, ao contrário do que foi observado nos pacientes sem ISC, nenhuma das 3 bactérias da tabela que foram reduzidas com a cirurgia (*Rothia*, *Actinobacillus* e *Granulicatella*) tornaram a ficar dentre as mais comuns no momento da ISC (IV). Em vez

disso, a *Staphylococcus* que é conhecidamente uma bactéria associada a presença de ISC foi incluída na lista junto com a *Atopium*, sugerindo que com a ocorrência da ISC a composição bacteriana tende a mudar ainda mais. Além disso, comparando os gêneros da coleta I e IV desses pacientes, apenas 6 das 10 bactérias mais comuns são as mesmas, e mesmo assim suas frequências são bem diferentes. *Streptococcus*, por exemplo, que tinha na primeira coleta uma frequência de 39,6%, na coleta IV dos pacientes com ISC ficou com apenas 7,71%. Estes resultados sugerem que no momento IV, diferentemente dos pacientes sem ISC, os com infecção apresentaram um padrão bacteriano ainda mais diferente do observado no pré-operatório ao menos em relação as bactérias mais comuns. Isto condiz com a própria condição da infecção onde há o desarranjo da microbiota que impossibilita o restabelecimento do seu perfil pré-cirúrgico.

Para avaliar mais detalhadamente a flutuação das bactérias ao longo das coletas, selecionamos todos os gêneros descritos na **Tabela 9** (20 no total) e através dos gráficos de perfis na **Figura 15** observamos como cada uma dessas bactérias se comportou ao longo de cada momento. Bactérias como a *Actinobacillus*, *Rothia* e *Veillonella* diminuíram drasticamente com a cirurgia enquanto outras como a *Eikenella*, *Pseudomonas* e *Proteus* tiveram um aumento importante independente do grupo (com ou sem ISC). Ainda, outros casos ocorreram como a *Porphyromonas* que aumentou após a cirurgia nos pacientes com ISC à medida que diminuiu nos sem ISC. Por fim, *Staphylococcus* cresceu no grupo com ISC após a cirurgia, e naqueles sem ISC sua presença só foi detectada após a cirurgia (momento III) diminuindo logo em seguida. Tudo isto indica que grandes mudanças na microbiota da cavidade oral são decorrentes da cirurgia, e são essas alterações que parecem ser responsáveis pelo desenvolvimento da ISC no momento IV.

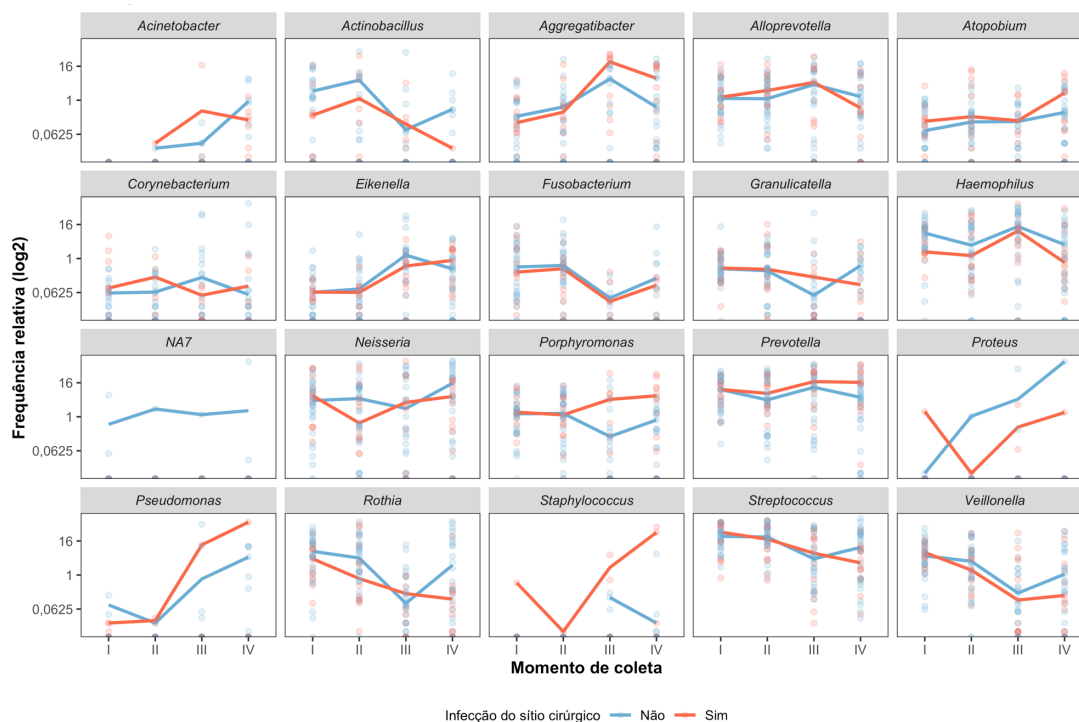


Figura 15 - Gráfico de perfil da frequência relativa (log2) dos gêneros mais abundantes ao longo das coletas (I a IV) de acordo com a presença da infecção do sítio cirúrgico (linha contínua representa mediana).

Além disso, considerando apenas as frequências das bactérias entre as coletas I e II, pouco parece mudar de modo geral, tanto para os pacientes que teriam como não ISC. Isto indica que há uma estabilidade da microbiota e sua quantidade entre esses dois momentos no qual nenhum tratamento foi iniciado, recordando que houve um espaço de cerca de 29 dias entre essas duas coletas. Esse achado é semelhante ao já relatado por outros autores¹²⁸⁻¹³⁰, no qual reportaram que a variabilidade temporal entre coletas do mesmo indivíduo tende a ser mínima, seja estas coletas realizadas com um período de 24h de diferença ou um ano. Todavia, esta estabilidade pode ser quebrada na mudança de algum hábito como a dieta ou na presença de um agente agressor a saúde como, por exemplo, uma infecção, que é o que acontece no presente estudo com a intervenção cirúrgica e ocorrência de ISC. Porém, como não houve nenhum evento importante entre as coletas I e II a abundância das bactérias foi equivalente.

Na análise de associação, consideramos todos os gêneros em cada ponto de coleta e denotamos as diferenças significativas entre os pacientes que tiveram ou não ISC (**Figura 16**). Em todas as coletas houve predominância de algumas bactérias nos dois ou em um dos dois grupos da variável de interesse. Comparando linearmente as coletas, o número de bactérias diferencialmente presentes entre os grupos foi aumentando das coletas I a IV.

Neste sentido destaca-se principalmente o aumento, do momento I para o III, no número de gêneros mais abundantes nos pacientes que desenvolveram ISC na coleta IV em relação aos que não tiveram infecção, passando de uma diferença de apenas 2 gêneros para 6. Isto reforça que a cirurgia parece ocasionar uma disbiose oral relevante, que talvez possa predispor à ISC.

Observamos que para a maioria das bactérias com abundância significativa nas coletas I a III, não houve diferença no momento IV que é quando a infecção está instalada. *Aggregatibacter*, *Catonella* e *Solobacterium*, por exemplo, só aparecem com destaque na coleta III. Estes resultados indicam que as bactérias que podem estar envolvidas na ISC atuam efetivamente no seu surgimento; porém, a presença delas leva a uma disbiose que aparentemente facilita o desbalanço (crescimento ou redução) de outros tipos microbianos, e por tal motivo no momento da ISC elas não estão mais em abundância. Em vez disso, elas abrem espaço para o aumento de outras bactérias como a *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Mogibacterium*. Esta explicação condiz com o conceito já estabelecido de que para as bactérias viverem harmonicamente é necessário haver equilíbrio entre elas. Uma vez que este equilíbrio é rompido toda a comunidade microbiana é afetada e as próprias bactérias (por exemplo, a *Aggregatibacter* neste caso) que podem ter causado a infecção podem na presença ou agravamento da ISC ajudar no posterior crescimento de outras bactérias que serão antagônicas a elas, contribuindo na manutenção ou agravamento do status inflamatório^{66,67}.

De modo particular, observamos que a bactéria *Morganella* aparece aumentada em todas as coletas dos pacientes com ISC em relação aos sem infecção o que poderia sugerir uma participação importante na ISC. Porém, em uma análise mais detalhada desta bactéria observamos que sua frequência de modo geral é extremamente baixa, o que dificulta na consolidação de um modelo onde ela possa ter um papel central. Considerando todos os pontos de coletas, a *Morganella* não apareceu em nenhuma das amostras dos pacientes sem ISC, e foi detectada em apenas 3 pacientes que desenvolveram ISC (variando de 0,02% a 15%). Esta baixa ocorrência dessa bactéria faz com que seja improvável que apenas sua presença seja mandatória para a ISC. Eventualmente, ela pode ter colaborado para a infecção nestes 3 pacientes, porém devido a sua baixa frequência, nenhuma conclusão quanto a isso pode ser tomada.

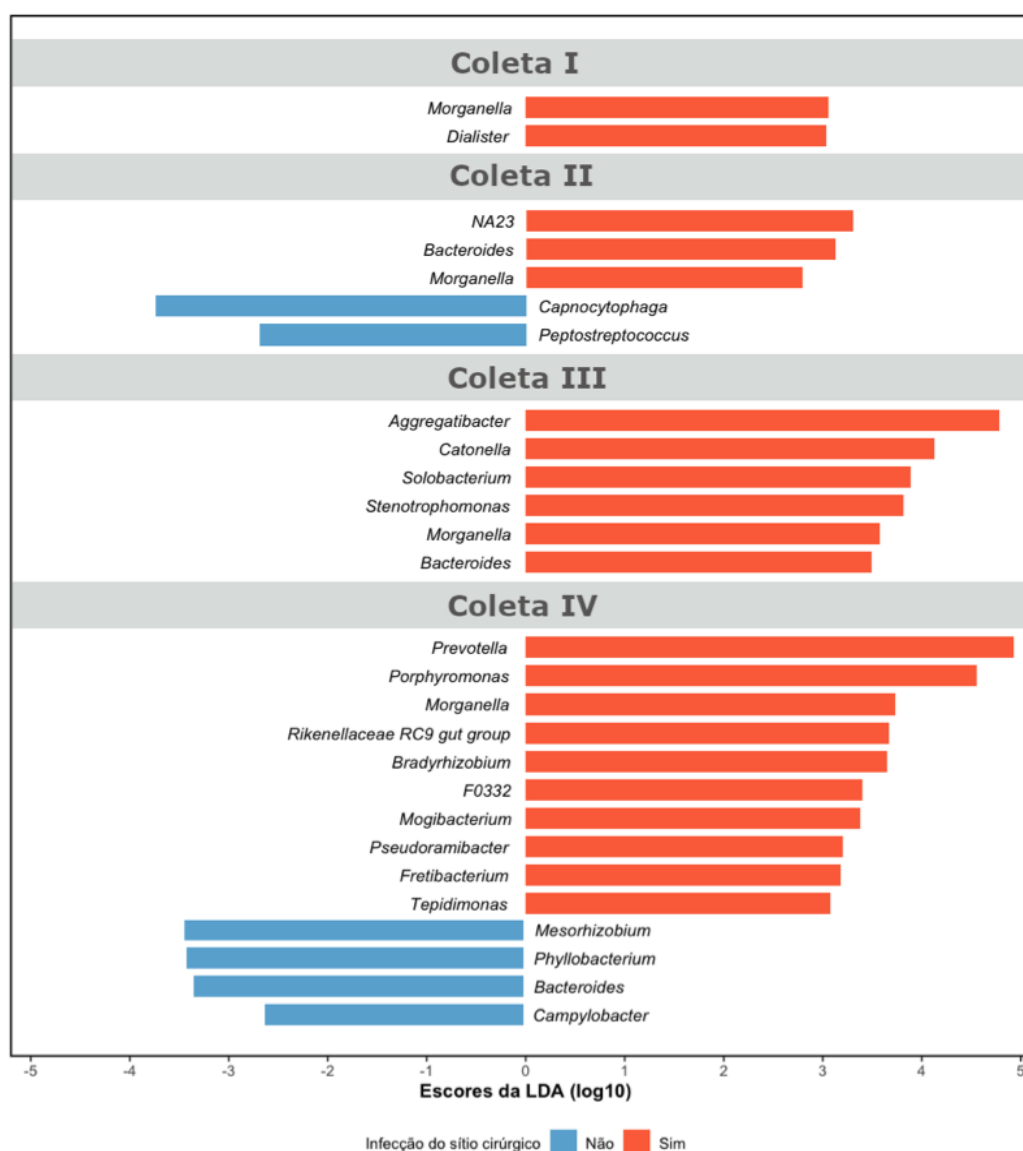


Figura 16 - Gêneros bacterianos com diferente abundância entre os pacientes com e sem infecção do sítio cirúrgico em cada momento da coleta de acordo com escores da LDA (log10) (teste não paramétrico U de Mann-Whitney). Legenda: Bactéria NA23 é um gênero desconhecido da família Neisseriaceae.

No momento da ISC observamos 10 bactérias mais abundantes nos pacientes com ISC: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Morganella*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Bradyrhizobium*, F0332 (família Actinomycetaceae), *Mogibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Fretibacterium* e *Tepidimonas*. Em particular, *Prevotella* e *Porphyromonas* se destacaram por somarem em conjunto quase 40% dos *reads* encontrados nos pacientes infectados contra 9,45% nos sem ISC. Elas foram comuns nos pacientes com ISC, estando a *Prevotella* presente em todos os casos, e a *Porphyromonas* só não encontrada em 4 pacientes. O restante dos 8 gêneros associados à ISC representou apenas 0,89% das sequências. *Prevotella* e *Porphyromonas* são conhecidas por serem gêneros virulentos que possuem:

1-fatores de adesão ao tecido (como, polissacarídeo capsular, fimbriae e hemaglutinina); 2-exoenzimas que causam danos teciduais (proteases, collagenase, hialuronidase, fibrinolisisina, e gelatinase); e 3-fatores que impedem a sua fagocitose (cápsula e proteases de imunoglobulina IgM e IgG). Todas essas características exacerbam o quadro de ISC, dificultam a cicatrização tecidual, e já foram anteriormente associadas à infecção de feridas¹³¹⁻¹³³.

Em relação às outras 8 bactérias, por terem tido uma frequência tão baixa na ISC (0,89%) é difícil estimar seu real papel na ISC. Possivelmente, o crescimento de algumas delas podem ter ocorrido devido ao aumento da *Prevotella* e *Porphyromonas* que facilitaram o seu crescimento. Por exemplo, já foi relatado que há uma correlação positiva entre a *Prevotella buccae* e a *Pseudoramibacter alactolyticus* em canais radiculares infectados com abscesso apical agudo.¹³⁴ De modo similar, o mesmo ocorre com *Porphyromonas gingivalis* e *Fretibacterium* sp. HOT 360 já foram associadas com a doença periodontal e aumento de profundidade de sondagem, indicando que pode haver uma relação sinérgica entre essas duas bactérias.¹³⁵ Por outro lado, igual observamos na *Morganella*, em geral a frequência dessas 8 bactérias variou muito entre os pacientes, e segundo Zaura et al.⁷⁸, bactérias que variam muito entre indivíduos podem ser devido certos hábitos individuais. Assim como discutido em relação a *Morganella*, talvez algumas dessas bactérias tenham tido um papel relevante na ISC em algum indivíduo, porém devido à baixa e inconstante presença desses gêneros, não podemos afirmar isto.

Do mesmo modo, as bactérias mais abundantes na coleta IV em pacientes sem infecção em relação aos com (*Bacteroides*, *Campylobacter*, *Mesorhizobium* e *Phyllobacterium*), representaram apenas 0,62% dos gêneros destas amostras. Por esta ser uma baixa porcentagem, e também ter uma frequência variável em cada paciente (*Bacteroides*, por exemplo, apareceu em apenas 2 pacientes dos 31 que não desenvolveram ISC), isto sugere que essas bactérias não atuam como protetoras nos pacientes sem ISC, por exemplo, mas provavelmente são flutuações devido a hábitos dos pacientes ou bactérias que foram eventualmente importantes nos casos pontuais em que elas apareceram, mas quando considerado todos os pacientes sua real importância na infecção gera dúvidas. Assim, em conclusão, pelos nossos resultados as bactérias que prevalecem de modo consistente no momento da ISC são a *Prevotella* e *Porphyromonas* que estiveram presentes em praticamente todos os pacientes com ISC e em alta

frequência. Não postulamos que estas bactérias sejam a causa primária ou inicial da ocorrência da ISC uma vez que elas não predominaram no momento III (antes da infecção). Todavia, uma disbiose causada por bactérias que predominaram na coleta III (*Aggregatibacter*, por exemplo), e seriam a causa inicial da infecção, pode ter facilitado o crescimento de *Prevotella* e *Porphyromonas* que como uma consequência ou causa secundária levaram ao posterior desenvolvimento da ISC. Mais adiante, no modelo de regressão logística, este conceito será aprofundado.

As bactérias comumente associadas à ISC, através de culturas, como a *Pseudomonas* e *Staphylococcus*^{32,34,38} não foram associadas à infecção neste trabalho, apesar que na **Figura 14** foi observado um aumento dessas bactérias na coleta III e IV nos pacientes com ISC em comparação aos sem. Provavelmente o aumento dessas bactérias devem ter ocorrido em apenas alguns casos pontuais, e por isso nenhuma diferença foi observada na análise de associação. Além disso, deve-se levar em conta que na cultura bacteriana o resultado é a nível de espécie, e não gênero. Considerando que um gênero pode incluir diversas espécies, o fato de termos analisado somente a nível de gênero as bactérias também pode ocultar resultados que só são vistos a nível de espécie, uma vez que são as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* comumente presentes na ISC. Infelizmente, como apenas 3% das bactérias foram identificadas a nível de espécie neste estudo não pudemos fazer esta análise.

Para avaliar se alguma bactéria pode ser usada para identificar pacientes com maior chance de ter ISC, usamos um modelo de regressão logística incluindo todas as bactérias observadas nas coletas pré-cirúrgicas (coletas I, II, III). A **Tabela 10** mostra o resultado obtido para os 10 gêneros mais frequentes considerando todas as coletas. Nenhuma bactéria atingiu significância nas coletas pré-operatórias (I e II) indicado que não é possível identificar pacientes com maior chance de ISC antes da cirurgia, usando a metodologia aqui empregada. Na coleta III, por outro lado, *Aggregatibacter* mostrou-se promissora. Observamos que a cada aumento de 1% na frequência desta bactéria há um aumento correspondente de 10% mais chances para ISC ($p=0,012$). Para estimar melhor o impacto da *Aggregatibacter* na ISC agrupamos a sua com base no ponto de corte gerado pela curva ROC no qual foi obtido uma sensibilidade e especificidade de 0,77 e 0,63, respectivamente. Ela foi subdividida em: frequência até 0,044% ($n=20$; 50%) ou acima de 0,044% ($n=20$; 50%). Através da regressão logística observamos que pacientes que apresentam mais de 0,044%

de *Aggregatibacter* em sua microbiota no período que segue a cirurgia (até 5 dias) apresentam uma chance 5,67 maior de desenvolver ISC, quando comparados a aqueles que apresentam uma frequência abaixo desta ($p=0,024$; IC: 1,25-25,60). Isso sugere que esta bactéria é um potencial indicador de pacientes em risco de infecção e que medidas visando a sua redução no momento pós-cirúrgico talvez possam contribuir para prevenir infecção.

Tabela 10 - Modelo de regressão logística dos 10 gêneros mais frequentes em relação ao momento de coleta e presença de infecção do sítio cirúrgico.

Gênero	Coleta	ISC	Média (DP)	Mediana (min-max)	OR	IC 95%	Valor de p^1
<i>Actinobacillus</i>	I	Não	2,91 (5,12)	0,44 (0,00-18,10)	0,943	0,80-1,11	0,467
		Sim	1,70 (4,67)	0,01 (0,00-16,83)			
	II	Não	2,93 (9,70)	0,00 (0,00-53,10)	1,01	0,95-1,07	0,781
		Sim	3,79 (9,95)	0,01 (0,00-37,20)			
	III	Não	0,06 (0,15)	0,00 (0,00-0,73)	0,95	0,79-1,15	0,618
		Sim	4,25 (13,41)	0,00 (0,00-48,70)			
<i>Aggregatibacter</i>	I	Não	0,62 (1,23)	0,05 (0,00-4,68)	1,04	0,62-1,72	0,896
		Sim	0,67 (1,42)	0,13 (0,00-5,19)			
	II	Não	1,48 (5,05)	0,03 (0,00-27,58)	1,02	0,90-1,15	0,783
		Sim	1,92 (5,01)	0,15 (0,00-18,55)			
	III	Não	2,87 (5,50)	0,00 (0,00-17,40)	1,10	1,02-1,18	0,012*
		Sim	14,86 (17,24)	1,43 (0,00-42,90)			
<i>Alloprevotella</i>	I	Não	2,41 (2,98)	1,16 (0,03-12,13)	1,10	0,93-1,30	0,268
		Sim	3,88 (5,38)	1,28 (0,16-18,40)			
	II	Não	3,30 (5,55)	1,13 (0,02-29,26)	1,04	0,93-1,16	0,536
		Sim	4,38 (5,21)	2,22 (0,04-18,17)			
	III	Não	5,42 (8,08)	0,97 (0,00-32,63)	1,02	0,94-1,10	0,663
		Sim	6,40 (10,16)	2,05 (0,00-35,00)			
<i>Haemophilus</i>	I	Não	9,85 (9,88)	7,88 (0,00-40,59)	0,92	0,82-1,03	0,130
		Sim	5,15 (5,23)	1,72 (0,21-15,60)			
	II	Não	8,17 (12,52)	1,63 (0,00-50,50)	1,01	0,97-1,06	0,606
		Sim	10,32 (14,55)	1,26 (0,06-40,70)			
	III	Não	18,16 (23,22)	9,13 (0,00-85,43)	0,99	0,96-1,02	0,536
		Sim	15,98 (18,80)	9,76 (0,00-64,70)			
<i>Neisseria</i>	I	Não	8,68 (12,92)	3,05 (0,00-48,20)	1,02	0,98-1,06	0,369
		Sim	13,17 (18,75)	5,56 (0,13-52,70)			
	II	Não	8,37 (14,80)	3,53 (0,00-75,50)	1,00	0,97-1,04	0,837
		Sim	9,42 (19,10)	0,47 (0,00-60,00)			
	III	Não	10,34 (19,16)	0,33 (0,00-64,63)	1,00	0,97-1,03	0,862
		Sim	14,31 (26,58)	3,23 (0,00-94,20)			
<i>Porphyromonas</i>	I	Não	2,30 (3,02)	1,24 (0,00-12,30)	1,06	0,87-1,29	0,575
		Sim	2,89 (3,56)	1,45 (0,12-11,08)			
	II	Não	2,86 (3,43)	1,21 (0,00-12,53)	0,97	0,80-1,18	0,762
		Sim	2,53 (3,38)	1,00 (0,00-12,25)			
	III	Não	3,09 (7,61)	0,03 (0,00-33,90)	1,07	0,96-1,21	0,230
		Sim	0,86 (1,68)	0,00 (0,00-4,56)			
<i>Prevotella</i>	I	Não	12,69 (12,38)	9,14 (0,11-41,95)	0,99	0,93-1,05	0,642
		Sim	10,98 (8,08)	9,25 (0,64-29,11)			
	II	Não	11,33 (14,30)	3,96 (0,03-50,30)	1,00	0,95-1,05	0,975
		Sim	11,20 (11,27)	7,64 (0,48-34,30)			
	III	Não	18,70 (19,73)	11,68 (0,07-74,37)	1,00	0,97-1,04	0,808
		Sim	18,08 (22,15)	5,08 (0,00-64,62)			
<i>Rothia</i>	I	Não	11,08 (12,20)	5,57 (0,00-48,10)	0,95	0,88-1,03	0,216
		Sim	6,30 (8,26)	3,75 (0,10-30,20)			
	II	Não	11,03 (17,37)	3,47 (0,00-77,77)	1,00	0,97-1,04	0,967
		Sim	11,27 (20,51)	0,87 (0,01-63,25)			
	III	Não	0,94 (2,66)	0,07 (0,00-11,81)	0,62	0,17-2,30	0,470
		Sim	0,29 (0,53)	0,04 (0,00-1,85)			
<i>Streptococcus</i>	I	Não	29,90 (23,03)	23,40 (1,92-73,40)	1,01	0,98-1,04	0,571
		Sim	34,55 (29,16)	32,99 (0,79-74,80)			
	II	Não	31,45 (25,15)	22,18 (0,76-85,10)	0,99	0,97-1,02	0,581
		Sim	26,98 (26,38)	18,93 (0,65-84,40)			
	III	Não	14,17 (18,67)	3,74 (0,14-56,30)	1,00	0,96-1,04	0,888
		Sim	9,33 (13,60)	3,77 (0,02-41,30)			
<i>Veillonella</i>	I	Não	8,15 (10,00)	4,79 (0,06-45,90)	0,98	0,91-1,07	0,694
		Sim	7,01 (5,24)	6,30 (1,13-17,30)			
	II	Não	6,56 (8,94)	2,70 (0,00-30,10)	0,99	0,91-1,06	0,701
		Sim	5,47 (9,03)	1,50 (0,08-29,50)			
	III	Não	0,90 (1,91)	0,11 (0,00-8,91)	1,10	0,94-1,27	0,225
		Sim	3,93 (9,24)	0,01 (0,00-30,78)			

DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; OR: odds ratio

O *Aggregatibacter* é um patógeno oportunista que já foi relacionado com diversas doenças e infecções como a diabetes, doença de Alzheimer, doença periodontal, endocardite, osteomielite, meningite, abscesso cerebral, espondilodiscite e pneumonia¹³⁶⁻¹⁴¹. Segundo Fine et al.¹⁴², na doença periodontal esta bactéria anaeróbica facultativa é uma das primeiras colonizadoras por resistir ao oxigênio e peróxido de hidrogênio; porém, após sua instalação e liberação de fatores patogênicos, ela é frequentemente substituída por anaeróbios mais restritos. Ela possui diversos mecanismos virulentos que, de modo importante para nosso estudo, promove o crescimento de outras espécies resultando em um ambiente disbiótico e suscetível à infecção em um processo de sucessão onde talvez as bactérias que vimos predominar no momento da infecção se beneficiem. Estes mecanismos incluem¹⁴³: 1- capacidade de invadir tecidos epiteliais; 2- produzir citotoxinas que matam leucócitos e impedem a proliferação de células epiteliais; 3- ter resistência sérica que é a habilidade dessa bactéria penetrar na corrente sanguínea e evadir o sistema imune do hospedeiro; e 4- secretar vesículas extracelulares que a protegem da fagocitose assim como permitem o transporte de fatores virulentos para outros tecidos que não haja presença de *Aggregatibacter*.

No nosso estudo observamos que a presença da *Aggregatibacter* em uma quantidade acima de 0,044% aumenta em 5,67 vezes a chance de o paciente desenvolver ISC, isto sugere que a presença desta bactéria no momento pós-cirúrgico imediato, facilite o desenvolvimento e instalação de ISC nos dias seguintes. Todavia, no momento da infecção (momento IV) esta bactéria tem sua importância reduzida, e hipotetizamos que ela altera o microambiente deixando-o mais propício para o crescimento de *Prevotella* e *Porphyromonas*. Estas duas, por outro lado, são bactérias anaeróbicas obrigatórias que juntamente com a *Aggregatibacter*, mais especificamente da espécie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, por exemplo, já foram associadas a pacientes com doença periodontal severa¹⁴⁴. Baseado no fato que a *Aggregatibacter*, segundo os relatos, apresenta uma maior importância no início de um processo de disbiose, e então cria condições para o crescimento de outros tipos bacterianos em especial as anaeróbicas mais restritivas, acreditamos que no presente trabalho esta bactéria foi necessária para o surgimento da ISC, uma vez que ela possibilitou o crescimento de outras bactérias como a *Prevotella* e *Porphyromonas* que foram uma causa secundária à infecção uma vez que predominaram no momento desta complicação.

Tendo estabelecido a importância da *Aggregatibacter* no desenvolvimento da ISC, isso vai possibilitar intervenções precoces em pacientes que apresentam a mesma aumentada já nos primeiros dias do pós-operatório como, por exemplo, estender a administração de antibióticos profiláticos por mais tempo, ou se necessário trocar por um outro antibiótico que seja mais adequado para o combate a este agente infeccioso. De qualquer modo este tipo de abordagem vai permitir que o paciente não desenvolva mais ISC, e consequentemente vai diminuir: o tempo de internação, despesas médicas, resultados estéticos insatisfatórios e perda funcional^{22,25,26}.

Ao nosso conhecimento apenas um estudo prévio⁹⁰ tentou identificar, através da microbiota, os pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos à cirurgia com maior risco de ter ISC. De modo similar ao nosso, estes autores observaram que parece ser possível identificar pacientes com maior risco de desenvolver ISC a partir do 3º dia; porém, os seus resultados foram limitados uma vez que só avaliaram o crescimento de poucas espécies bacterianas (13), e só consideraram o número de bactérias que cresceram, independente do seu tipo. Em contrapartida, no presente estudo, através do sequenciamento, foi possível identificar flutuações de bactérias específicas antes e após a cirurgia, e como essas podem estar associadas com o desenvolvimento de ISC. Além do mais, a identificação dos subtipos bacterianos é importante não só para entender melhor a composição do microambiente, mas também saber como tratar pacientes com maior risco de desenvolver ISC.

Limitações deste trabalho incluíram o pequeno número de pacientes que impossibilitou fazer análises estatísticas mais detalhadas como o modelo de regressão logística múltipla, por exemplo. Por outro lado, com este N foi feita uma série de coletas (172 amostras) que possibilitaram uma análise extensa dos dados de metagenômica, que traçou o perfil microbiano antes e pós a cirurgia, ajudando a entender o impacto que este tratamento tem na microbiota bacteriana, e permitiu a identificação de uma bactéria que tem potencial para servir como indicadora de pacientes com maior risco de desenvolver ISC.

4.2 MÓDULO II: MUCOSITE ORAL

4.2.1 Dados Clínicos

4.2.1.1 Caracterização dos dados clínicos

Quarenta e oito pacientes foram inicialmente incluídos neste módulo do estudo. Três pacientes foram excluídos por apresentarem sinais de evolução da doença durante a radio-quimioterapia, levando à suspensão do tratamento. Um paciente foi excluído por ter recebido regime distinto de radioterapia (2D). Assim, 44 pacientes (91,7%) permaneceram no estudo, sendo que 21 destes (47,7%) também fizeram parte do estudo de ISC.

Os dados clínicos são descritos na **Tabela 11**. A idade média foi de 60,3 anos, com prevalência de homens (68,2%) e histórico de uso de tabaco (56,8% de fumantes ou ex-fumantes e consumo médio de 23 cigarros por dia durante 38 anos). De modo similar, a maioria dos etilistas/ex-etilistas bebeu/bebia durante 37 anos. A diabetes *mellitus* (n=8; 18,2%) foi uma comorbidade frequente e o local mais comum do tumor foi a língua, ressaltando que um paciente com o tumor em três locais distintos (língua, mucosa jugal e gengiva). A maioria dos casos tinha estágio avançado da doença, justificando a radio/quimioterapia adjuvante. Destaca-se que para avaliar o estadiamento consideramos o estágio patológico uma vez que todos os pacientes já tinham sido operados com laudo disponível. Em relação ao tamanho do tumor a maioria foi classificado como T3 (n=14; 31,8%) seguido de T4 (n=13; 29,5%), T2 (n=12; 27,3%) e T1 (n=5; 11,4%). Metade dos casos apresentou metástase linfonodal.

A maioria dos pacientes reportou nunca ter usado prótese oral (n=32; 72,7%) enquanto 11 (25,0%) usavam ou já tinham usado e em 1 caso não foi informado (2,3%). No exame clínico observamos que 9 pacientes eram edêntulos (20,4%), enquanto os dentados tinham em média 19 dentes. Na avaliação do CPO-D 3 pacientes não puderam ser examinados, tendo uma média de 20,3 para os outros 41. E em relação ao exame periodontal, o exame não foi feito em 5 pacientes e os 9 desdentados não participaram, somando um total de 30 pacientes que participaram desta avaliação com uma média de NIC de 2,2mm.

Tabela 11 - Dados clínicos gerais dos 44 pacientes submetidos à radioterapia associada ou não à quimioterapia.

Parâmetros	n	%
Sexo		
Masculino	30	68,2
Feminino	14	31,8
Cor da pele		
Branco	28	63,6
Parda	12	27,3
Preto	4	9,1
Atendimento		
SUS	20	45,5
Convênio	24	54,5
Alfabetizado		
Sim	44	100,0
Não	0	0,0
Fumante		
Não	19	43,2
Sim	10	22,7
Ex-fumante	15	34,1
Etilista		
Não	12	27,3
Sim	26	59,1
Ex-etilista	6	13,6
Comorbidade		
Não	9	20,5
Sim	35	79,5
Local do tumor		
Língua	21	45,7
Assoalho oral	6	13,0
Mucosa jugal/região retromolar	11	23,9
Gengiva	3	6,5
Palato duro	4	8,7
Lábio inferior	1	2,2
Estágio patológico		
I	2	4,5
II	8	18,2
III	9	20,5
IV	25	56,8

Os pacientes receberam acima de 60Gy (60-70Gy), exceto por um que foi submetido a 36Gy total. Este mesmo paciente foi submetido a três sessões por semana, enquanto o restante fez 5 vezes por semana durante 5-6 semanas. A maioria dos pacientes (86,4%) apresentou MO em algum grau até a última coleta. O grau III foi o mais prevalente tanto para a classificação da OMS como do NCI (n=19; 43,2% e n=29; 65,9%, respectivamente). Pela classificação da OMS, observamos ainda 12 casos como grau II (27,2%) e 8 casos de grau IV (18,2%), respectivamente. Por outro lado, na classificação do NCI tivemos 9 casos de grau II (20,4%) e apenas 1 caso de grau IV (2,3%) (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Dados de tratamento radio-quimioterápico dos 44 pacientes avaliados no módulo II.

Parâmetros	n	%
Grupo de tratamento		
A	31	70,5
B	6	13,6
C	7	15,9
Técnica de radioterapia		
IMRT	24	54,5
3D	20	45,5
Abridor de boca		
Não	12	27,3
Sim	32	72,7
Mucosite oral		
Não	6	13,6
Sim	38	86,4

A: radioterapia exclusiva; B: radioterapia + quimioterapia com cisplatina 100mg/m², 21 em 21 dias, 3 ciclos; C: radioterapia + quimioterapia com cisplatina até 50mg - dose cheia semanal, sendo 5/6 ciclos.

As frequências encontradas foram semelhantes às observadas na primeira parte do estudo e na literatura^{114–116}, com a maioria dos pacientes de sexo masculino, acima de 60 anos e com histórico de fumo e/ou etilismo. A língua foi o local mais acometido e a maioria dos casos foi diagnosticada com estágio patológico avançado. A maior parte dos pacientes foi submetida a um tratamento radioterápico adjuvante exclusivo (sem quimioterapia), e durante as coletas a maioria dos pacientes desenvolveram algum grau de MO (86,4%), corroborando outros trabalhos^{49,50}.

4.2.1.2 Análise estatística dos dados clínicos

As mesmas categorizações usadas no estudo da cirurgia para a variável de cor da pele (branco - n=28; 63,6% e não branco - n=16; 36,4%), grau de ensino (até ensino médio incompleto - n=15; 34,1% e ensino médio completo e superior - n=29; 65,9%), tamanho do tumor (T1/T2 - n=17; 38,6% e T3/T4 - n=27; 61,64) e estadiamento (I/II - n=10; 22,7% e III/IV - n=34; 77,3%) foram implementadas para a radioterapia. O grupo de tratamento foi agrupado como radioterapia exclusiva (A, n=31; 70,5%) e radioterapia associada a quimioterapia (B/C, n=13; 29,5%). E como houve apenas 5 casos sem MO contra 39 esta variável foi categorizada de acordo com sua gradação em: MO ausente ou leve para os casos grau 0-II, e severa para grau III- IV. Deste modo, baseado na gradação da OMS e NCI, respectivamente, classificamos 17 (38,6%) e 14 (31,8%) casos como ausente/leve contra 27 (61,4%) e 30 (68,2%) casos como MO severa.

Para analisar a concordância entre as duas gradações da mucosite (OMS e NCI) fizemos um teste kappa, atingindo um coeficiente de 0,653 que indica uma forte concordância ($p < 0,001$). Assim, embora de forma geral todas as análises neste estudo (tantos as clínicas como os resultados de PCR em tempo real e metagenômica) tenham sido feitas usando ambas classificações, devido aos resultados similares e boa concordância, decidimos discutir os resultados usando a classificação da OMS. Esta foi escolhida por ser: i) a mais usual na literatura; ii) a gradação padrão usada no serviço de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center e iii) sua distribuição ter sido mais equilibrada em nossa casuística, quando comparada com NCI (OMS com 17 casos ausentes/leves e 27 severos contra NCI com 14 ausentes/leves e 30 severos).

Observamos que o maior número de lesões de MO em boca foi associado à mucosite severa (**Tabela 13 e 14** - $p < 0,001$). Este resultado está dentro do esperado visto que quanto mais lesões em boca é esperado que o paciente tenha mais dificuldade para comer ou beber, tendo consequentemente um pior grau de MO de acordo com a classificação da OMS. A análise de regressão logística não foi feita para esta variável por ela já envolver a ocorrência da mucosite. Para as outras variáveis (clínicas e de tratamento) relacionadas nenhuma significância foi observada tanto na análise de associação como na regressão.

Tabela 13 - Análise das variáveis clínicas em relação ao grau de mucosite oral (OMS).

Variáveis	Mucosite oral (OMS)		Valor de <i>p</i> ¹	OR	IC 95%	Valor de <i>p</i> ²
	Ausente/Leve	Severa				
Qualitativas						
Sexo						
Masculino	14 (82,4%)	16 (59,3%)	0,204 ^b	3,21	0,74-13,9	0,119
Feminino	3 (17,6%)	1 (40,7%)				
Cor da pele						
Branco	10 (58,8%)	18 (66,7%)	0,838 ^b	0,71	0,20-2,50	0,599
Não branco	7 (41,2%)	9 (33,3%)				
Atendimento						
SUS	9 (52,9%)	11 (40,7%)	0,631 ^b	1,64	0,48-5,56	0,430
Convênio	8 (47,1%)	16 (59,3%)				
Grau de ensino						
Até ensino médio incompleto	7 (41,2%)	8 (29,6%)	0,645 ^b	1,66	0,47-5,92	0,433
Ensino médio completo e incompleto	10 (58,8%)	19 (70,4%)				
Fumante						
Não	5 (29,4%)	14 (51,9%)	0,338 ^b	0,36	0,07-1,78	0,209
Sim	5 (29,4%)	5 (18,5%)				
Ex-fumante	7 (41,2%)	8 (29,6%)				
Etilista						
Não	4 (23,5%)	8 (29,6%)	0,104 ^a	0,10	0,01-1,17	0,067
Sim	8 (47,1%)	18 (66,7%)				
Ex-etilista	5 (29,4%)	1 (3,7%)				
Comorbidade						
Não	4 (23,5%)	5 (18,5%)	0,716 ^a	1,35	0,31-5,96	0,689
Sim	13 (76,5%)	22 (81,5%)				
Diabetes <i>mellitus</i>						
Não	14 (82,4%)	22 (81,5%)	0,999 ^a	1,06	0,22-5,15	0,942
Sim	3 (17,6%)	5 (18,5%)				
Tamanho do tumor						
T1/T2	4 (23,5%)	13 (48,1%)	0,188 ^b	0,33	0,09-1,28	0,109
T3/T4	13 (76,5%)	14 (51,9%)				
Metástase linfonodal						
N0	7 (41,2%)	15 (55,6%)	0,536 ^b	0,560	0,16-1,91	0,355
N1/N2/N3	10 (58,8%)	12 (44,4%)				
Estágio patológico						
I/II	3 (17,6%)	7 (25,9%)	0,716 ^a	0,61	0,14-2,79	0,526
III/IV	14 (8,4%)	20 (74,1%)				
Quantitativas						
Idade						
Média (DP)	60,6 (13,7)	60,2 (11,4)	0,644	1,00	0,95-1,05	0,898
Mediana (min-max)	61,5 (25,9-78,8)	64,0 (35,0-8)				
Número de dentes						
Média (DP)	12,35 (9,3)	16,74 (10,5)	0,124 ^c	1,04	0,98-1,11	0,165
Mediana (min-max)	15,0 (0-28)	22,0 (10,5)				
CPO-D [†]						
Média (DP)	20,0 (8,1)	20,5 (6,6)	0,989 ^c	1,01	0,92-1,11	0,813
Mediana (min-max)	21,0 (2-28)	19,5 (3-28)				
NIC [‡]						
Média (DP)	2,1 (0,8)	2,2 (1,7)	0,621 ^c	1,06	0,61-1,85	0,830
Mediana (min-max)	1,9 (1,3-3,4)	1,79 (1-9)				

¹: Teste de independência; ²: Modelo de regressão logística simples; ^a: Teste exato de Fisher; ^b: Teste de Qui-quadrado com correção de continuidade; ^c: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney; [†]: Pacientes sem esta informação foram excluídos; ^{*}: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; min: mínimo; max: máximo; OR: odds ratio.

Tabela 14 - Análise das variáveis relacionadas à radioterapia e número de lesões de mucosite em relação ao grau de mucosite oral (OMS).

Variáveis	Mucosite oral (OMS)		Valor de <i>p</i> ¹	OR	IC 95%	Valor de <i>p</i> ²
	Ausente/Leve	Severa				
Qualitativas						
Grupo de tratamento						
A	12 (70,6%)	19 (70,4%)	0,999 ^b	1,01	0,27-3,82	0,988
B ou C	5 (29,4%)	8 (29,6%)				
Técnica de radioterapia						
IMRT	8 (47,1%)	16 (59,3%)	0,631 ^b	0,61	0,18-2,08	0,430
3D	9 (52,9%)	11 (40,7%)				
Abridor de boca						
Não	7 (41,2%)	5 (18,5%)	0,164 ^a	3,08	0,78-12,12	0,107
Sim	10 (58,8%)	22 (81,5%)				
Quantitativas						
Número de lesões de mucosite						
Média (DP)	1,2 (1,2)	3,2 (1,2)	<0,001 ^{c,*}	NA		
Mediana (min-max)	1,0 (0-4)	3,0 (1-5)				

¹: Teste de independência; ²: Modelo de regressão logística simples; ^a: Teste exato de Fisher; ^b: Teste de Qui-quadrado com correção de continuidade; ^c: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; min: mínimo; max: máximo; NA: não aplicável; OR: *odds ratio*.

4.2.1.3 Dados das amostras coletadas

Para esta parte do estudo coletamos 199 amostras, com uma média de 4,5 coletas por paciente. Nenhuma coleta foi perdida. Quatorze pacientes (31,8%) já apresentavam MO desde a coleta #6, enquanto para os demais (n=30; 68,2%) a mucosite foi presente na coleta #7. As coletas I e V foram realizadas em média 118 e 15 dias, respectivamente, antes do início da radioterapia (dia R0), destacando que as coletas I só foram realizadas nos pacientes que participaram de ambos os estudos (parte I e II). De modo geral, a coleta V foi realizada no dia do planejamento da radioterapia, e as amostras dos pontos VI e VII foram coletadas, respectivamente, em média 10 dias (equivalente à 7^a sessão) e 36 dias (equivalente a 23^a sessão) após o início da radioterapia (**Figura 17**).

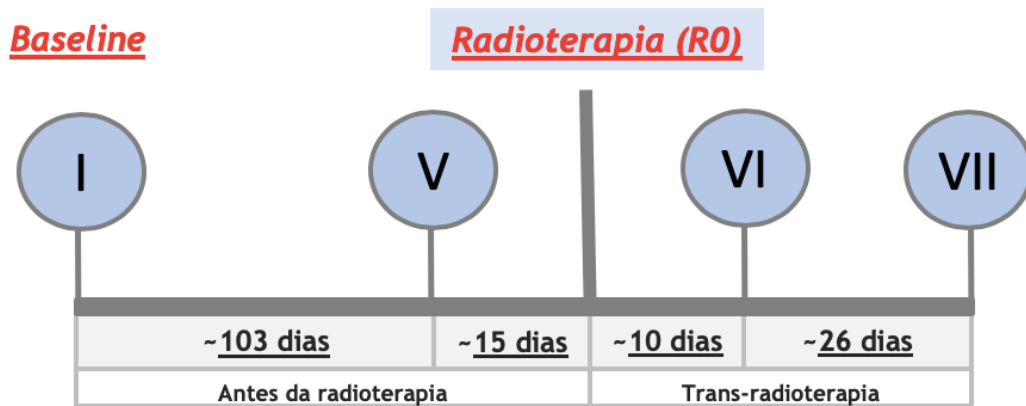


Figura 17 - Descrição da média de dias entre os momentos de coletas (I, V-VII) de acordo com o dia da primeira sessão de radioterapia (R0).

A **Figura 18** descreve o momento das coletas de cada paciente. Em relação aos 21 pacientes incluídos nas duas partes do estudo, dois destes (#47 e #62) não tiveram a coleta I. No primeiro caso esta coleta não foi realizada (primeira coleta foi no momento II) e no segundo caso não foi passado um *swab* em regiões que comumente desenvolvem mucosite (mucosa jugal, borda de língua e mucosa labial), mas apenas um *swab* ao redor do tumor. Como não sabemos se a microbiota altera dependendo da região coletada não incluímos esta amostra nesta segunda parte do estudo. Assim, embora estes pacientes terem participado da cirurgia e radioterapia no estudo, a primeira coleta deles na figura abaixo é no momento V. O paciente submetido à radioterapia de 36Gy, 3x/semana (paciente #11) teve tempo de coleta menor do que o dos demais.

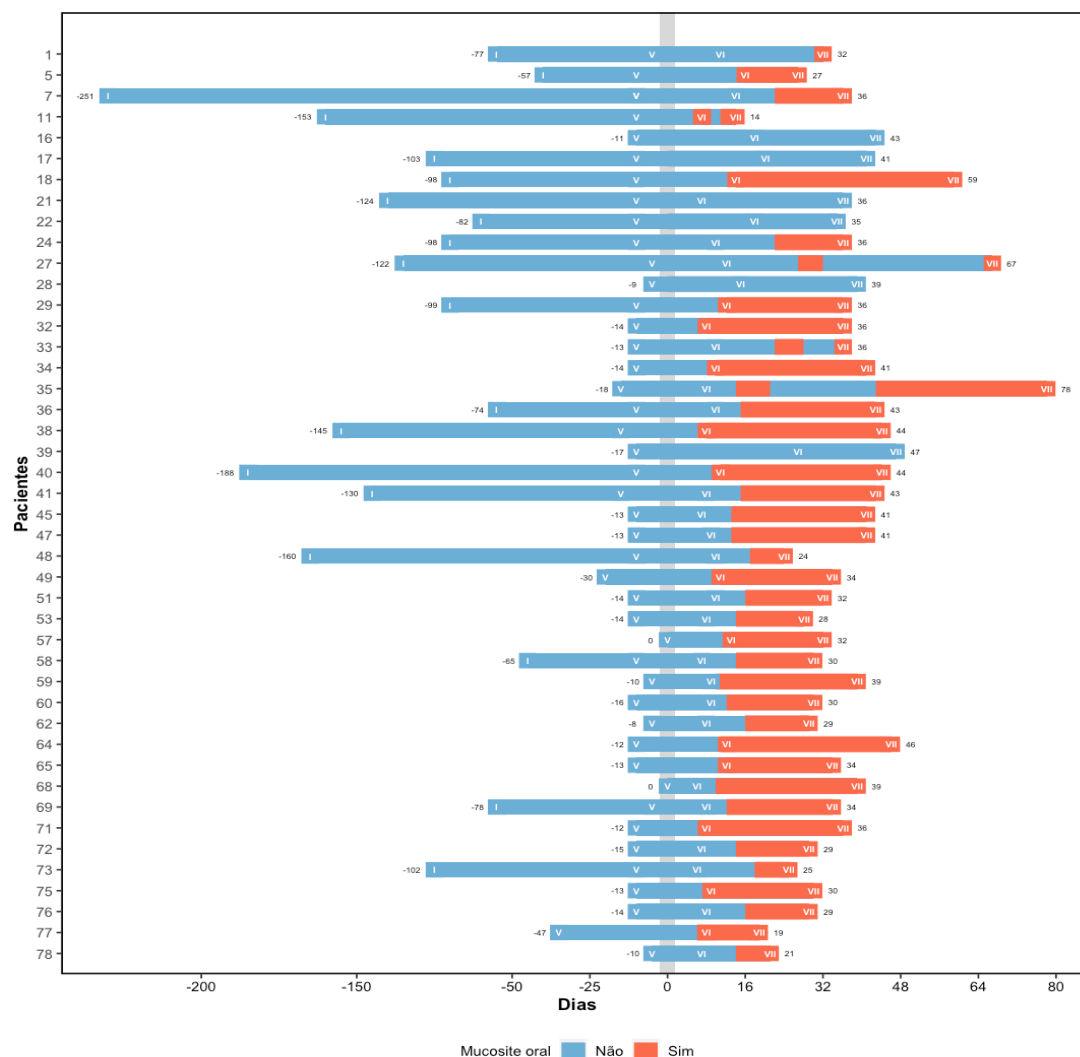


Figura 18 - Descrição das coletas de cada paciente de acordo com o dia da primeira sessão de radioterapia (R0). Os números I, V, VI e VII nas barras são em relação as coletas, e a cor azul e alaranjada são referentes aos dias sem e com mucosite oral, respectivamente.

4.2.2 Análise quantitativa das bactérias por PCR em tempo real

A avaliação da quantidade de bactérias, usando PCR em tempo real, foi feita para todas as 199 amostras do estudo. Para analisar a relação entre as coletas da radioterapia e os C_Ts dos alvos de interesse, incluímos as amostras dos pontos (V a VII) de todos os 44 pacientes. Não incluímos a coleta I para esta análise de dependência pois apenas 19 (43,2%) tinham esta coleta. No caso de presença de MO no momento da coleta utilizamos apenas as amostras obtidas diretamente das lesões de MO. As amostras de controle (regiões sem MO) foram comparadas mais adiante com os *swabs* coletados da MO.

Na **Tabela 15** podemos observar uma diferença significativa entre o 16S-V1 e a razão de beta-actina/16S-rDNA em relação ao momento das coletas ($p=0,002$ para ambos).

Nos dois casos notamos que a maior diferença ocorreu entre as coletas V (pré-radioterapia) e VII (cerca da 23ª sessão da radioterapia), indicando que a radioterapia leva a uma diminuição na quantidade de DNA bacteriano (em ambos $p=0,001$). Possivelmente isso ocorre como consequência da própria radiação ionizante que além de atingir o epitélio, também destrói as bactérias.

Tabela 15 - Avaliação do CT em relação ao gene-alvo e momento de coleta do estudo da mucosite oral.

Momento	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p^1
Cr do 16S-V1				
V	44	19,74 (2,33)	19,64 (16,23-26,41)	0,002*
VI	44	20,03 (2,22)	19,96 (15,81-25,78)	
VII	44	20,97 (2,46)	21,02 (15,90-26,23)	
Cr da beta-actina				
V	44	27,81 (1,55)	27,90 (25,00-32,87)	0,274
VI	44	27,58 (1,37)	27,72 (24,92-30,37)	
VII	44	27,48 (1,32)	27,62 (25,18-29,93)	
Razão dos Crs (beta-actina/16S-V1)				
V	44	1,42 (0,15)	1,40 (1,13-1,73)	0,002*
VI	44	1,39 (0,14)	1,39 (1,08-1,69)	
VII	44	1,33 (0,15)	1,30 (1,06-1,62)	

¹: Teste não paramétrico de Friedman; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; min: mínimo; max: máximo

A avaliação bacteriana quantitativa, analisada conforme o grau de MO, mostra haver uma tendência para maior quantidade bacteriana (maior proliferação e menor morte de bactérias pela radiação ionizante), e menor presença de DNA humano (células em descamação capturadas pelos *swabs*) para os pacientes com MO ausente/leve, embora nenhuma significância tenha sido atingida (**Figura 19A**). Em contrapartida, exatamente o oposto ocorreu com os pacientes que desenvolveram mucosite severa (**Figura 19B**), no qual o CT bacteriano aumentou da coleta V até VII, sugerindo uma diminuição na quantidade de bactérias com a radioterapia, sendo a diferença significativa entre a coleta V e VII ($p<0,001$). E, nas razões entre os CTs foi observado que o aumento do CT bacteriano levou a uma diminuição da razão entre o DNA humano/bacteriano durante a radioterapia ($p<0,001$). Em resumo, pacientes que tiveram uma MO severa tiveram uma diminuição na quantidade de bactérias ao longo da radioterapia, enquanto os com mucosite leve/ausente tiveram uma tendência a aumentar ou manter o número de bactérias.

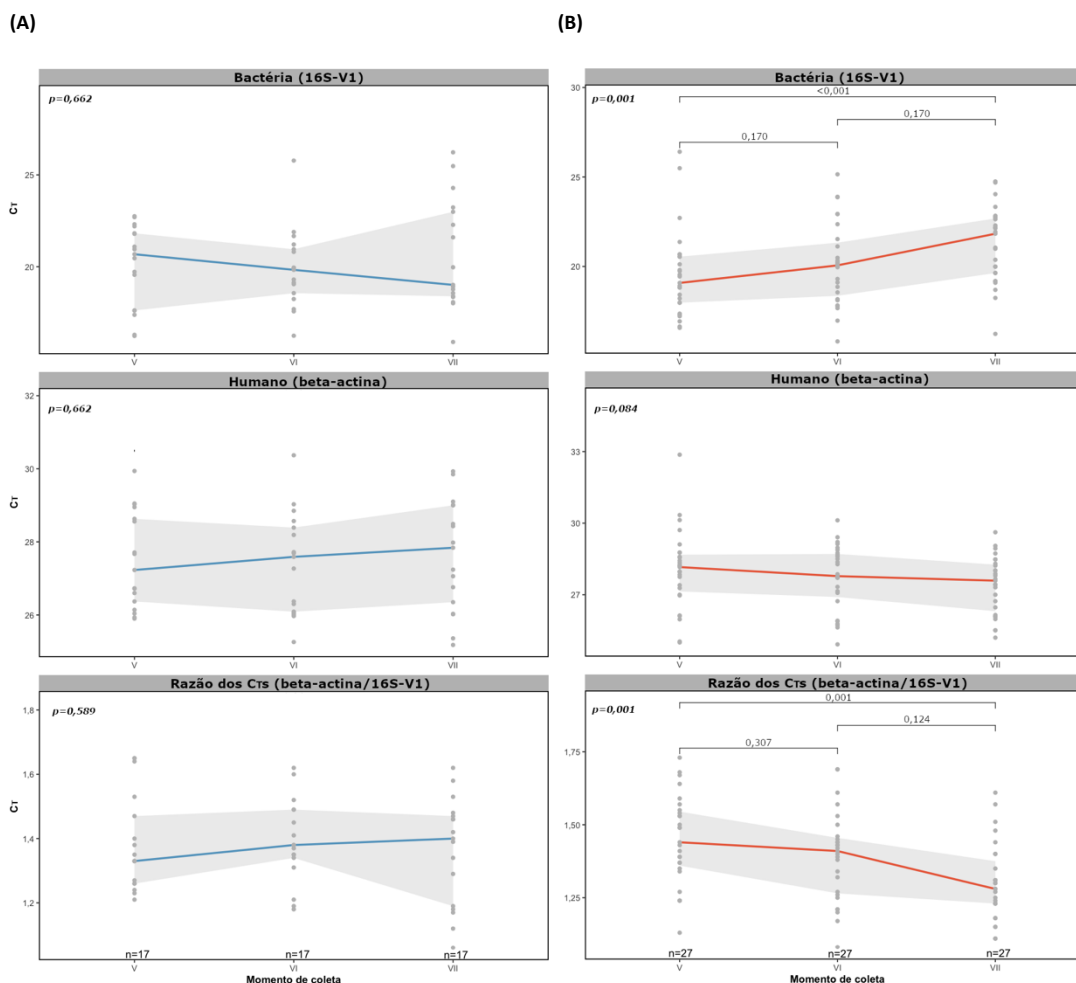


Figura 19 - Gráfico de perfil dos Cts (bacteriano, humano e sua relação) conforme o momento da coleta (V a VII) estratificado por mucosite oral (OMS) (A, linhas em azul – ausente/leve) e (B, linhas em vermelho - severa) (linha contínua representa a mediana e região sombreada o percentil 25 e 75; teste não paramétrico de Friedman).

Este resultado não está de acordo com Otmani¹⁴⁵ que reportou que pacientes com perda de integridade da mucosa oral são mais propensos a terem infecções bacterianas ou fúngicas. Por outro lado, nosso resultado indica que pacientes que desenvolvem MO severa apresentam na radioterapia uma diminuição na quantidade de DNA bacteriano, e não necessariamente uma menor quantidade de tipos bacterianos (isso só pode ser avaliado no sequenciamento através da diversidade). De modo geral, este achado sugere que pacientes propensos à MO severa apresentam uma diminuição linear na quantidade de bactérias ao longo da radioterapia que pode ser devido à radiação aniquilando bactérias que consequentemente levam a um pior grau de MO.

A avaliação estatística da MO ausente/leve e severa em relação aos Cts (bacteriano e humano) pode ser vista na **Tabela 16**. Para o momento VI incluímos apenas os pacientes

que ainda não tinham lesões neste momento (n=30), para observar se no modelo de regressão logística esta coleta pode ser usada como indicadora de pacientes com maior risco de ter MO severa. Para o 16S-V1 não foi observado nenhuma associação entre os grupos (MO ausente/leve ou severa), porém em relação à beta-actina foi visto que no momento VI (cerca da 7ª sessão de radioterapia) pacientes que desenvolveram MO severa até o fim da radioterapia apresentavam nesta coleta uma menor quantidade de DNA humano do que os pacientes que teriam apenas uma mucosite ausente/leve. Além disso, a chance de um paciente ter uma mucosite severa aumentou em 2,47 vezes (OR: 2,47; IC: 1,08-5,66) a cada aumento de um CT humano. Isto sugere que quanto menos DNA humano presente nas primeiras sessões, maior é a chance de um paciente ter uma mucosite grau III e IV (OMS).

Uma possível explicação é que pacientes que desenvolveriam MO severa apresentavam já nas primeiras sessões de radioterapia um sistema imune mais debilitado (menos células imunes na cavidade oral) que de alguma maneira poderiam ajudar na proteção do epitélio evitando ou reduzindo a ocorrência da MO. Em relato prévio⁵⁹, por exemplo, a mucosite já foi associada com a diabetes *mellitus* que é conhecida por ser uma doença com um sistema imunológico suprimido. Isto indica que o desenvolvimento da MO pode ser mais grave em pacientes imunologicamente comprometidos e talvez a menor recuperação de DNA humano no presente estudo esteja associado a uma menor quantidade de células de defesa do organismo. Todavia, experimentos mais aprofundados para identificar especificamente quais células diminuem como a radioterapia são necessários para testar esta hipótese.

Tabela 16 - Avaliação do Ct em relação ao gene-alvo, momentos de coletas e de acordo com a severidade da mucosite oral (OMS).

Momento da coleta	Mucosite oral (OMS)	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p^1	OR	IC 95%	Valor de p^2
CT do 16S-V1								
I	Ausente/leve	9	18,94 (2,58)	19,20 (13,73-23,07)	0,870	1,19	0,72-1,96	0,496
	Severa	10	19,56 (1,30)	19,02 (18,12-22,37)				
V	Ausente/leve	17	20,07 (2,25)	20,68 (16,23-22,75)	0,197	0,90	0,69-1,18	0,453
	Severa	27	19,53 (2,40)	19,08 (16,57-26,41)				
VI	Ausente/leve	15	19,48 (1,65)	19,30 (16,24-21,89)	0,967	1,00	0,66-1,50	0,981
	Severa	15	19,47 (1,94)	19,96 (15,81-22,93)				
VII	Ausente/leve	17	20,59 (3,00)	19,01 (15,90-26,23)	0,242			
	Severa	27	21,21 (2,09)	21,83 (16,23-24,75)				
CT da beta-actina								
I	Ausente/leve	9	27,63 (1,82)	27,19 (25,76-31,36)	0,462	1,14	0,61-2,13	0,675
	Severa	10	27,92 (1,25)	27,79 (26,25-30,28)				
V	Ausente/leve	17	27,48 (1,31)	27,23 (25,90-29,94)	0,283	1,28	0,83-1,96	0,261
	Severa	27	28,02 (1,66)	28,16 (25,00-32,87)				
VI	Ausente/leve	15	27,29 (1,20)	27,59 (25,26-29,03)	0,029*	2,47	1,08-5,66	0,033*
	Severa	15	28,20 (0,79)	28,37 (26,73-29,21)				
VII	Ausente/leve	17	27,62 (1,52)	27,84 (25,18-29,93)	0,588			
	Severa	27	27,39 (1,20)	27,58 (25,20-29,62)				
Razão dos Cts (beta-actina/16S-V1)								
I	Ausente/leve	9	1,48 (0,24)	1,45 (1,15-1,98)	0,744	0,98	0,93-1,04	0,518
	Severa	10	1,43 (0,11)	1,43 (1,23-1,59)				
V	Ausente/leve	17	1,38 (0,15)	1,33 (1,21-1,65)	0,112	1,03	0,99-1,08	0,171
	Severa	27	1,45 (0,15)	1,44 (1,13-1,73)				
VI	Ausente/leve	15	1,41 (0,12)	1,38 (1,19-1,62)	0,254	1,03	0,97-1,09	0,296
	Severa	15	1,46 (0,15)	1,44 (1,21-1,69)				
VII	Ausente/leve	17	1,36 (0,17)	1,40 (1,06-1,62)	0,201			
	Severa	27	1,30 (0,13)	1,28 (1,11-1,61)				

¹: Teste não paramétrico U de Mann-Whitney; ²: Modelo de regressão logística simples; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; min: mínimo; max: máximo; OR: odds ratio.

Quando avaliamos se haveria diferenças entre 16S-V1 e beta-actina entre as amostras coletadas de regiões sem mucosite (controle) das com mucosite nenhuma diferença foi observada no momento VI (**Tabela 17**), o que indica que independente da área coletada, a quantidade de DNA bacteriano ou humano não é diferente no início da radioterapia. Em contraste, no momento VII houve uma menor quantidade de DNA bacteriano na coleta da mucosite do que no controle, sendo devido a isso também observado uma diferença na razão dos Cts ($p=0,001$) (**Tabela 18**). Este resultado pode sugerir que a radiação, como já vimos em análise prévia, ao atingir tecidos-alvos também destrói as bactérias aí presentes de modo que ao final da radioterapia, estas regiões, que são as que desenvolvem MO, terão uma menor quantidade de bactérias do que as áreas que não foram atingidas. Assim, no terço final da radioterapia (aproximadamente 23^o

sessão), e por conseguinte no momento do pior grau da mucosite, a nível de Ct, faz diferença o local onde é feito a coleta de amostra.

Tabela 17 - Avaliação do Ct em relação ao *swab* controle e de mucosite do momento VI.

<i>Swab</i> - coleta VI	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de <i>p</i> ¹
Ct do 16S-V1				
Controle	14	20,40 (1,99)	20,26 (17,47-24,68)	0,177
Mucosite	14	21,21 (2,67)	20,22 (17,67-25,78)	
Ct da beta-actina				
Controle	14	26,94 (1,52)	26,40 (24,94-30,00)	0,331
Mucosite	14	27,23 (1,82)	26,67 (24,92-30,37)	
Razão dos Cts (beta-actina/16S-V1)				
Controle	14	1,33 (0,08)	1,30 (1,19-1,49)	0,198
Mucosite	14	1,29 (0,11)	1,29 (1,08-1,45)	

¹: Teste não paramétrico de Wilcoxon; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; min: mínimo; max: máximo

Tabela 18 - Avaliação do Ct em relação ao *swab* controle e de mucosite do momento VII.

<i>Swab</i> - coleta VII	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p ¹
Cr do 16S-V1				
Controle	34	20,60 (2,45)	20,30 (16,45-25,55)	0,005*
Mucosite	34	21,58 (2,26)	22,05 (18,01-26,23)	
Cr da beta-actina				
Controle	34	28,14 (1,58)	28,19 (25,54-31,89)	0,242
Mucosite	34	27,73 (1,19)	27,82 (25,20-29,93)	
Razão dos Cts (beta-actina/16S-V1)				
Controle	34	1,38 (0,14)	1,38 (1,14-1,74)	0,001*
Mucosite	34	1,30 (0,14)	1,28 (1,06-1,62)	

¹: Teste não paramétrico de Wilcoxon; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; min: mínimo; max: máximo

4.2.3 Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene do 16S-rDNA

4.2.3.1 Resultado do processamento dos *reads*

Todas as 199 amostras foram amplificadas com sucesso e seguiram para o sequenciamento. Houve uma média de 72.662 *reads*/amostra (variando de 22.627 a 270.002), com cerca de 20.220 *reads*/amostra (5.156 a 59.551 *reads*) após o processamento. De modo semelhante ao observado na parte I do estudo, as amostras tenderam a saturar em torno de 6.000 *reads* (**Figura 20**). Quatro amostras (2,0%) ficaram um pouco abaixo de 6.000 *reads* (variando de 5.156 a 5.700 *reads*), mas observamos que todas atingiram saturação (**Figura 21**) sem ser necessário sequenciar estas amostras

novamente como feito para alguns casos na parte I do estudo. Assim, todas as 199 amostras seguiram para análise.

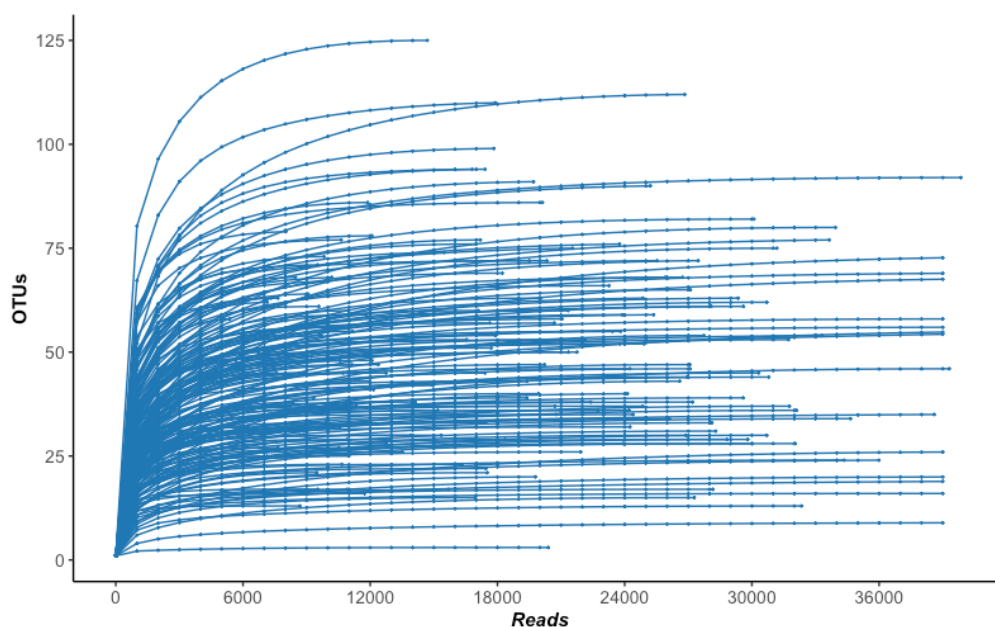


Figura 20 - Curva de saturação das 199 amostras sequenciadas do módulo II.

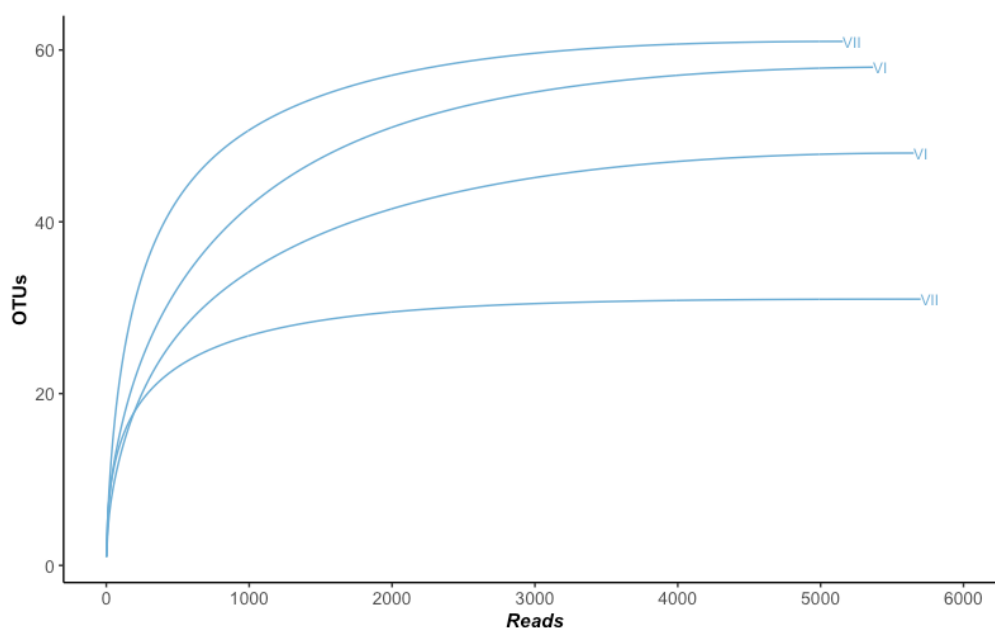


Figura 21 - Curva de saturação das 4 amostras com número de sequências abaixo de 6.000 reads (VI e VII são as coletas trans-radioterapia).

Nas análises iniciais, assim como feito na PCR em tempo real, para os momentos VI e VII só incluímos as amostras coletadas diretamente das lesões de MO. Os controles (n=48), coletados de outras regiões da boca sem MO, foram analisados posteriormente. Assim, nestes primeiros resultados, 151 amostras foram analisadas. Dentre estas,

foi observada uma diferença na composição bacteriana entre os grupos nos momentos V (Bray-Curtis, $p=0,024$; *unweighted* Unifrac, $p=0,041$), VI (*unweighted*; $p=0,002$) e VII (Bray-Curtis; $p=0,047$; *unweighted*; $p=0,032$) (**Figura 24**). Estes resultados sugerem que desde a coleta pré-radioterapia (momento V) as bactérias presentes na cavidade oral já são distintas entre os pacientes que vão ter um pior grau de MO, e isto aparentemente se mantém ao longo da radioterapia. Por outro lado, Zhu et al.¹⁰² observaram que em pacientes com câncer de nasofaringe submetidos à radioterapia a diversidade alfa tende a diminuir à medida que a MO vai progredindo, e a composição da microbiota só vai ficando diferente com a piora na MO. É importante considerar que este estudo foi realizado em um outro tipo de tumor, sendo as amostras coletadas de outra região (parede retrofaríngea) e com um outro sistema de gradação de mucosite (grupo de terapia por radiação em oncologia). Os nossos resultados indicam que pacientes diagnosticados com CB que fazem radioterapia quando desenvolvem MO severa apresentam uma maior diversidade, se comparados com aqueles com mucosite leve, além da composição de bactérias entre esses dois grupos ser diferente desde antes do começo do tratamento. De acordo com a diversidade alfa não foi possível identificar pacientes com maiores chances de terem MO severa nos momentos I a VI (**Tabela 19**), porém baseado na diferente composição da diversidade beta entre os grupos antes do início da radioterapia, temos indícios que talvez seja possível identificar pacientes com maior risco de terem MO severa antes do tratamento. Isto vai ser explorado mais adiante a nível de gênero.

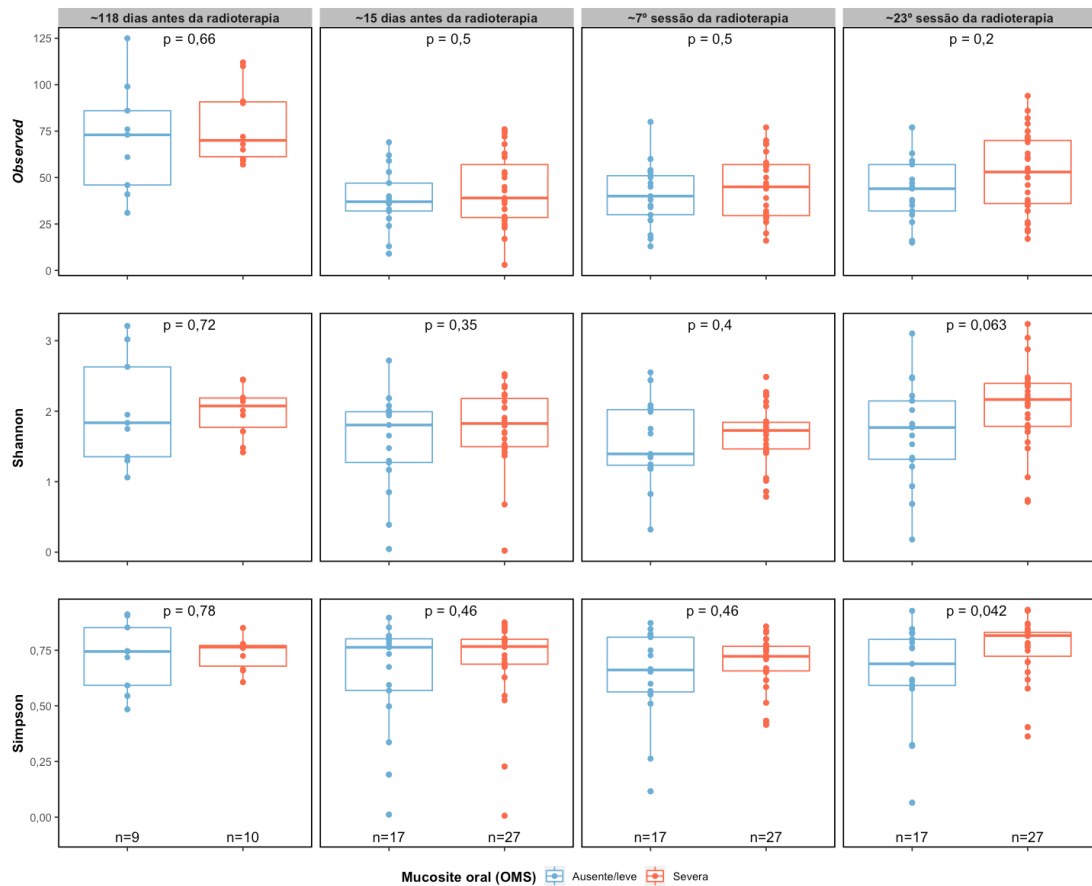


Figura 23 - Diversidade alfa em relação à mucosite oral (OMS) a nível de OTU nos quatro momentos das coletas (teste não paramétrico U de Mann-Whitney).

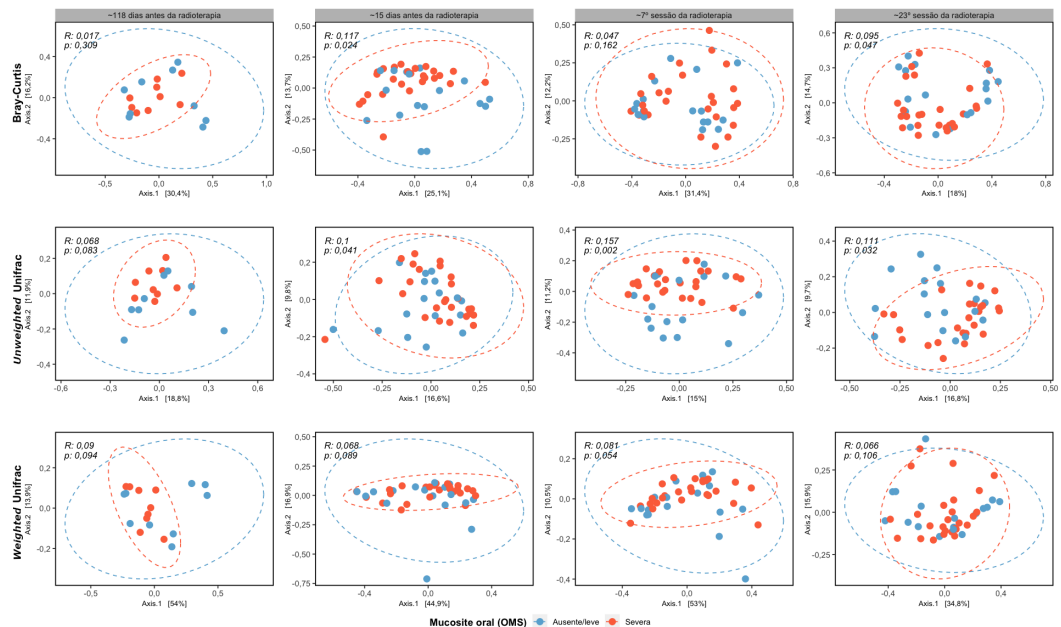


Figura 24 - Beta diversidade em relação à mucosite oral (OMS) a nível de OTU nos quatro momentos das coletas (R: coeficiente de similaridade de ANOSIM).

Tabela 19 - Avaliação da diversidade alfa em relação ao momento de coleta e severidade da mucosite oral (OMS).

Momento da coleta	MO (OMS)	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	OR	IC 95%	Valor de p^1
Observed							
I	Ausente/leve	9	70,89 (29,96)	73,00 (31-125)	1,01	0,98-1,05	0,508
	Severa	10	78,40 (20,88)	70,00 (57-112)			
V	Ausente/leve	17	38,53 (16,04)	37,00 (09-69)	1,02	0,98-1,05	0,372
	Severa	27	43,56 (19,55)	39,00 (03-76)			
VI	Ausente/leve	15	40,87 (17,89)	40,00 (13-80)	1,01	0,97-1,05	0,653
	Severa	15	43,87 (19,64)	39,00 (16-77)			
Shannon							
I	Ausente/leve	9	2,01 (0,77)	1,84 (1,06-3,21)	1,00	0,98-1,02	0,951
	Severa	10	1,99 (0,36)	2,07 (1,42-2,45)			
V	Ausente/leve	17	1,58 (0,68)	1,80 (0,04-2,72)	1,01	1,00-1,02	0,297
	Severa	27	1,77 (0,55)	1,82 (0,02-2,53)			
VI	Ausente/leve	15	1,58 (0,61)	1,39 (0,32-2,55)	1,00	0,99-1,02	0,756
	Severa	15	1,64 (0,47)	1,73 (0,79-2,27)			
Simpson							
I	Ausente/leve	9	0,72 (0,16)	0,74 (0,48-0,91)	1,01	0,93-1,10	0,801
	Severa	10	0,74 (0,07)	0,76 (0,61-0,85)			
V	Ausente/leve	17	0,64 (0,25)	0,76 (0,01-0,90)	1,01	0,98-1,04	0,325
	Severa	27	0,71 (0,19)	0,77 (0,01-0,88)			
VI	Ausente/leve	15	0,63 (0,22)	0,66 (0,12-0,87)	1,01	0,97-1,05	0,565
	Severa	15	0,67 (0,14)	0,72 (0,41-0,84)			

¹: Modelo de regressão logística simples; DP: desvio padrão; max: máximo; min: mínimo; MO: mucosite oral; OR: *odds ratio*.

Na avaliação da diversidade ao longo das coletas não foram incluídas as amostras do momento I visto que apenas 19 pacientes entrariam na análise, então do mesmo modo que foi feito na PCR em tempo real, para este tipo de avaliação foram consideradas apenas as coletas V a VII. Para os pacientes sem mucosite ou com grau leve, não observamos diferenças significativas (**Figura 25A**). Analisando aqueles com mucosite severa (**Figura 25B**) observamos que o número de bactérias distintas tende a aumentar entre as coletas, havendo uma diferença entre os momentos V e VII (*Observed*, $p=0,029$). Através dos índices de Shannon e Simpson vemos um aumento da diversidade ($p=0,013$ e $p=0,019$, respectivamente) entre os momentos VI e VII.

Estes resultados indicam que os pacientes que desenvolveram MO severa apresentaram um aumento na diversidade da microbiota ao longo do tratamento enquanto os que tiveram uma MO ausente/leve não apresentaram mudanças na diversidade alfa durante a radioterapia. Além disso, na PCR em tempo real havíamos observado que pacientes com MO severa apresentavam uma diminuição na quantidade de bactérias presentes na boca, quando comparado com antes do início do tratamento. Ao

relacionar ambos resultados, concluímos que em pacientes com MO severa, à medida que a quantidade de bactérias na boca vai diminuindo com a radioterapia, as bactérias que permanecem são mais diversas (há mais subtipos de OTUs nas amostras que estão proporcionalmente mais bem divididas).

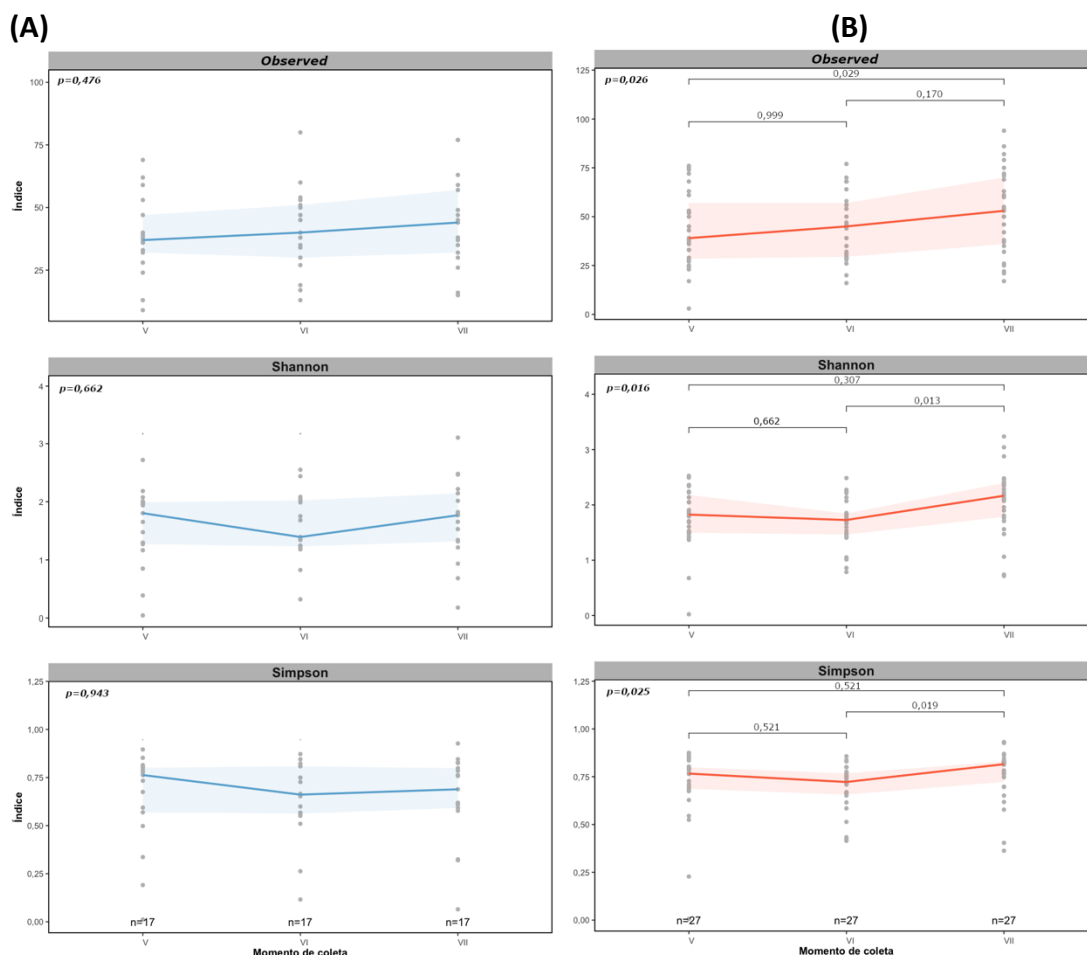


Figura 25 - Gráfico de perfil da diversidade alfa (*Observed*, *Shannon* e *Simpson*) em relação ao momento da coleta (V a VII) estratificado por mucosite oral de acordo com a gradação da OMS (A – ausente/leve) e (B - severa) (linha contínua representa a mediana e região sombreada o percentil 25 e 75; teste não paramétrico de Friedman).

Na **Figura 26** é possível comparar diferenças entre as coletas dos momentos V a VII dos pacientes com mucosite ausente/leve versus severa. Este resultado é o mesmo que observado previamente no *boxplot* da diversidade alfa (**Figura 23**). Como as mesmas amostras foram incluídas na análise o resultado é igual, porém é possível observar melhor as alterações na diversidade por este gráfico. Através desta figura podemos concluir que a diferença observada entre os grupos na coleta VII é devido ao aumento da diversidade dos pacientes com mucosite severa durante a radioterapia. Isto indica que pacientes que

apresentaram uma maior mudança na sua diversidade (neste caso para maior) tiveram MO severa. De certa forma isto é semelhante ao observado por Ye et al.⁹⁵ que concluíram que pacientes pediátricos com tumores hematológicos que apresentam maior mudança na microbiota após a quimioterapia são mais propensos a terem um pior caso de MO, embora em geral eles observaram que isto está associado há uma diminuição na diversidade. Destacamos que os resultados das diversidades alfa e beta se mantiveram mesmo sem incluirmos o paciente #11.

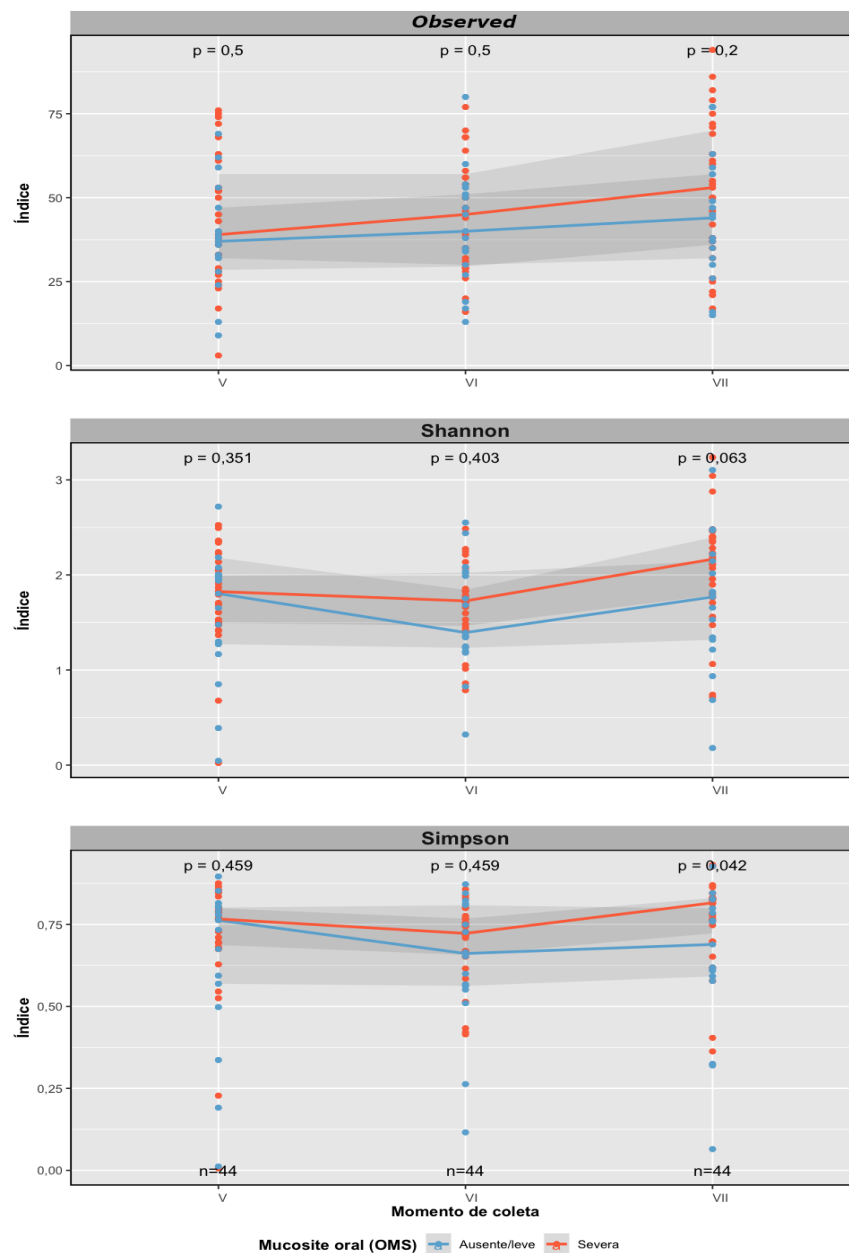
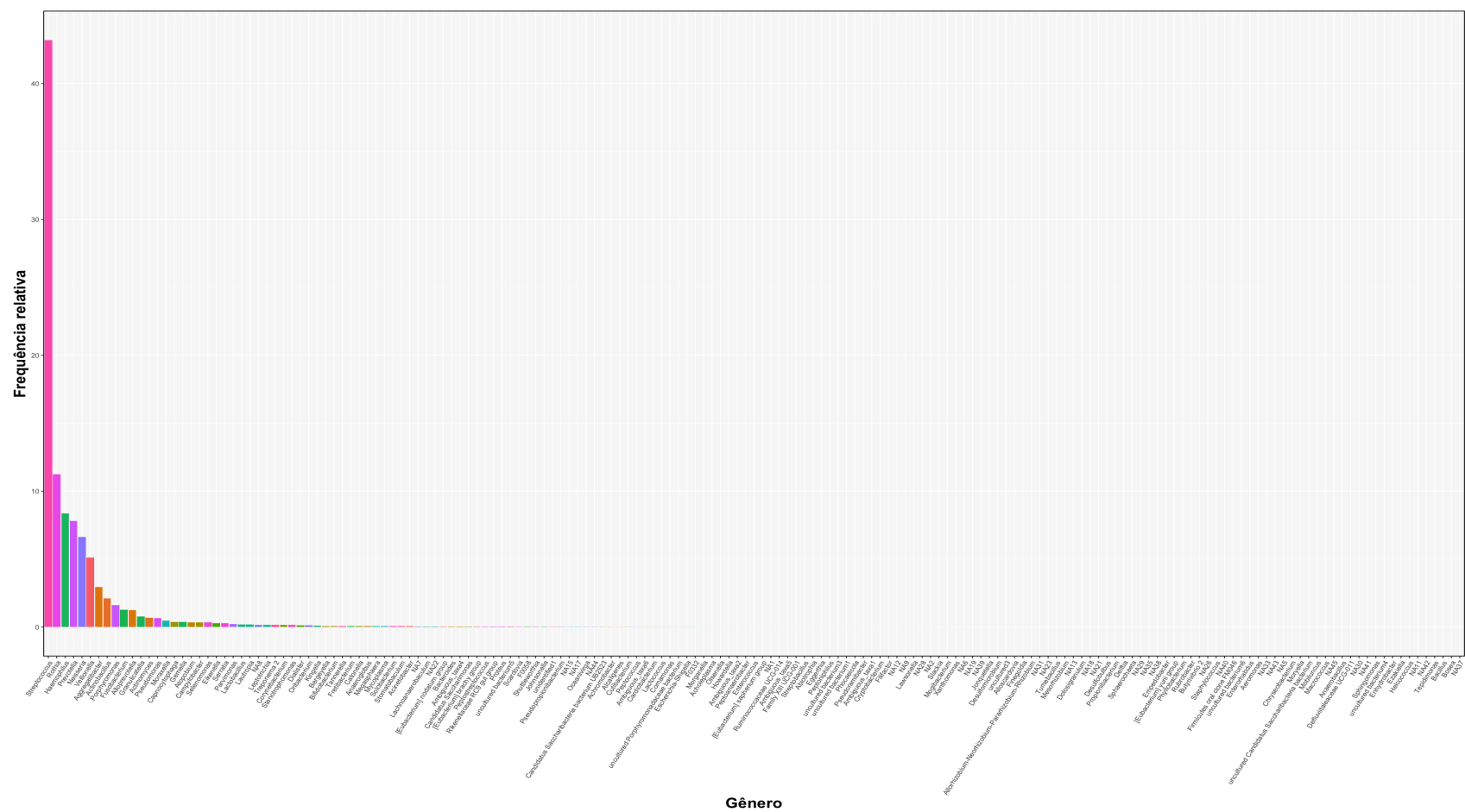


Figura 26 - Gráfico de perfil em relação à diversidade alfa estratificado pela mucosite oral (OMS) ao longo das quatro coletas a nível de OTU (teste não paramétrico U de Mann-Whitney).

4.2.3.3 Bactérias: frequências e resultados estatísticos

Neste módulo, apenas 11/169 (6,5%) gêneros presentes nas 151 amostras, apresentaram uma frequência média acima de 1%. Somando as suas frequências, eles representaram cerca de 91,6% dos *reads* e o restante dos 158 gêneros teve uma frequência média que variou de 0,0000638% a 0,79% (**Figura 27**). Estas porcentagens são semelhantes ao já discutido e observado no módulo I (ISC) quando as 12 bactérias mais prevalentes totalizaram 89% dos *reads*, indicando mais uma vez que a microbiota oral é dominada por apenas alguns poucos grupos bacterianos.



Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com a severidade da MO estão descritos na **Tabela 20**. De modo geral, observamos que independentemente do grupo ou momento de coleta, *Streptococcus* sempre foi a bactéria mais frequente representando 32,84% a 46,64% dos *reads* gerados. Esta é uma bactéria comumente encontrada em cavidade oral⁷⁰, e mesmo durante a radioterapia sua frequência continua sempre alta. Em relação ao momento I (*baseline* - antes da cirurgia), as mesmas 10 bactérias compuseram os dois grupos, indicando que neste momento ainda não há diferença entre a composição bacteriana dos pacientes. Avançando para a coleta V, observamos que das 10 bactérias mais abundantes nos pacientes com MO ausente/leve e severa, 3 delas (30%) só estão presentes em um dos grupos (MO ausente/leve inclui *Aggregatibacter*, *Pseudomonas* e *Fusobacterium*; enquanto a severa inclui *Actinobacillus*, *Actinomyces* e *Granulicatella*) o que já sugere uma certa diferença entre as suas composições. Indo para a coleta VI, este número sobe para 4 (40%), porém é interessante notar que as bactérias não mudam muito dentro do mesmo grupo. Por exemplo, nos pacientes com MO ausente/leve, *Pseudomonas* é o único gênero presente na coleta V mas não faz parte da lista de bactérias mais frequentes na coleta VI. Do mesmo modo, no grupo com MO severa, a *Porphyromonas* antes presente na coleta V, é excepcionalmente a que está também ausente na coleta VI. Por outro lado, quando seguimos para o momento VII, observamos que a diferença entre os grupos quanto a composição ainda permanece (4 bactérias únicas a cada grupo), porém as bactérias presentes principalmente no grupo com MO severa tendem a ser diferentes das com maiores frequências na coleta VI. Neste último momento, que indica o pior grau de MO, 3 bactérias novas surgem dentre as mais comuns: *Aggregatibacter*, *Alloprevotella* e *Pseudomonas*. Isso parece sugerir que com o agravamento da MO, a microbiota tende a mudar.

Tabela 20 - Os 10 gêneros mais frequentes de acordo com a coleta e severidade da mucosite oral (OMS).

Top 10	MO ausente/leve		MO severa	
	Gênero	Frequência (%)	Gênero	Frequência (%)
Coleta I				
1º	<i>Streptococcus</i>	40,36	<i>Streptococcus</i>	46,65
2º	<i>Prevotella</i>	12,00	<i>Rothia</i>	12,12
3º	<i>Rothia</i>	11,61	<i>Haemophilus</i>	11,8
4º	<i>Actinobacillus</i>	7,16	<i>Prevotella</i>	8,09
5º	<i>Haemophilus</i>	5,55	<i>Veillonella</i>	4,11
6º	<i>Veillonella</i>	5,33	<i>Neisseria</i>	3,6
7º	<i>Neisseria</i>	4,08	<i>Actinobacillus</i>	3,46
8º	<i>Fusobacterium</i>	2,44	<i>Alloprevotella</i>	3,05
9º	<i>Porphyromonas</i>	2,24	<i>Porphyromonas</i>	1,37
10º	<i>Alloprevotella</i>	1,14	<i>Fusobacterium</i>	1,31
Coleta V				
1º	<i>Streptococcus</i>	45,94	<i>Streptococcus</i>	37,81
2º	<i>Haemophilus</i>	10,6	<i>Rothia</i>	17,48
3º	<i>Neisseria</i>	10,35	<i>Neisseria</i>	10,23
4º	<i>Rothia</i>	6,65	<i>Haemophilus</i>	9,03
5º	<i>Prevotella</i>	6,64	<i>Veillonella</i>	8,98
6º	<i>Aggregatibacter</i>	4,35	<i>Prevotella</i>	6,63
7º	<i>Veillonella</i>	3,13	<i>Actinobacillus</i>	1,69
8º	<i>Porphyromonas</i>	2,56	<i>Actinomyces</i>	1,52
9º	<i>Pseudomonas</i>	1,81	<i>Granulicatella</i>	1,51
10º	<i>Fusobacterium</i>	1,26	<i>Porphyromonas</i>	1,28
Coleta VI				
1º	<i>Streptococcus</i>	53,23	<i>Streptococcus</i>	45,96
2º	<i>Rothia</i>	10,69	<i>Rothia</i>	15,09
3º	<i>Haemophilus</i>	10,17	<i>Veillonella</i>	8,99
4º	<i>Aggregatibacter</i>	4,71	<i>Haemophilus</i>	7,21
5º	<i>Veillonella</i>	3,31	<i>Prevotella</i>	7,14
6º	<i>Neisseria</i>	1,93	<i>Neisseria</i>	6,62
7º	<i>Prevotella</i>	1,79	<i>Actinobacillus</i>	2,33
8º	<i>Porphyromonas</i>	1,54	<i>Gemella</i>	1,21
9º	<i>Fusobacterium</i>	1,44	<i>Actinomyces</i>	0,92
10º	NA8	1,39	<i>Granulicatella</i>	0,72
Coleta VII				
1º	<i>Streptococcus</i>	45,38	<i>Streptococcus</i>	32,84
2º	<i>Aggregatibacter</i>	9,58	<i>Prevotella</i>	13,37
3º	<i>Prevotella</i>	8,27	<i>Neisseria</i>	9,01
4º	<i>Rothia</i>	6,38	<i>Rothia</i>	8,44
5º	<i>Haemophilus</i>	4,17	<i>Haemophilus</i>	8,3
6º	<i>Moraxella</i>	3,55	<i>Veillonella</i>	3,67
7º	<i>Fusobacterium</i>	3,46	<i>Aggregatibacter</i>	3,54
8º	<i>Neisseria</i>	2,87	<i>Actinobacillus</i>	3,27
9º	<i>Porphyromonas</i>	2,62	<i>Alloprevotella</i>	2,97
10º	<i>Serratia</i>	1,51	<i>Pseudomonas</i>	1,71

MO: mucosite oral.

A **Figura 28** demonstra com mais detalhes mudanças na microbiota ao longo da radioterapia, onde incluímos todas as bactérias descritas na **Tabela 20**. Notamos que algumas bactérias não tiveram suas frequências tão alteradas entre os momentos I e V (*Gemella*, *Granulicatella*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Rothia* e *Streptococcus*) independentemente do grupo que elas ficaram classificadas. Isso é bastante interessante visto que o tempo entre essas duas coletas, como já mencionado, foi de 103 dias (aproximadamente 3,4 meses) e neste intervalo os pacientes foram submetidos à remoção cirúrgica do tumor que pode incluir esvaziamento cervical e reconstrução, além de uso de antibióticos ou realização de outros procedimentos que podiam interferir na microbiota oral. Já havíamos discutido no módulo I que, para os pacientes que não tiveram MO, a microbiota oral aparenta se assemelhar no momento IV com as coletas pré-operatórias, voltando a seu estado mais basal e em concordância com observações de Hauser et al.⁸⁹. Neste módulo II, ao contrastarmos as coletas do momento I com o V, novamente reafirmamos esta mesma observação onde a frequência de pelo menos uma parte da microbiota parece ser reestabelecida, independentemente da cirurgia pregressa.

Entre as coletas V e VII, um fenômeno curioso foi observado: bactérias com frequências similares entre os grupos parecem ter um mesmo perfil de comportamento ao longo da radioterapia. Por exemplo, para *Haemophilus*, tanto nos pacientes que tiveram MO ausente/leve como nos que tiveram MO severa, uma diminuição na frequência entre os momentos #5 e #6 que continuou entre o #6 e #7 foi observado. Também foi notado um perfil de comportamento similar entre os grupos na *Fusobacterium*, *Gemella*, *Prevotella* e *Streptococcus*. Assim, podemos concluir que a frequência de algumas bactérias parece ser afetada pela radiação ionizante, tanto de modo direto quanto indireto (consequência da disbiose local - não sendo as mesmas necessariamente importantes para determinar a severidade da mucosite). Em contradição, o comportamento de algumas bactérias muda bastante dependendo do grupo onde ela foi encontrada.

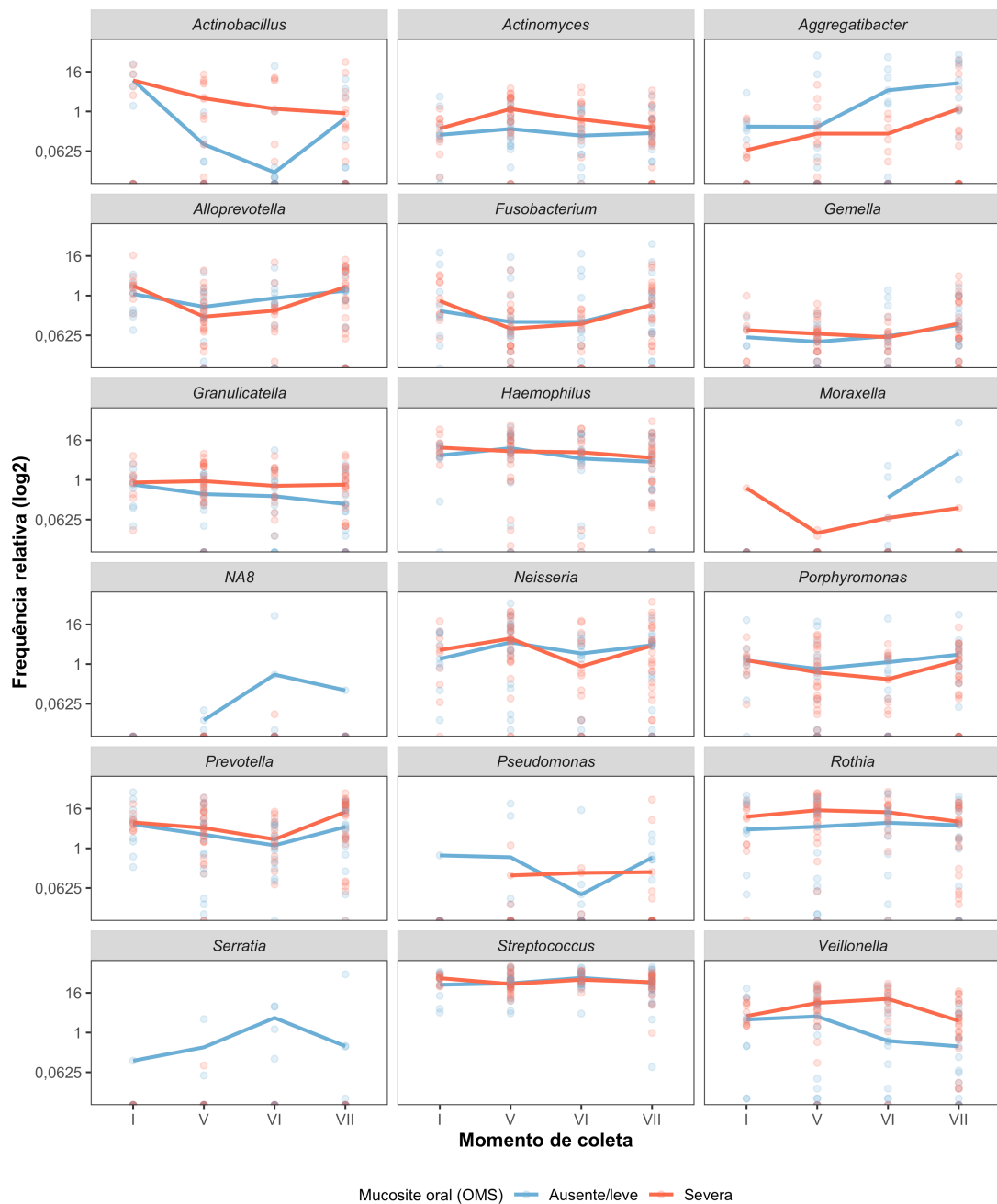


Figura 28 - Gráfico de perfil da frequência relativa (log2) dos gêneros mais abundantes ao longo das coletas (I, V a VII) de acordo com a severidade da mucosite oral (OMS) (linha contínua representa mediana).

O melhor exemplo deste achado é a bactéria *Aggregatibacter*, uma proteobactéria gram-negativa cuja frequência aumentou de modo significativo no momento VI em pacientes do grupo de mucosite severa, antes do surgimento da mucosite. No grupo de pacientes que desenvolveu MO leve esta bactéria tem seus níveis inalterados, vindo a subirem apenas ao final da radioterapia. Já a *Actinobacillus* diminui drasticamente nos pacientes de MO ausente/leve entre as coletas V e VI enquanto na MO há uma diminuição

discreta. Ainda há outros casos como a *Serratia* e NA8 (gênero desconhecido da família Enterobacteriaceae) que só apareceu nos pacientes com mucosite ausente/leve. Essas observações sugerem que o efeito da radioterapia na microbiota oral é diverso, sendo que algumas bactérias parecem não ser afetadas (*Streptococcus*, por exemplo), enquanto algumas tem seus níveis reduzidos talvez propiciando ambiente favorável para o crescimento de outras.

Na análise de associação observamos bactérias diferentemente abundantes em todos os momentos de coletas em relação à severidade da MO (**Figura 29**). A *Veillonella*, em particular, é a única que aparece mais abundante nos pacientes com MO severa em dois momentos, V e VI, o que pode indicar que ela pode estar associada com o desenvolvimento de uma MO mais grave. Sua presença, como podemos observar na figura anterior (**Figura 28**) parece estar aumentada antes do início da radioterapia nos casos que irão desenvolver MO severa. Uma vez que a mucosite se inicia, sua frequência se mantém elevada no grupo de MO severa, porém diminui bastante no grupo que terá uma MO ausente/leve. Assim, podemos especular que a sua presença agrava as chances de desenvolver mucosite.

O pior momento da mucosite (coleta VII) foi marcado pela predominância das bactérias *Selenomonas*, *Anaeroglobus* e *Eubacterium nodatum group* entre os pacientes com MO severa em relação aos com MO ausente/leve. Diferentemente do que observamos no módulo I do estudo, onde no momento da ISC há uma abundância de *Prevotella* e *Porphyromonas* concomitante com a infecção (representando 40% dos *reads*), no módulo II notamos que as 3 bactérias associadas com a MO severa apresentam em conjunto uma baixa frequência, somando juntas apenas 1,63% dos *reads*. Apesar dessa frequência ser baixa, estas bactérias, principalmente a *Selenomonas* e *Eubacterium nodatum group*, estavam presentes na maioria dos casos com MO severa, ambas ocorrendo em 17 casos (62,9%), enquanto nos pacientes sem MO ou MO leve estiveram presentes em apenas 8 e 4 casos, respectivamente. De modo geral, esse resultado sugere que enquanto na cirurgia o crescimento da *Prevotella* e *Porphyromonas* parece favorecer a ocorrência da ISC, na radioterapia a presença da *Selenomonas*, *Anaeroglobus* e *Eubacterium nodatum group* na MO severa parece ser uma consequência desta própria complicação, e não necessariamente são fatores causais MO severa. Esses três gêneros são patógenos

anaeróbicos^{146,147}, e em um meio disbiótico com lesões ulcerativas de MO é possível que tenham seus crescimentos facilitados.

Já para as bactérias que predominam no grupo com MO ausente/leve, todas tiveram frequência extremamente baixa e esparsa entre os pacientes do grupo. Dos 17 pacientes agrupados como MO ausente/leve apenas 3 apresentaram *Serratia* e *Comamonas*, e 4 tiveram *Stenotrophomonas*. Nenhuma dessas bactérias foi observada em pacientes com MO severa, porém devido às frequências baixas e esparsas aqui encontradas, não é possível sugerir sua importância como tendo papel protetor da mucosa.

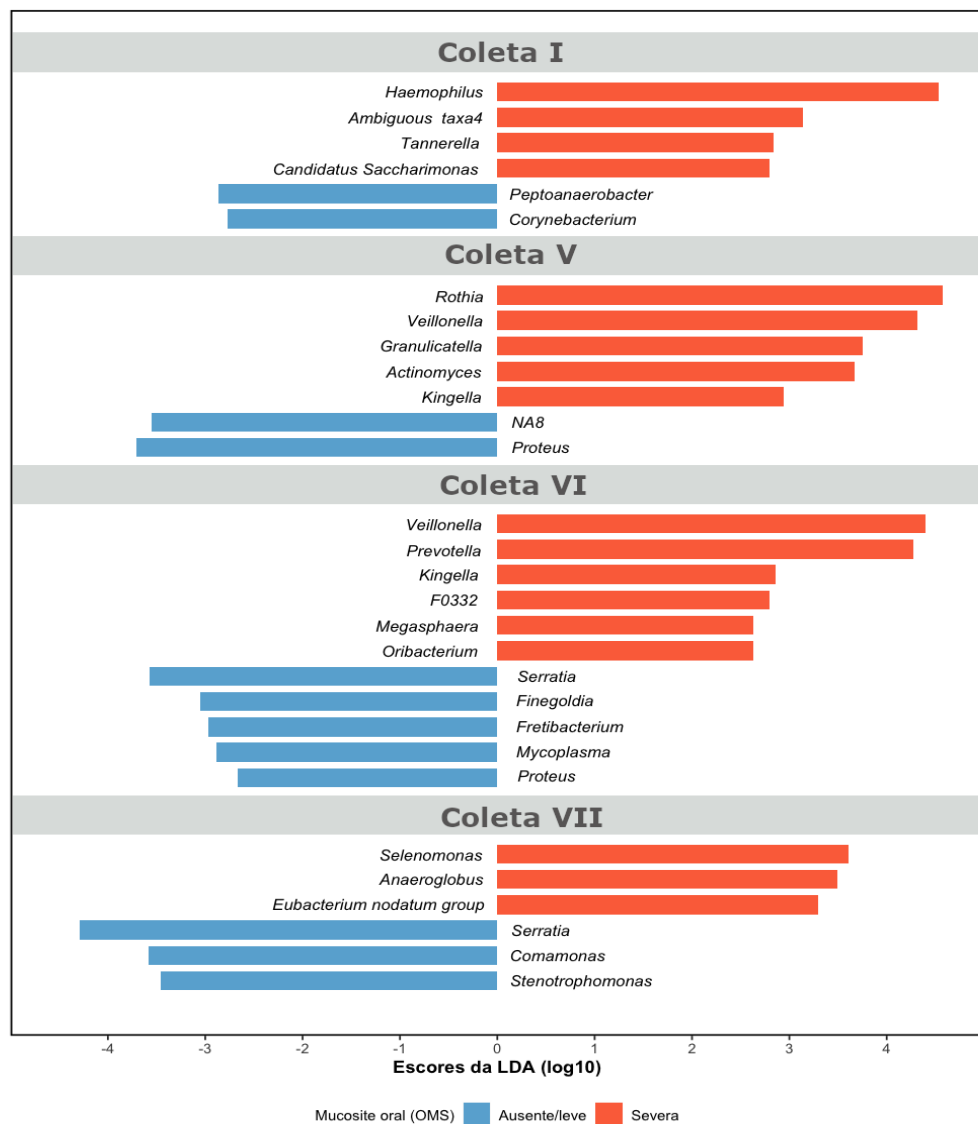


Figura 29 – Gêneros bacterianos com diferente abundância entre os pacientes com mucosite oral ausente/leve e severa (OMS) em cada momento da coleta de acordo com escores da LDA (log10) (teste não paramétrico U de Mann-Whitney). Legenda: Bactéria Ambiguous taxa4 é um gênero desconhecido da ordem Saccharimonadales, e o NA8 é da família Enterobacteriaceae.

Para investigar se a frequência de alguma bactéria seria informativa para prever a chance do paciente desenvolver MO severa, aplicamos um modelo de regressão logística com base nas coletas do momento I, V e VI. Ressaltamos que para o momento VI só incluímos os pacientes que ainda não tinham desenvolvido mucosite de nenhum grau (n=30). A **Tabela 21** descreve o resultado dos 13 gêneros mais frequentes nas coletas da radioterapia. Em particular, duas bactérias se destacaram: *Actinomyces* e *Granulicatella*, ambas no momento V (15 dias antes do início da radioterapia). Observamos que a cada aumento de 1% na frequência dessas bactérias, há um aumento de 14% na chance de desenvolver MO severa para *Actinomyces* (OR: 1,14%; IC: 1,02-1,26) e 11% para *Granulicatella* (OR: 1,11%; IC: 1,01-1,22). Para melhor avaliarmos o impacto de ambas na predição de MO severa, fizemos uma análise de curva ROC. Os pontos de corte de *Actinomyces* foram: frequência até 0,43% (n=18; 40,9%) ou acima de 0,43% (n=26; 59,1%) (sensibilidade e especificidade de 0,74 e 0,65, respectivamente); e *Granulicatella* em frequência até 0,36% (n=19; 43,2%) ou acima de 0,36% (n=25; 56,8%) (sensibilidade e especificidade de 0,70 e 0,65, respectivamente). Refazendo a análise de regressão baseado na recategorização, observamos que a frequência elevada de *Actinomyces* (acima de 0,43%), indicava uma chance 5,2 vezes maior chance de desenvolver MO severa ($p=0,014$; IC: 1,41-19,5), assim como, quando há a presença da *Granulicatella* acima de 0,36%, a chance de ter um pior grau de MO é 4,4 vezes maior ($p=0,026$; IC: 1,20-15,87).

Devido ao resultado promissor para estas duas bactérias, avaliamos se haveria uma maior chance do paciente desenvolver MO severa com a presença aumentada dessas duas bactérias simultaneamente. Para isso, foi somada a frequência dessas bactérias em cada paciente e feito uma nova curva ROC (sensibilidade = 0,82 e especificidade = 0,76) que indicou um novo ponto de corte: igual ou abaixo de 1,19% (n=19; 43,2%) e acima de 1,19% (n=25; 56,8%). No modelo de regressão foi observado que pacientes que apresentam uma maior frequência ($>1,19\%$) de *Actinomyces* e *Granulicatella* na coleta antes do início da radioterapia apresentam 20,5 vezes maior chance de desenvolver MO severa do que os pacientes que apresentam uma frequência menor (OR: 20,5; IC: 4,22-99,73; $p<0,001$). Ressaltamos que esta é uma informação que já pode ser usada, em um grupo de pacientes independente, para avaliar seu impacto no desenvolvimento futuro de MO.

Tabela 21 - Modelo de regressão logística dos 13 gêneros mais frequentes em relação ao momento de coleta e severidade da mucosite oral (OMS).

Gênero	Coleta	Mucosite oral (OMS)	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	OR	IC 95%	Valor de p^1
<i>Actinobacillus</i>	I	Ausente/leve	9	5,37 (9,45)	0,00 (0,00-27,50)	0,99	0,89-1,10	0,891
		Severa	10	4,83 (8,62)	0,00 (0,00-26,01)			
	V	Ausente/leve	17	0,07 (0,22)	0,00 (0,00-0,93)	1,10	0,92-1,31	0,294
		Severa	27	1,61 (3,44)	0,00 (0,00-13,20)			
	VI	Ausente/leve	15	1,66 (6,13)	0,00 (0,00-23,79)	1,02	0,88-1,18	0,815
			15	2,08 (3,94)	0,00 (0,00-10,55)			
<i>Actinomyces</i>	I	Ausente/leve	9	0,59 (0,94)	0,19 (0,00-2,82)	0,61	0,14-2,63	0,503
		Severa	10	0,38 (0,36)	0,31 (0,01-1,22)			
	V	Ausente/leve	17	0,45 (0,50)	0,28 (0,00-1,74)	1,14	1,02-1,26	0,017*
		Severa	27	1,43 (1,31)	1,16 (0,00-5,03)			
	VI	Ausente/leve	15	0,39 (0,48)	0,17 (0,00-1,41)	1,10	0,98-1,25	0,114
			15	1,20 (1,56)	0,55 (0,00-5,56)			
<i>Aggregatibacter</i>	I	Ausente/leve	9	0,58 (1,18)	0,26 (0,00-3,69)	0,22	0,01-10,01	0,440
		Severa	10	0,14 (0,24)	0,04 (0,00-0,62)			
	V	Ausente/leve	17	3,76 (12,24)	0,00 (0,00-49,60)	0,90	0,71-1,14	0,381
		Severa	27	0,42 (1,31)	0,00 (0,00-6,43)			
	VI	Ausente/leve	15	5,46 (12,01)	0,00 (0,00-44,40)	0,41	0,09-1,75	0,227
			15	0,13 (0,26)	0,00 (0,00-0,85)			
<i>Alloprevotella</i>	I	Ausente/leve	9	1,30 (1,38)	1,12 (0,09-4,36)	1,51	0,67-3,41	0,325
		Severa	10	3,31 (4,77)	1,99 (0,28-16,60)			
	V	Ausente/leve	17	0,67 (1,28)	0,19 (0,00-5,22)	0,96	0,58-1,57	0,861
		Severa	27	0,61 (1,19)	0,19 (0,00-5,80)			
	VI	Ausente/leve	15	0,99 (1,81)	0,50 (0,00-6,99)	1,01	0,73-1,41	0,940
			15	1,05 (2,61)	0,33 (0,00-10,24)			
<i>Fusobacterium</i>	I	Ausente/leve	9	3,49 (6,88)	0,24 (0,00-20,19)	0,90	0,71-1,15	0,411
		Severa	10	1,54 (1,61)	0,70 (0,05-4,22)			
	V	Ausente/leve	17	1,53 (3,76)	0,07 (0,00-14,80)	0,79	0,54-1,15	0,221
		Severa	27	0,36 (1,12)	0,06 (0,00-5,86)			
	VI	Ausente/leve	15	2,00 (4,94)	0,08 (0,00-18,74)	0,39	0,05-3,22	0,382
			15	0,12 (0,14)	0,03 (0,00-0,39)			
<i>Granulicatella</i>	I	Ausente/leve	9	0,99 (0,98)	0,72 (0,04-2,95)	1,32	0,61-2,83	0,482
		Severa	10	1,43 (1,62)	0,84 (0,03-5,32)			
	V	Ausente/leve	17	0,42 (0,56)	0,17 (0,00-1,54)	1,11	1,01-1,22	0,032*
		Severa	27	1,49 (1,62)	0,74 (0,00-6,17)			
	VI	Ausente/leve	15	0,91 (2,02)	0,29 (0,00-7,94)	1,14	0,73-1,78	0,572
			15	1,27 (1,40)	0,66 (0,02-5,27)			
<i>Haemophilus</i>	I	Ausente/leve	9	5,76 (4,16)	4,96 (0,00-12,01)	1,21	0,95-1,55	0,125
		Severa	10	12,37 (9,64)	9,57 (2,80-33,97)			
	V	Ausente/leve	17	12,19 (11,32)	8,39 (0,00-39,80)	0,99	0,94-1,04	0,683
		Severa	27	10,78 (11,41)	6,92 (0,00-45,20)			
	VI	Ausente/leve	15	8,74 (9,74)	4,38 (0,00-26,40)	1,02	0,95-1,10	0,547
			15	11,08 (11,82)	6,81 (0,00-35,82)			
<i>Neisseria</i>	I	Ausente/leve	9	3,82 (4,08)	1,44 (0,02-9,76)	1,03	0,86-1,23	0,764
		Severa	10	4,52 (6,27)	2,42 (0,00-20,10)			
	V	Ausente/leve	17	11,17 (17,43)	4,47 (0,01-69,50)	1,00	0,95-1,04	0,826
		Severa	27	10,22 (11,85)	5,62 (0,00-39,78)			
	VI	Ausente/leve	15	2,25 (2,52)	1,83 (0,00-7,79)	1,08	0,92-1,27	0,360
			15	4,01 (6,81)	0,54 (0,00-20,50)			
<i>Porphyromonas</i>	I	Ausente/leve	9	3,33 (6,91)	1,15 (0,00-21,61)	0,92	0,74-1,16	0,508
		Severa	10	1,78 (1,88)	1,31 (0,06-6,59)			
	V	Ausente/leve	17	2,60 (5,57)	0,42 (0,00-19,40)	0,92	0,78-1,09	0,331
		Severa	27	1,39 (2,25)	0,22 (0,00-7,81)			
	VI	Ausente/leve	15	2,07 (6,08)	0,16 (0,00-23,92)	0,92	0,72-1,17	0,486
			15	0,81 (1,20)	0,09 (0,00-4,07)			
<i>Prevotella</i>	I	Ausente/leve	9	12,67 (17,14)	5,32 (0,27-50,10)	0,96	0,88-1,05	0,389
		Severa	10	7,63 (5,58)	6,11 (3,34-22,10)			
	V	Ausente/leve	17	7,14 (10,45)	1,86 (0,00-34,50)	1,00	0,84-1,07	0,986
		Severa	27	7,10 (8,51)	4,03 (0,00-34,00)			
	VI	Ausente/leve	15	1,98 (2,15)	0,99 (0,00-6,37)	1,21	0,93-1,57	0,156
			15	3,81 (4,14)	1,87 (0,08-12,95)			
<i>Rothia</i>	I	Ausente/leve	9	13,87 (15,02)	3,71 (0,04-40,42)	0,97	0,90-1,05	0,484
		Severa	10	10,00 (9,51)	8,49 (0,00-26,70)			
	V	Ausente/leve	17	8,53 (12,52)	0,74 (0,00-35,00)	1,04	0,99-1,10	0,099
		Severa	27	15,84 (14,23)	13,16 (0,00-47,21)			
	VI	Ausente/leve	15	10,45 (14,73)	5,84 (0,00-45,00)	1,02	0,97-1,08	0,434
			15	14,48 (13,64)	11,40 (0,00-51,46)			
<i>Streptococcus</i>	I	Ausente/leve	9	34,67 (25,22)	28,17 (4,03-68,50)	1,03	0,98-1,08	0,288
		Severa	10	44,00 (11,13)	44,52 (24,62-59,60)			
	V	Ausente/leve	17	39,27 (29,13)	31,10 (3,81-99,50)	1,00	0,97-1,02	0,770
		Severa	27	37,02 (22,90)	29,66 (9,27-99,68)			
	VI	Ausente/leve	15	47,68 (25,41)	45,50 (3,77-94,10)	1,00	0,96-1,03	0,851
			15	46,20 (18,67)	39,98 (16,02-75,24)			
<i>Veillonella</i>	I	Ausente/leve	9	5,68 (7,63)	2,49 (0,01-21,70)	0,97	0,82-1,14	0,690
		Severa	10	4,67 (3,31)	3,30 (1,58-10,52)			
	V	Ausente/leve	17	4,54 (7,35)	0,83 (0,00-25,50)	1,08	0,98-1,19	0,101
		Severa	27	8,89 (8,45)	7,45 (0,00-29,30)			
	VI	Ausente/leve	15	3,98 (7,24)	0,53 (0,00-25,90)	1,11	1,00-1,24	0,054
			15	10,68 (9,26)	8,95 (0,00-30,09)			

DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; OR: odds ratio

Baseado nestes resultados, fizemos uma nova análise para avaliar o que ocorre com essas duas bactérias ao longo do tratamento antes do desenvolvimento da MO severa. Na **Tabela 22** observamos que pacientes que desenvolveram MO severa apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de *Actinomyces* e *Granulicatella* do momento V para o VI. Já para os pacientes com mucosite ausente/leve não foi observada uma diferença. Estes resultados indicam que além dos pacientes que desenvolvem MO severa apresentarem uma maior quantidade de *Actinomyces* e *Granulicatella* antes da radioterapia, com o início deste tratamento, já nas primeiras sessões, ocorre uma diminuição significativa na frequência dessas bactérias. Tendo em vista que a maior quantidade da *Actinomyces* e *Granulicatella* antes da radioterapia parece indicar pacientes com maior risco de ter MO severa, podemos hipotetizar que elas atuam como protetoras da mucosa oral quando em grandes quantidades e são importantes para manter a eubiose oral. No entanto, elas são afetadas pela radiação (reduzindo sua frequência) o que parece facilitar o quadro inflamatório da cavidade oral, tornando-a mais susceptível ao desenvolvimento da MO severa. Nos pacientes que apresentarão uma MO ausente/leve, a menor quantidade dessas bactérias de modo geral, indica que nestes pacientes, *Actinomyces* e *Granulicatella* não são necessariamente importantes para a manutenção da saúde oral. Assim, mesmo que suas frequências estejam reduzidas com a radiação (o que não foi o caso, provavelmente devido a baixa frequência destas, visto que a radiação deve afetar principalmente bactérias em maiores quantidades espalhadas pela cavidade oral), isso não aumentaria o risco de MO severa.

Tabela 22 - Avaliação da frequência da *Actinomyces* e *Granulicatella* em relação à mucosite oral (OMS) e momento de coleta (V e VI).

Gênero/MO	Momento	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p^1
<i>Actinomyces</i>					
MO ausente/leve	V	17	0,45 (0,50)	0,28 (0,00-2,00)	0,795
	VI	17	0,39 (0,46)	0,17 (0,00-1,00)	
MO severa	V	27	1,43 (1,31)	1,16 (0,00-5,00)	0,026*
	VI	27	1,09 (1,41)	0,42 (0,00-6,00)	
<i>Granulicatella</i>					
MO ausente/leve	V	17	0,42 (0,56)	0,17 (0,00-2,00)	0,279
	VI	17	0,81 (1,91)	0,22 (0,00-8,00)	
MO severa	V	27	1,49 (1,62)	0,74 (0,00-6,00)	0,044*
	VI	27	0,95 (1,17)	0,58 (0,00-5,00)	

¹: Teste não paramétrico de Wilcoxon; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; MO: mucosite oral; min: mínimo; max: máximo

De modo geral, a *Actinomyces* e *Granulicatella* são bactérias comensais comumente encontradas na cavidade oral, e associadas a uma boa saúde bucal. Recentemente, Hong et al.¹⁴⁸ observaram que em pacientes que fizeram quimioterapia a base de 5-fluorouracil ou doxorrubicina o desenvolvimento da MO foi associado a uma depleção de bactérias comensais associadas a saúde, que dentre outras, incluíram a *Actinomyces* e *Granulicatella*. Do mesmo modo, houve um aumento de bactérias gram-negativas como a *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella oris*, levando à conclusão de que mudanças da composição da microbiota oral podem estar associadas com o agravamento da mucosite. No presente estudo, observamos que a presença aumentada e simultânea de *Actinomyces* e *Granulicatella* - antes da radioterapia - aumenta em 20,5x a chance do paciente desenvolver MO severa. Sua perda com o início do tratamento radioterápico em pacientes que terão um pior grau de MO nos leva a acreditar que essas bactérias comensais são importantes, quando em grandes quantidades, para manter a saúde oral e impedir a ocorrência da MO severa.

Um trabalho¹⁴⁹ de revisão relatou que diminuição na quantidade de bactérias comensais podem agravar o quadro da mucosite intestinal em pacientes em quimioterapia, uma vez que elas apresentam funções necessárias para a proteção do epitélio do hospedeiro. Cinco eventos associados a estas bactérias foram discutidos como podendo diminuir a ocorrência da mucosite, incluindo: 1-atividade anti-inflamatória. Já foi observado que na redução ou ausência de bactérias comensais um aumento na inflamação dos tecidos pode ocorrer - *Bifidobacterium infantis*, por exemplo, possui a capacidade de inibir a ativação do fator de transcrição NF-κB que é responsável pela liberação de endotoxinas e interleucinas que geram um processo inflamatório^{150,151}; 2-impedir a permeabilidade dos tecidos, que em geral facilita a ocorrência da MO. Segundo estudos, as bactérias comensais são capazes de melhorar as barreiras epiteliais fortalecendo as junções intra-epiteliais e consequentemente diminuindo a permeabilidade do epitélio¹⁵²; 3-liberação de muco que é composto por glicoproteínas e mucinas que ajudam na proteção do tecido¹⁵³; 4- maior resistência a estímulos prejudiciais ao hospedeiro, promovendo o reparo tecidual¹⁵⁴; 5- ativação e liberação de células imunes, primordiais para a manutenção da homeostase tecidual¹⁵⁵.

Em nosso estudo a maior quantidade de *Actinomyces* e *Granulicatella* antes da radioterapia poderia indicar que estas são prejudiciais ao tecido e possíveis causadoras da

MO, uma vez que observamos que elas aumentam a chance de os pacientes desenvolverem uma MO severa. Porém, como discutido, a diminuição destas bactérias é correlacionada negativamente com a MO. E, devido ao fato que neste trabalho pacientes que desenvolveram uma MO severa apresentaram desde as primeiras sessões da radioterapia uma diminuição significativa das mesmas, acreditamos que essas duas bactérias comensais possam ter um papel protetor na mucosa oral principalmente quando em maiores quantidades. Com a sua diminuição devido à radiação, talvez o epitélio fique desprotegido de algum modo, favorecendo a inflamação. Assim, a redução de bactérias que talvez pudessem ter um papel de impedir danos ao tecido, através dos 5 mecanismos descritos acima, poderia facilitar a ocorrência da MO severa.

Segundo van Vliet¹⁴⁹, caso a ação protetora das bactérias comensais em relação à ocorrência de MO for comprovada, pesquisas poderão ser desenvolvidas com a função de restaurar a eubiose e diminuir a mucosite. Baseado nos nossos resultados, acreditamos que é possível identificar pacientes com maior risco antes que o tratamento radioterápico comece. Na detecção de quantidade aumentada de *Actinomyces* e *Granulicatella* já antes do início do tratamento radioterápico, medicamentos, prebióticos ou mesmo probióticos podem ser formulados para impedir que haja uma queda destas durante a radioterapia, e deste modo isso contribua para evitar ou reduzir o grau da MO. Caso comprovada sua eficácia ela poderá inclusive ser administrada a todos os pacientes, independentemente da quantidade inicial destas bactérias.

Devemos ressaltar que assim como no módulo I, também tivemos limitações neste estudo. O número de pacientes não foi extenso, mas através dele conseguimos obter resultados promissores que indicam que a microbiota tem um papel importante na ocorrência da MO, e neste caso na proteção do hospedeiro. É necessário que estudos prospectivos sejam conduzidos para a partir da coleta pré-radioterapia já indicar os pacientes com maior risco de desenvolverem mucosite, e os acompanhar ao longo da radioterapia para ver se este marcador de risco é eficaz. Caso seja, medidas poderão ser tomadas para evitar a ocorrência desta complicação, melhorando a qualidade de vida do paciente, evitando a interrupção do tratamento por causa de MO e por fim, contribuindo para uma melhor sobrevida.

4.2.3.4 Comparação dos *swabs* controle e mucosite

Para avaliar possíveis diferenças entre as bactérias dependendo da região que o *swab* foi passado, analisamos os pacientes nos quais foram coletadas duas amostras no mesmo momento: um nas regiões de MO e o outro nas sem MO (controle). No momento VI houve 14 pacientes com essas duas coletas, e no VII houve 34. Na diversidade alfa não houve diferença significativa na coleta #6, porém na sétima coleta foi observado uma maior diversidade nas amostras da MO em comparação aos controles (Simpson, $p=0,043$) (**Figura 30**). Quando avaliado no LEfSe se as frequências das bactérias são diferentes entre as duas regiões de coletas, nenhuma diferença foi observada no momento VI e VII ($p>0,05$). Os resultados indicam que as diferentes regiões da boca apresentam a mesma diversidade e uma composição bacteriana bastante similar e de modo relativamente independentemente do local de desenvolvimento da MO. Isto sugere que quando a radiação atinge a boca, a disbiose que a mesma causa não é restrita ao local que ocorre a MO, mas aparentemente se estabelece em outros tecidos moles da boca (língua, assoalho, mucosa jugais e mucosas labiais). Ao fim da radioterapia, quando no pior grau de MO, parece haver uma maior diversidade nas coletas realizadas nas áreas de MO, porém a nível qualitativo não há diferença entre as bactérias.

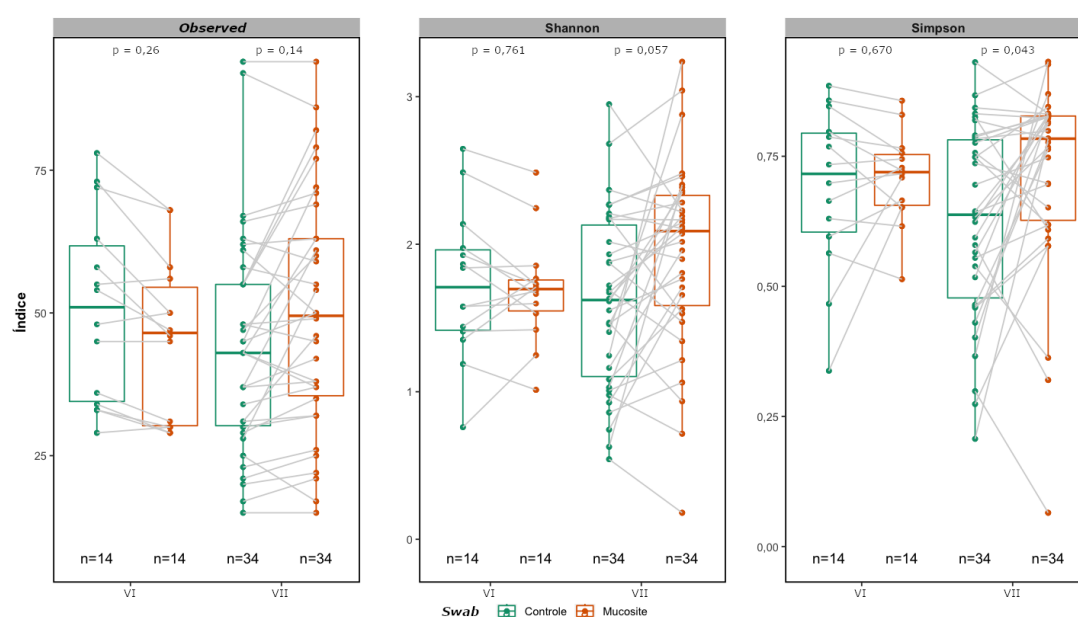


Figura 30 - Diversidade alfa a nível de OTU em relação ao *swab* coletado (controle e mucosite) nos momentos VI e VII (linhas cinzas conectam as amostras pareadas) (teste não paramétrico de Wilcoxon).

Trabalhos prévios^{4,70} descreveram que a microbiota oral difere dependendo do local da boca que foi avaliado, visto que as diferentes superfícies apresentam ecossistemas próprios com condições ótimas e nutrientes específicos para o crescimento de determinadas bactérias. Todavia, já foi relatado que a mucosa oral, em particular, apresenta uma colonização bacteriana mais limitada do que em outros sítios da cavidade oral, e o dorso da língua, em especial, que apresenta uma microbiota mais diversa por ser caracterizado por um epitélio papilado que favorece o crescimento de bactérias anaeróbicas^{156,157}. No nosso estudo não foi feita nenhuma coleta em dorso de língua, e mesmo assim, baseado no conceito de que a disbiose leva a um desequilíbrio em todo o ambiente⁶⁷, nossos achados indicam que a radiação ao atingir a cavidade oral causa uma disbiose microbiana geral na boca, ficando todo o ambiente oral com uma microbiota similar.

4.3 MÓDULOS I E II DO ESTUDO

Somando as coletas dos 21 pacientes que participaram das duas partes do estudo, totalizamos 184 amostras. Fizemos 38 coletas no momento I, pois na maioria dos pacientes coletamos dois *swabs*: um ao redor do tumor e outro em regiões comuns para MO (borda de língua, mucosas jugais e mucosas labiais) como já explicado. Essas coletas serviram como *baseline* antes de qualquer tratamento oncológico e para avaliarmos se haveria diferenças no resultado conforme o local da cavidade oral onde a coleta é feita. Destacamos que para apenas 1 paciente (#47) não coletamos amostra deste momento. Para outro caso (#62) também não fizemos a coleta *baseline* da radioterapia. Exclusivamente para o paciente #36, sua coleta *baseline* da radioterapia foi feita no mesmo dia da sua primeira coleta no estudo que foi no momento II (1 dia antes da cirurgia). Como nenhum tratamento oncológico ainda tinha sido feito, pudemos contabilizar esta amostra como *baseline* para a radioterapia. Em cada um dos momentos II, III, IV e V foram coletadas 21 amostras (somando 84 coletas) e, para as coletas VI e VII coletamos respectivamente 26 e 36 amostras. Este N final foi um pouco maior pois no momento #6 coletamos 2 amostras em 5 pacientes (*swab* mucosite e controle) e no momento #7 coletamos 2 amostras em 15 pacientes. A **Figura 31** descreve o tempo entre as coletas, considerando o dia da primeira coleta o D0 (coleta *baseline*).

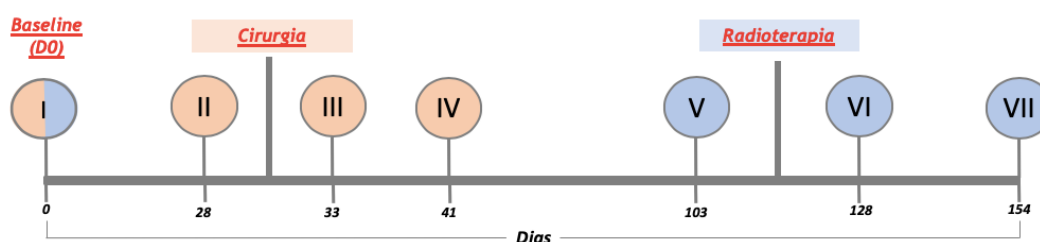


Figura 31 - Descrição da média de dias entre os momentos de coletas (I-VII) de acordo com o dia da primeira coleta (D0) (cor alaranjada e azulada são das coletas feitas para parte I e II do estudo, respectivamente).

Em média cada paciente foi acompanhado por 154 dias, que equivale a pouco mais de 5 meses. Desconhecemos outro estudo com tamanho tempo de seguimento para análise de metagenômica em pacientes com CB durante o tratamento. Estudos prévios se basearam ou no tratamento cirúrgico ou na radioterapia, e mesmo assim, de modo geral incluíram outros tumores de cabeça e pescoço na amostra^{89,102}. Embora tenhamos nos focado em avaliar nos módulos I e II as bactérias em relação a ISC e MO, respectivamente, é interessante observar o impacto que todo o tratamento oncológico possui na microbiota oral, independentemente destas duas complicações, para melhor entender como fatores externos influenciam na nossa microbiota.

4.3.1 Análise quantitativa das bactérias por PCR em tempo real

Antes de avaliarmos mudanças entre os CTs de todos os momentos de coleta, comparamos somente os dados de *baseline* (coleta I) da cirurgia e radioterapia. De modo particular, para o paciente #36 comparamos a amostra do *baseline* da radioterapia com a da cirurgia do momento II, pois estas foram coletadas no mesmo dia como explicado. Os pacientes #47 e #62 não puderam ser considerados nesta análise por não terem essas duas amostras, e assim 19 pacientes foram incluídos (90,5%). De acordo com os resultados observados na **Tabela 23**, nas coletas realizadas para a radioterapia, a quantidade de DNA bacteriano presente nos *swabs* foi menor do que nas coletas para a cirurgia ($p=0,030$), levando a uma diminuição na razão entre o DNA bacteriano:humano ($p=0,009$). Isso pode ocorrer porque os pacientes com CB por muitas vezes sentem intensa dor na boca não conseguem fazer a higienização de modo adequado¹⁵⁸, principalmente em região próxima ao tumor o que facilita a colonização e a presença de mais bactérias nesta área levando a diferenças na quantidade de DNA conforme a região coletada.

Tabela 23 - Avaliação do CT em relação aos *swabs* da coleta I (*baseline*) da cirurgia e radioterapia.

Swab - coleta I (baseline)	n	Média (DP)	Mediana (min-max)	Valor de p^1
CT do 16S-V1				
Cirurgia	19	18,23 (2,49)	18,57 (13,80-24,18)	0,030*
Radioterapia	19	19,27 (1,97)	19,11 (13,73-23,07)	
CT da beta-actina				
Cirurgia	19	28,04 (1,49)	27,91 (26,36-32,01)	0,107
Radioterapia	19	27,70 (1,58)	27,19 (25,76-31,36)	
Razão dos Cts (beta-actina/16S-V1)				
Cirurgia	19	1,56 (0,23)	1,59 (1,16-2,10)	0,009*
Radioterapia	19	1,46 (0,18)	1,44 (1,15-1,98)	

¹: Teste não paramétrico de Wilcoxon; *: valor de p estatisticamente significativo; DP: desvio padrão; IC: intervalo de confiança; min: mínimo; max: máximo

Em seguida, avaliamos os CTs dos pacientes em cada coleta. Como a proposta deste terceiro módulo não foi avaliar a ISC ou MO nos consideramos todas as amostras, independentemente da região que foi coletada. Em uma primeira análise somamos todas as coletas *baseline*, e as dos momentos VI e VII (controle e mucosite nestes casos). Nesta primeira avaliação vimos que o CT bacteriano aumenta bastante na coleta IV (indicando uma grande redução de bactérias orais logo após a cirurgia), porém depois seus valores ficam próximos do CT da coleta inicial (**Apêndice 3**). Para observar melhor essas flutuações fizemos uma análise pareada. Para esta avaliação, cada paciente só podia ter 1 coleta/momento. Para não descartamos nenhuma amostra, quando o paciente tinha mais de uma coleta no mesmo momento fizemos uma média dos CTs de ambas coletas. Apenas o paciente #47 não pode ser incluído nesta análise por não ter a coleta I, e assim ficamos com 20 amostras em cada ponto de coleta (**Figura 32**). Na figura apenas deixamos descritos os valores que foram significativamente diferentes.

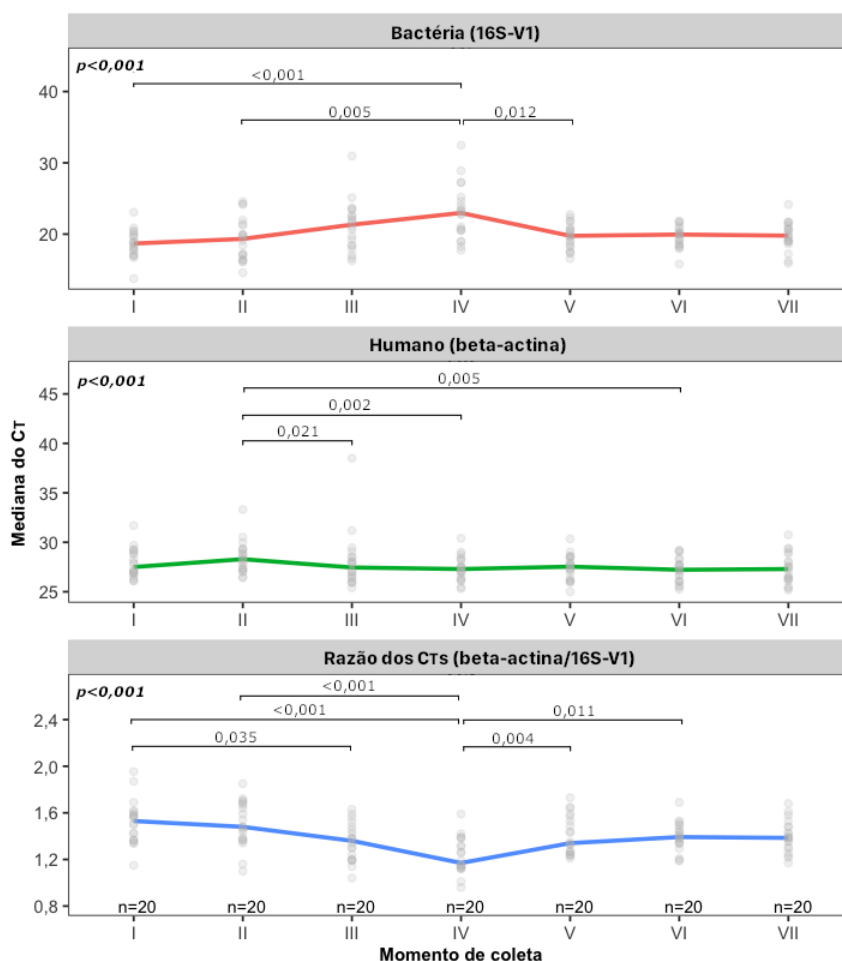


Figura 32 – Gráfico de perfil dos CTs (bacteriano, humano e sua razão) ao longo dos sete momentos de coleta (I a VII) (linhas contínuas vermelha, verde e azul representam mediana).

Em relação à quantidade de DNA bacteriano vimos uma diferença entre as coletas IV e as pré-operatórias (I e II), como já tínhamos observado no módulo I, e entre as coletas IV e V. Por outro lado, não houve diferença entre as coletas da radioterapia (V-VII) e as amostras I, II e III da cirurgia. Isto indica que com a cirurgia, como já concluímos no módulo I, há uma diminuição da quantidade de bactéria provavelmente devido à assepsia peri-operatória, antibioticoterapia profilática e excisão do tumor que leva em conjunto as bactérias aderida ao tecido. Porém, a quantidade de DNA bacteriano já se apresenta similar a coleta inicial antes de começar a radioterapia, não sendo observada nenhuma diferença entre as coletas I e V. Quanto à quantidade de DNA humano foi observada uma diminuição entre as coletas pré (II) e pós-operatórias (III e IV), como já observado anteriormente. Além disso, foi observada uma diferença entre os CTs nas coletas II e VI, sugerindo que houve uma menor quantidade de DNA humano na coleta II do que na VI que poderia ser explicado pela forte ação inflamatória que a radiação gera sobre o tecido no começo da radioterapia,

ativando de citocinas, interleucinas e fator nuclear kappa-B como resposta q este fator externo¹⁵⁹, e consequentemente aumenta a quantidade de DNA.

4.3.2 Análise da composição bacteriana pelo sequenciamento do gene do 16S-rDNA

4.3.2.1 Diversidade alfa

As duas coletas de *baseline* que foram feitas no pré-operatório foram comparadas com a mesma finalidade da PCR em tempo real. Não observamos diferenças em relação à diversidade alfa (**Figura 33**) ou na análise da composição bacteriana pelo LEfSe ($p>0,05$). Estes resultados indicam que embora a qPCR tenha mostrado uma diferença entre a quantidade de DNA bacteriano entre essas duas coletas, a diversidade e a composição da microbiota bacteriana nestes momentos não parecem ser alteradas, sendo este resultado similar ao observado entre as coletas de controle e mucosite na radioterapia. Além disso, este resultado está de acordo com o achado de Shin et al.¹⁶⁰ que relatou não ser possível identificar através de modelos de predição as amostras de tecido tumoral e os tecidos contra-laterais saudáveis com base na microbiota oral. Considerando que indivíduos saudáveis apresentam uma microbiota diferente dependendo do sítio em cavidade oral e que um paciente com CB apresenta um desequilíbrio microbiano devido à doença^{4,70}, concluímos que a disbiose gerada pelo tumor se propague para os demais tecidos moles da boca.

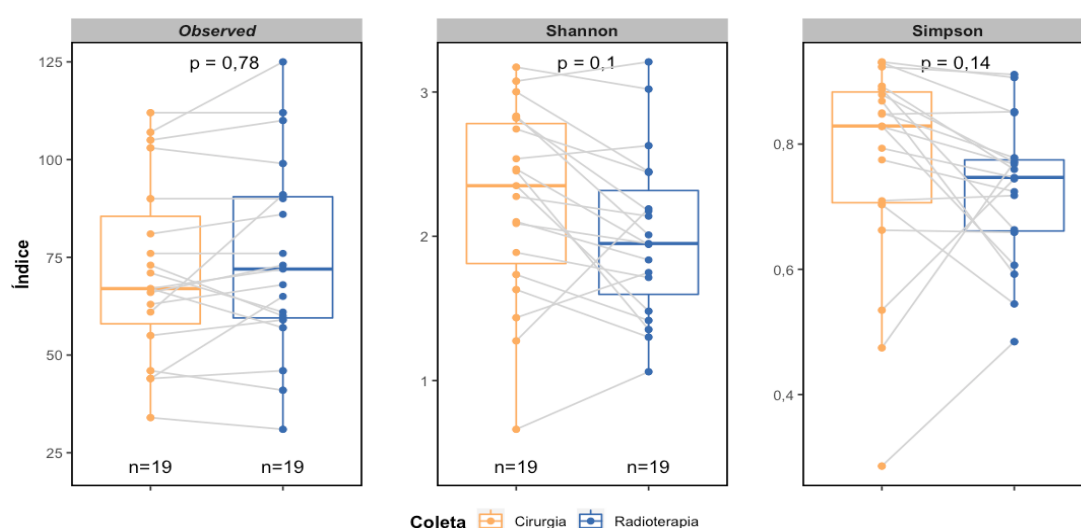


Figura 33 - Diversidade alfa (*Observed*, *Shannon* e *Simpson*) a nível de OTU em relação à região de coleta do momento I (cirurgia – ao redor do tumor e radioterapia – regiões comuns de ter mucosite) (linhas cinzas conectam as amostras pareadas) (teste não paramétrico de Wilcoxon).

4.3.2.2 Bactérias: frequências e resultados estatísticos

Para o conjunto das 184 amostras observamos 16 filos, 24 classes, 41 ordens, 82 famílias, 186 gêneros e 505 espécies. Considerando todo este conjunto de dados, os três gêneros mais abundantes foram *Streptococcus* (36,9%), *Prevotella* (11,2%) e *Neisseria* (8,4%) (**Figura 34**). Essas três bactérias são frequentes na cavidade oral, e já foram vistas dentre as bactérias mais abundantes em pacientes com CB^{83,161,162}. As 10 bactérias mais prevalentes somaram 87,65% da massa de DNA, novamente indicando o grande domínio da microbiota oral por alguns poucos gêneros bacterianos.

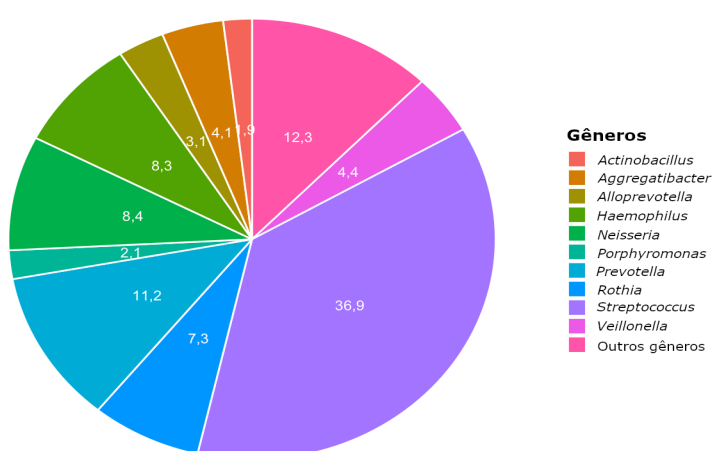


Figura 34 - Frequências dos gêneros mais abundantes do módulo I e II do estudo.

Considerando os 10 gêneros mais abundantes de cada ponto de coleta, observamos que 19 gêneros diferentes compunham esta lista. Foi feita uma figura considerando a soma de todas as amostras (**Apêndice 4**) como fizemos primeiramente na PCR em tempo real também, e para melhor avaliar a flutuação destes ao longo das coletas foi feita uma análise pareada (**Figura 35**). De modo geral, observamos que apesar da cirurgia influenciar a frequência de várias bactérias (variação entre as coletas I e II x III e IV), com diferenças significativas para as bactérias *Eikenella*, *Fusobacterium*, *Granulicatella*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Streptococcus* e *Veillonella*. Estas diferenças aparentemente se recompõem antes do início da radioterapia tendo uma frequência semelhante ao da coleta *baseline*. *Fusobacterium* foi a única bactéria que ainda continuou apresentando diferenças. Entre as coletas da radioterapia (coletas V e VII) não observamos diferenças, uma aparente manutenção da microbiota durante o tratamento. Para a maioria das bactérias (*Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Corynebacterium*, *Gemella*, *Haemophilus*,

Neisseria, *Prevotella*, *Proteus* e *Pseudomonas*), não vimos variações significativas em nenhum momento, indicando estabilidade ao longo do tratamento.

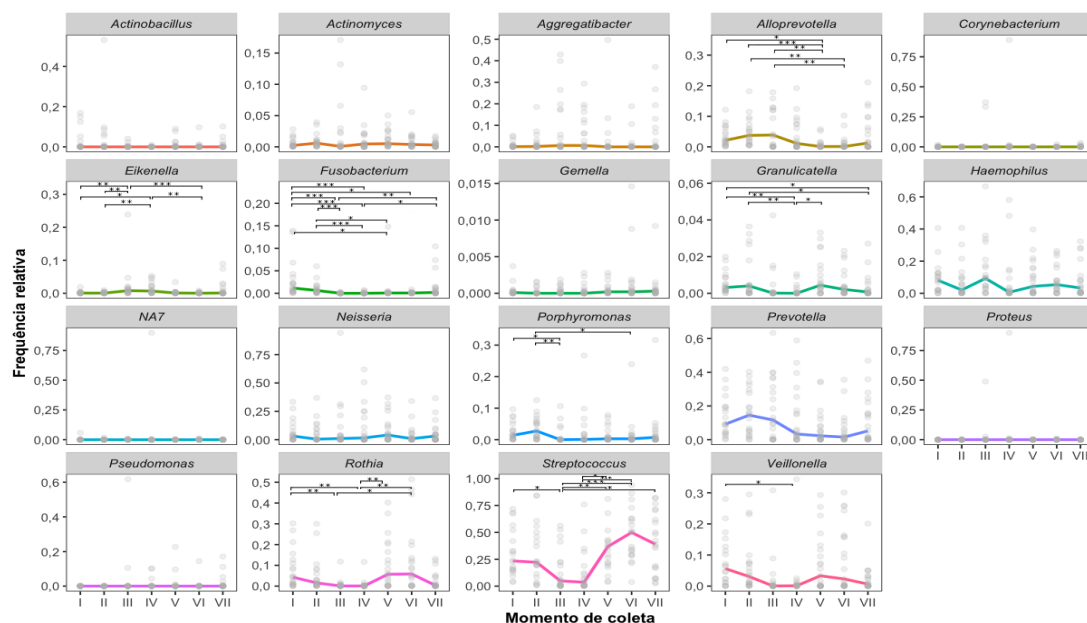


Figura 35 - Frequência relativa (log2) dos 19 gêneros mais abundantes dos módulos I e II do estudo ao longo dos momentos de coleta (I a VII).

Esses dados indicam que no tratamento oncológico as principais alterações na microbiota ocorrem logo após a cirurgia. Isto permite concluir que, de modo independente da ocorrência de complicações pós-operatórias como a ISC, mudanças na frequência das bactérias ocorrem normalmente devido ao procedimento cirúrgico. Quando considerada a presença de ISC mudanças ainda mais específicas podem ser observadas nas coletas dentre as quais o aumento da *Aggregatibacter* após a cirurgia, sendo um fator de risco para ISC como observamos anteriormente. Além disso, foi interessante notar que independentemente da ISC, antes do início da radioterapia a maioria das bactérias tem sua frequência restabelecida se tornando similar ao momento inicial (coleta I). O tratamento radioterápico, por outro lado, não parece alterar muito a microbiota. Embora algumas bactérias tenham uma flutuação ao longo da radioterapia, não observamos diferenças estatísticas entre os momentos V a VII. Em contrapartida, diferentes frequências das bactérias podem ser observadas quando inserimos o fator MO na radioterapia. Como observamos no módulo II, a maior quantidade de *Actinomyces* e *Granulicatella* antes da radioterapia iniciar, por exemplo, indica um maior risco do paciente desenvolver MO severa.

5 CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÕES DO MÓDULO I

- Estágio clínico avançado, esvaziamento cervical, reconstrução cirúrgica e maior tempo de cirurgia foram associados com a ocorrência de ISC. Pacientes com tumores maiores e estágio clínico III/IV apresentaram 6,5 e 9,3 vezes mais chance de desenvolver ISC do que os pacientes com tumores menores e estágio I/II;
- A quantidade de DNA bacteriano e humano não diferencia pacientes que vão ou não desenvolver ISC;
- Pacientes com ISC apresentam uma maior diversidade da microbiota oral do que os pacientes que não desenvolveram ISC;
- No momento da ISC, *Prevotella* e *Porphyromonas* representaram cerca de 40% dos *reads* nos pacientes com infecção, comparado a 9,45% nos pacientes sem infecção. Isto sugere que estas bactérias tenham uma participação na ISC sendo uma causa secundária desta complicação devido a uma disbiose prévia;
- Nossos resultados indicam que a *Aggregatibacter* está associada com o desenvolvimento da ISC, podendo ser uma possível causa primária desta complicação. Sua maior frequência em até 5 dias após a cirurgia, indica uma maior chance (5,67 vezes) de ISC, podendo ser uma possível via para identificar pacientes em maior risco, podendo esta informação auxiliar uma conduta precoce que impeça esta complicação.

5.2 CONCLUSÕES DO MÓDULO II

- Dados clínicos não indicaram pacientes com maiores chances de MO severa;
- Pacientes que desenvolveram uma MO severa tiveram uma diminuição na quantidade de bactérias ao longo da radioterapia. Esta perda pode ter ocorrido devido a uma disbiose causada pela radiação que favoreceu a ocorrência da MO severa;

- A diversidade microbiana dos pacientes com MO severa é maior do que os pacientes com MO ausente/leve. Além disso, a composição bacteriana entre os dois grupos é diferente desde antes o início da radioterapia;
- No momento do pior grau de MO, os gêneros *Selenomonas*, *Anaeroglobus* e *Eubacterium nodatum group* apresentaram maior abundância nos pacientes com MO severa em relação aos com MO ausente/leve. Mesmo assim, as frequências dessas bactérias foram baixas na MO severa, sugerindo que elas não necessariamente piorem o quadro de MO, mas são uma provável consequência da disbiose causada pela radiação;
- A presença de uma maior quantidade de *Actinomyces* e *Granulicatella* antes do início da radioterapia aumentou em 20,5 vezes a chance do paciente desenvolver uma MO severa. Estas bactérias são promissoras na identificação de pacientes com maior risco de desenvolver MO severa, podendo ter algum papel na prevenção deste quadro;
- Não há diferenças entre a composição bacteriana em relação aos locais com e sem MO o que sugere que a radiação causa uma disbiose global na cavidade oral.

5.3 CONCLUSÕES DOS MÓDULOS I E II

Considerando os pacientes que participaram no módulo I e II do estudo foi observado que:

- A cirurgia reduz a quantidade de DNA bacteriano, e aumenta a quantidade de DNA humano. Provavelmente isto ocorre devido ao uso de antibióticos profiláticos, remoção de tecido mole/duro nas cirurgias e aumento na quantidade de células inflamatórias na boca após a cirurgia, talvez atue de modo importante para o reparo das feridas cirúrgicas;
- A quantidade de DNA bacteriano e humano antes do início da radioterapia se apresentam semelhantes às suas coletas pré-operatórias sugerindo o seu restabelecimento, e durante a radioterapia as quantidades de DNA bacteriano e humano tendem a não variar.

- Não há diferenças entre a composição bacteriana em relação ao local de coleta realizado antes de qualquer tratamento oncológico o que sugere que o tumor gera uma disbiose que afeta toda a cavidade oral.
- Em relação aos gêneros bacterianos observamos que algumas bactérias sofrem grandes variações de frequência causadas pela cirurgia, enquanto outros se mantêm estáveis ao longo de todo o tratamento. Na radioterapia, não houve alterações significativas.
- Independentemente da ISC, mudanças na microbiota parecem ocorrer com a cirurgia, enquanto na radioterapia nenhuma mudança evidente é observada quando desconsiderada a MO.

6 REFERÊNCIAS

1. Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer - An appraisal of controversies. *Br Dent J*. 2009;207(10):471–5.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
3. Huber MA, Tantiwongkosi B. Oral and Oropharyngeal Cancer. *Med Clin North Am*. 2014;98(6):1299–321.
4. Chen SW, Zhang Q, Guo ZM, Chen WK, Liu WW, Chen YF, et al. Trends in clinical features and survival of oral cavity cancer: Fifty years of experience with 3,362 consecutive cases from a single institution. *Cancer Manag Res*. 2018;10:4523–35.
5. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):309–16.
6. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa/2020 incidência de câncer no Brasil. 2020. Disponível em: <https://bit.ly/35XxSW0Mi>
7. Mehanna H, Paleri V, West CML, Nutting C. Head and neck cancer-Part 1: Epidemiology, presentation, and preservation. *Clin Otolaryngol*. 2011;36(1):65–8.
8. Anantharaman D, Marron M, Lagiou P, Samoli E, Ahrens W, Pohlabein H, et al. Population attributable risk of tobacco and alcohol for upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(8):725–31.
9. Asthana S, Vohra P, Labani S. Association of smokeless tobacco with oral cancer: A review of systematic reviews. *Tob Prev Cessat*. 2019;5:1–12.
10. Dalianis T. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (review). *Int J Oncol*. 2014;45(6):1799–805.
11. Kumar M, Nanavati R, Modi T, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *J Cancer Res Ther*. 2016;12(2):458–63.
12. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):491–508.

13. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94.
14. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002;95(12):2524–33.
15. Dantas DDL, Ramos CCF, Costa ALL, Souza LB de, Pinto LP. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. *Braz Dent J*. 2003;14(1):22–5.
16. Fuentes B, Duaso J, Droguett D, Castillo C, Donoso W, Rivera C, et al. Progressive Extracellular Matrix Disorganization in Chemically Induced Murine Oral Squamous Cell Carcinoma. *ISRN Pathol*. 2012;2012:1–7.
17. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, et al. Improving the TNM classification: Findings from a 10-year continuous literature review. *Int J Cancer*. 2014;135(2):371–8.
18. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93–9.
19. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Piccirillo JF, Haigentz M, Suárez C, et al. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. Eisele DW, editor. *Head Neck*. 2010;32(12):1693–711.
20. Hanna GJ, Haddad RI, Lorch JH. Induction Chemotherapy for Locoregionally Advanced Head and Neck Cancer: Past, Present, Future? *Oncologist*. 2013;18(3):288–93.
21. Bauml JM, Aggarwal C, Cohen RB. Immunotherapy for head and neck cancer: where are we now and where are we going? *Ann Transl Med*. 2019;7(S3):S75–S75.
22. De Melo GM, De Cássia Braga Ribeiro K, Kowalshi LP, Deheinzelin D. Risk factors for postoperative complications in oral cancer and their prognostic implications. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2001;127(7):828–33.
23. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1856–67.
24. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: a modification of CDC definitions of

- surgical wound infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1992;13(10):606–8.
25. Lee DH, Kim SY, Nam SY, Choi SH, Choi JW, Roh JL. Risk factors of surgical site infection in patients undergoing major oncological surgery for head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2011;47(6):528–31.
 26. Belusic-Gobic M, Zubovic A, Cerovic R, Dekanic A, Marzic D, Zamolo G. Multivariate analysis of risk factors for postoperative wound infection following oral and oropharyngeal cancer surgery. *J Cranio-Maxillofacial Surg*. 2018;46(1):135–41.
 27. Grandis JR, Snyderman CH, Johnson JT, Yu VL, D’Amico F. Postoperative wound infection. A poor prognostic sign for patients with head and neck cancer. *Cancer*. 1992;70(8):2166–70.
 28. de Lissovoy G, Fraeman K, Hutchins V, Murphy D, Song D, Vaughn BB. Surgical site infection: Incidence and impact on hospital utilization and treatment costs. *Am J Infect Control*. 2009;37(5):387–97.
 29. Mu Y, Edwards JR, Horan TC, Berrios-Torres SI, Fridkin SK. Improving risk-adjusted measures of surgical site infection for the national healthcare safety network. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(10):970–86.
 30. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N Engl J Med*. 2014;370(13):1198–208.
 31. Penel N, Fournier C, Lefebvre D, Lefebvre JL. Multivariate analysis of risk factors for wound infection in head and neck squamous cell carcinoma surgery with opening of mucosa. Study of 260 surgical procedures. *Oral Oncol*. 2005;41(3):294–303.
 32. Lotfi CJ, Cavalcanti R de C, Silva AMC e., Dias de Oliveira Latorre M do R, de Cássia Braga Ribeiro K, Carvalho AL, et al. Risk factors for surgical-site infections in head and neck cancer surgery. *Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2008;138(1):74–80.
 33. Liu SA, Wong YK, Poon CK, Wang CC, Wang CP, Tung KC. Risk factors for wound infection after surgery in primary oral cavity cancer patients. *Laryngoscope*. 2007;117(1):166–71.
 34. Karakida K, Aoki T, Ota Y, Yamazaki H, Otsuru M, Takahashi M, et al. Analysis of risk factors for surgical-site infections in 276 oral cancer surgeries with microvascular free-flap reconstructions at a single university hospital. *J Infect Chemother*. 2010;16(5):334–9.

35. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control*. 1999;27(2):97–132.
36. de Carvalho RLR, Campos CC, Franco LM de C, Rocha A de M, Ercole FF. Incidence and risk factors for surgical site infection in general surgeries. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2017;25:e2848.
37. Mazurek MJ, Rysz M, Jaworowski J, Nowakowski F, Krajewski R, Starościak S, et al. Contamination of the surgical field in head and neck oncologic surgery. *Head Neck*. 2013;36(10).
38. Chaukar DA, Deshmukh AD, Majeed T, Chaturvedi P, Pai P, D’cruz AK. Factors affecting wound complications in head and neck surgery: A prospective study. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2013;34(4):247–51.
39. Ogiwara H, Takeuchi K, Majima Y. Risk factors of postoperative infection in head and neck surgery. *Auris Nasus Larynx*. 2009;36(4):457–60.
40. Johnson JT, Myers EN, Thearle PB, Sigler BA, Schramm VL. Antimicrobial prophylaxis for contaminated head and neck surgery. *Laryngoscope*. 1984;125(2):275–80.
41. Raine CH, Bartzokas CA, Stell PM, Gallway A, Corkill JE. Chemoprophylaxis in major head and neck surgery. *J R Soc Med*. 1984;77(12):1006–9.
42. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, et al. Clinical Practice Guidelines for Antimicrobial Prophylaxis in Surgery. *Surg Infect (Larchmt)*. 2013;14(1):73–156.
43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surgical Site Infection (SSI) Event definitions. 2014. Disponível em: <https://bit.ly/2xQ87do>
44. Akashi M, Kusumoto J, Sakakibara A, Hashikawa K, Furudoi S, Komori T. Literature Review of Criteria for Defining Recipient-Site Infection after Oral Oncologic Surgery with Simultaneous Reconstruction. *Surg Infect (Larchmt)*. 2017;18(7):755–64.
45. Cannon RB, Houlton JJ, Mendez E, Futran ND. Methods to reduce postoperative surgical site infections after head and neck oncology surgery. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):e405–13.
46. Heinzelmann M, Scott M, Lam T. Factors predisposing to bacterial invasion and infection. *Am J Surg*. 2002;183(2):179–90.

47. Nichols RL, Florman S. Clinical Presentations of Soft-Tissue Infections and Surgical Site Infections. *Clin Infect Dis*. 2001;33(s2):S84–93.
48. Fraioli R, Johnson JT. Prevention and treatment of postsurgical head and neck infections. *Curr Infect Dis Rep*. 2004;6(3):172–80.
49. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, et al. 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*. 2003;66(3):253–62.
50. Lalla R V., Peterson DE. Oral mucositis. *Dent Clin North Am*. 2005;49(1):167–84.
51. Trotti A. Toxicity in head and neck cancer: A review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;47(1):1–12.
52. Lalla R V, Saunders DP, Peterson DE, Rcseda FDS. Chemotherapy or Radiation-Induced Oral Mucositis Oral mucositis Stomatitis Cancer Chemotherapy Radiation therapy. 2014;58:341–9.
53. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla R V., Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med*. 2017;6(12):2918–31.
54. Chen SC, Lai YH, Huang BS, Lin CY, Fan KH, Chang JTC. Changes and predictors of radiation-induced oral mucositis in patients with oral cavity cancer during active treatment. *Eur J Oncol Nurs*. 2015;19(3):214–9.
55. Organização Mundial da Saúde (OMS). Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment. Offset publication. Geneva: Offset publication; 1979. p.15–21
56. National Cancer Institute (NCI). Division of Cancer Treatment and Diagnosis. Common toxicity criteria (CTC) Version 2.0. 1999. Disponível em: <https://bit.ly/3conzwv>
57. Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, Sonis S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma: Risk factors and clinical consequences. *Cancer*. 2006;106(2):329–36.
58. Nishii M, Soutome S, Kawakita A, Yutori H, Iwata E, Akashi M, et al. Factors associated with severe oral mucositis and candidiasis in patients undergoing radiotherapy for oral and oropharyngeal carcinomas: a retrospective multicenter study of 326 patients. *Support Care Cancer*. 2020;28(3):1069–75.

59. Tao Z, Gao J, Qian L, Huang Y, Zhou Y, Yang L, et al. Factors associated with acute oral mucosal reaction induced by radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective single-center experience. *Medicine (United States)*. 2017;96(50):e8446.
60. Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS. Risk, Outcomes, and Costs of Radiation-Induced Oral Mucositis Among Patients With Head-and-Neck Malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2007;68(4):1110–20.
61. Perch SJ, Machtay M, Markiewicz DA, Kligerman MM. Decreased acute toxicity by using midline mucosa-sparing blocks during radiation therapy for carcinoma of the oral cavity, oropharynx, and nasopharynx. *Radiology*. 1995;197(3):863–6.
62. Yarom N, Ariyawardana A, Hovan A, Barasch A, Jarvis V, Jensen SB, et al. Systematic review of natural agents for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013;21(11):3209–21.
63. Lalla R V., Sonis ST, Peterson DE. Management of Oral Mucositis in Patients Who Have Cancer. *Dent Clin North Am*. 2008;52(1):61–77.
64. Lopes LD, Rodrigues AB, Brasil DRM, Moreira MMC, Amaral JG, Oliveira PP de. Prevention and treatment of mucositis at an oncology outpatient clinic: a collective construction. *Texto Context - Enferm*. 2016;25(1):1–9.
65. Lalla R V., Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2014;120(10):1453–61.
66. Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):122–8.
67. Sudhakara P, Gupta A, Bhardwaj A, Wilson A. Oral dysbiotic communities and their implications in systemic diseases. *Dent J*. 2018;6(2):1–14.
68. Chen T, Yu W-Han, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, et al. Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information 2010;2010:baq013.
69. Hilton SK, Castro-Nallar E, Pérez-Losada M, Toma I, McCaffrey TA, Hoffman EP, et al. Metataxonomic and metagenomic approaches vs. culture-based techniques for clinical pathology. *Front Microbiol*. 2016;7:1–12.

70. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5721–32.
71. Patel J. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagnosis*. 2001;6(4):313–21.
72. Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic Pyrosequencing and Microbial Identification. *Clin Chem*. 2009;55(5):856–66.
73. Renvoisé A, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V, Aubry A. Broad-range PCR: Past, present, or future of bacteriology? *Med Mal Infect*. 2013;43(8):322–30.
74. Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. *Curr Protoc Microbiol*. 2012;Chapter 1:Unit 1E.5.
75. Lande R. Statistics and Partitioning of Species Diversity, and Similarity among Multiple Communities. *Oikos*. 1996;76(1):5.
76. Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, Knight R. Quantitative and qualitative β diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(5):1576–85.
77. Bray JR, Curtis JT. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol Monogr*. 1957;27(4):325–49.
78. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJF. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: Current perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:1–8.
79. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):647–54.
80. Neut C. Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2002;97(4):939–46.
81. Strauss J, Kaplan GG, Beck PL, Rioux K, Panaccione R, DeVinney R, et al. Invasive potential of gut mucosa-derived fusobacterium nucleatum positively correlates with IBD status of the host. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(9):1971–8.
82. Gao W, Weng J, Gao Y, Chen X. Comparison of the vaginal microbiota diversity of women with and without human papillomavirus infection: A cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):271.
83. Marsh PD. Role of the Oral Microflora in Health. *Microb Ecol Health Dis*. 2000 Jan 11;12(3):130–7.

84. Al-hebshi NN, Nasher AT, Maryoud MY, Homeida HE, Chen T, Idris AM, et al. Inflammatory bacteriome featuring *Fusobacterium nucleatum* and *Pseudomonas aeruginosa* identified in association with oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2017;7(1):1834.
85. Perera M, Al-hebshi NN, Perera I, Ipe D, Ulett GC, Speicher DJ, et al. Inflammatory Bacteriome and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res*. 2018;97(6):725–32.
86. Robledo-Sierra J, Ben-Amy DP, Varoni E, Bavarian R, Simonsen JL, Paster BJ, et al. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the oral microbiome Part 2: Current knowledge on malignant and potentially malignant oral disorders. *Oral Dis*. 2019;25(S1):28–48.
87. Belusic-Gobic M, Car M, Juretic M, Cerovic R, Gobic D, Golubovic V. Risk factors for wound infection after oral cancer surgery. *Oral Oncol*. 2007;43(1):77–81.
88. Fisher JF, Mobashery S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein Sci*. 2020;29(3):629–46.
89. Hauser LJ, Ir D, Kingdom TT, Robertson CE, Frank DN, Ramakrishnan VR. Investigation of bacterial repopulation after sinus surgery and perioperative antibiotics. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2016;6(1):34–40.
90. Laheij AMGA, de Soet JJ, Veerman ECI, Bolscher JGM, van Loveren C. The Influence of Oral Bacteria on Epithelial Cell Migration In Vitro. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:1–6.
91. Candau-Alvarez A, Linares-Sicilia MJ, Dean-Ferrer A, Pérez-Navero JL. Role of culture of postoperative drainage fluid in the prediction of infection of the surgical site after major oncological operations of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2015;53(2):200–3.
92. Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20(1):11–5.
93. Chiappelli F. The molecular immunology of mucositis: Implications for evidence-based research in alternative and complementary palliative treatments. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2005;2(4):489–94.
94. Wang Y, Zhou X, Xu X. Oral microbiota: An overlooked etiology for chemotherapy-induced oral mucositis? *J Formos Med Assoc*. 2015;114(4):297–9.
95. Laheij AMGA, De Soet JJ, Von Dem Borne PA, Kuijper EJ, Kraneveld EA, Van Loveren C, et al. Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic

- stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer*. 2012;20(12):3231–40.
96. Ye Y, Carlsson G, Barr Agholme M, Wilson JAL, Roos A, Henriques-Normark B, et al. Oral bacterial community dynamics in paediatric patients with malignancies in relation to chemotherapy-related oral mucositis: a prospective study. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(12):E559–67.
 97. McGuire DB, Fulton JS, Park J, Brown CG, Correa MEP, Eilers J, et al. Systematic review of basic oral care for the management of oral mucositis in cancer patients. *Support Care Cancer*. 2013;21(11):3165–77.
 98. Saunders DP, Rouleau T, Cheng K, Yarom N, Kandwal A, Joy J, et al. Systematic review of antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, and analgesics for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer*. 2020;28(5):2473-84.
 99. Laheij AMGA, de Soet JJ. Can the oral microflora affect oral ulcerative mucositis? *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014;8(2):180–7.
 100. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373–84.
 101. Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009;227(1):106–28.
 102. Vasconcelos RM, Sanfilippo N, Paster BJ, Kerr AR, Li Y, Ramalho L, et al. Host-Microbiome Cross-talk in Oral Mucositis. *J Dent Res*. 2016;95(7):725–33.
 103. Zhu XX, Yang XJ, Chao YL, Zheng HM, Sheng HF, Liu HY, et al. The Potential Effect of Oral Microbiota in the Prediction of Mucositis During Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma. *EBioMedicine*. 2017;18:23–31.
 104. Yancik R, Havlik RJ, Wesley MN, Ries L, Long S, Rossi WK, et al. Cancer and comorbidity in older patients: a descriptive profile. *Ann Epidemiol*. 1996;6(5):399–412.
 105. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. Head and Neck. In: Springer, editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7rd ed. Chicago; 2010. p. 29–40.
 106. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Adult Tobacco Use Information. 2017. Disponível em: <https://bit.ly/3dC1Q4u>
 107. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Adult Alcohol Use Information. 2018. Disponível em: <https://bit.ly/3dDTARc>

108. Klein H, Palmer C. Dental caries in American Indian children. *Public Heal Bull.* 1937;239:1–53.
109. Lindhe J, Nyman S. Exames em pacientes com doença periodontal. In: Karring T, Lang N, editores. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral.* 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2005. p.271–80.
110. Hurwitz EE, Simon M, Vinta SR, Zehm CF, Shabot SM, Minhajuddin A, et al. Adding Examples to the ASA-Physical Status Classification Improves Correct Assignment to Patients. *Anesthesiology.* 2017;126(4):614–22.
111. Min JL, Lakenberg N, Bakker-Verweij M, Suchiman E, Boomsma DI, Slagboom PE, et al. High microsatellite and SNP genotyping success rates established in a large number of genomic DNA samples extracted from mouth swabs and genotypes. *Twin Res Hum Genet.* 2006;9(4):501–6.
112. Christoff AP, Fernanda A, Sereia R, Rodrigues D, Lucio R, Moraes V De, et al. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. *Neoprosecta Microbiome Technol.* 2017:1–5.
113. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved dataprocessing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D590-6.
114. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011;12(6):R60.
115. Panda S, Nayak BB, Manjunath NML, Panda K, Pathi PC. Epidemiological Features and Management of Oral Cancer Patients: Experience from a Single Private Comprehensive Cancer Care Center in the State of Odisha. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019;71(s1):358–62.
116. Choi SW, Thomson P. Increasing incidence of oral cancer in Hong Kong—Who, where...and why? *J Oral Pathol Med.* 2019;48(6):483–90.
117. Zhang SK, Zheng R, Chen Q, Zhang S, Sun X, Chen W. Oral cancer incidence and mortality in China, 2011. *Chinese J Cancer Res.* 2015;27(1):44–51.
118. Varley AJ, Sule J, Absalom AR. Principles of antibiotic therapy. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain.* 2009;9(6):184–8.
119. Dohmen PM, Konertz W. A review of current strategies to reduce intraoperative bacterial contamination of surgical wounds. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.*

- 2007;2(2):Doc38.
120. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35–43.
 121. Poretsky R, Rodriguez-R LM, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One.* 2014;9(4):e93827.
 122. Bowler PG. The 10(5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. *Ostomy Wound Manage.* 2003;49(1):44–53.
 123. Wysocki AB. Evaluating and managing open skin wounds: colonization versus infection. *AACN Clin Issues.* 2002;13(3):382–97.
 124. Sun B, Zhou D, Tu J, Lu Z. Evaluation of the Bacterial Diversity in the Human Tongue Coating Based on Genus-Specific Primers for 16S rRNA Sequencing. *Biomed Res Int.* 2017;2017:8184160.
 125. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007;71(4):653–70.
 126. Mikx FH, Van der Hoeven JS. Symbiosis of *Streptococcus mutans* and *Veillonella alcalescens* in mixed continuous cultures. *Arch Oral Biol.* 1975;20(7):407–10.
 127. Hillman JD, Socransky SS, Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1985;30(11–12):791–5.
 128. Yang SF, Huang H Da, Fan WL, Jong YJ, Chen MK, Huang CN, et al. Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer. *Oral Oncol.* 2018;77(200):1–8.
 129. Belstrøm D, Holmstrup P, Bardow A, Kokaras A, Fiehn NE, Paster BJ. Temporal stability of the salivary microbiota in oral health. *PLoS One.* 2016;11(1):1–9.
 130. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and Time. *Science (80-).* 2009;326(5960):1694–7.
 131. David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, et al. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol.* 2014;15(7):R89.
 132. Summanen PH, Talan DA, Strong C, McTeague M, Bennion R, Thompson JE, et al. Bacteriology of skin and soft-tissue infections: comparison of infections in

- intravenous drug users and individuals with no history of intravenous drug use. *Clin Infect Dis*. 1995;20(2):S279-82.
133. Brook I, Frazier EH. The aerobic and anaerobic bacteriology of perirectal abscesses. *J Clin Microbiol*. 1997;35(11):2974–6.
 134. Duerden BI. Virulence factors in anaerobes. *Clin Infect Dis*. 1994 May;18(4):S253-9.
 135. Nóbrega LMM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MAP, Gomes BPFA. Molecular identification of cultivable bacteria from infected root canals associated with acute apical abscess. *Braz Dent J*. 2016;27(3):318–24.
 136. Oliveira RRDS, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FRF, Soares GMS, et al. Levels of candidate periodontal pathogens in subgingival biofilm. *J Dent Res*. 2016;95(6):711–8.
 137. Das M, Badley AD, Cockerill FR, Steckelberg JM, Wilson WR. Infective endocarditis caused by HACEK microorganisms. *Annu Rev Med*. 1997;48:25–33.
 138. Wang CY, Wang HC, Li JM, Wang JY, Yang KC, Ho YK, et al. Invasive Infections of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *Actinomycetemcomitans*. *J Microbiol Immunol Infect*. 2010;43(6):491–7.
 139. Pasqualini L, Mencacci A, Scarponi AM, Leli C, Fabbriani G, Callarelli L, et al. Cervical spondylodiscitis with spinal epidural abscess caused by *Aggregatibacter aphrophilus*. *J Med Microbiol*. 2008;57(5):652–5.
 140. Díaz-Zúñiga J, Muñoz Y, Melgar-Rodríguez S, More J, Bruna B, Lobos P, et al. Serotype b of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* triggers pro-inflammatory responses and amyloid beta secretion in hippocampal cells: a novel link between periodontitis and Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol*. 2019;11(1):1586423.
 141. Demmer RT, Jacobs DR, Singh R, Zuk A, Rosenbaum M, Papapanou PN, et al. Periodontal Bacteria and Prediabetes Prevalence in origins. *J Dent Res*. 2015;94(9):201S-211S.
 142. Rahamat-Langendoen JC, van Vonderen MGA, Engström LJ, Manson WL, van Winkelhoff AJ, Mooi-Kokenberg EANM. Brain abscess associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: case report and review of literature. *J Clin Periodontol*. 2011;38(8):702–6.
 143. Fine DH, Patil AG, Velusamy SK. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) Under the Radar: Myths and Misunderstandings of Aa and Its Role in Aggressive

- Periodontitis. *Front Immunol.* 2019;10:728.
144. Oscarsson J, Claesson R, Lindholm M, Höglund Åberg C, Johansson A. Tools of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to Evade the Host Response. *J Clin Med.* 2019;8(7):1079.
 145. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Gleebbua Y. *Porphyromonas gingivalis*, *aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *treponema denticola/prevotella intermedia* co-infection are associated with severe periodontitis in a thai population. *PLoS One.* 2015;10(8):1–13.
 146. Otmani N. Oral and maxillofacial side effects of radiation therapy on children. *J Can Dent Assoc (Tor).* 2007;73(3):257–61.
 147. Corrêa JD, Fernandes GR, Calderaro DC, Mendonça SMS, Silva JM, Albiero ML, et al. Oral microbial dysbiosis linked to worsened periodontal condition in rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep.* 2019;9(1):8379.
 148. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(5):269–82.
 149. Hong BY, Sobue T, Choquette L, Dupuy AK, Thompson A, Burleson JA, et al. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. *Microbiome.* 2019;7(1):1–18.
 150. van Vliet MJ, Harmsen HJM, de Bont ESJM, Tissing WJE. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog.* 2010;6(5):1–7.
 151. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(43):16731–6.
 152. O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, Macsharry J, Lyons A, et al. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology.* 2006 Jun;118(2):202–15.
 153. Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier

- function. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2008;295(5):G1025–34.
154. Moncada DM, Kammanadiminti SJ, Chadee K. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol*. 2003;19(7):305–11.
 155. Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology*. 2007;132(2):562–75.
 156. Cash HL, Whitham C V, Behrendt CL, Hooper L V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*. 2006;313(5790):1126–30.
 157. Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLoS Pathog*. 2018;14(1):10–5.
 158. He J, Li Y, Cao Y, Xue J, Zhou X. The oral microbiome diversity and its relation to human diseases. *Folia Microbiol (Praha)*. 2015;60(1):69–80.
 159. Marques LA, Eluf-Neto J, Figueiredo RAO, de Góis-Filho JF, Kowalski LP, de Carvalho MB, et al. Oral health, hygiene practices and oral cancer. *Rev Saude Publica*. 2008;42(3):471–9.
 160. Sonis ST. A biological approach to mucositis. *J Support Oncol*. 2004;2(1):21–32.
 161. Shin JM, Luo T, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH, Kapila YL. Microbial Communities Associated with Primary and Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - A High Fusobacterial and Low Streptococcal Signature. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–11.
 162. Yang S-F, Huang H-D, Fan W-L, Jong Y-J, Chen M-K, Huang C-N, et al. Compositional and functional variations of oral microbiota associated with the mutational changes in oral cancer. *Oral Oncol*. 2018;77:1–8.
 163. Al-Hebshi NN, Nasher AT, Idris AM, Chen T. Robust species taxonomy assignment algorithm for 16S rRNA NGS reads: application to oral carcinoma samples. *J Oral Microbiol*. 2015;7(1):28934.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **10/05/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **05/04/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2188/16** intitulado: **“Avaliação de alterações da microbiota oral induzidas pelo tratamento oncológico do câncer de boca”**.

Pesquisador responsável: Emmanuel Dias-Neto
Aluna: Marianna Sampaio Serpa (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 17 de maio de 2016.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gróss
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido



A.C. Camargo
Cancer Center

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº
APTO: BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº
APTO: BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “Avaliação de alterações da microbiota oral induzidas pelo tratamento oncológico do câncer de boca”
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Emmanuel Dias-Neto
3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

III - INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa “Avaliação de alterações da microbiota oral induzidas pelo tratamento oncológico do câncer de boca”. Este é um projeto de pesquisa do Laboratório de Genômica Médica do Centro Internacional de Pesquisa, do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia e Departamento de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center e está sob responsabilidade do Dr. Emmanuel Dias-Neto.

Rubrica do
pesquisador
responsável:

Rubrica do
participante:



IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Avaliar se procedimentos que buscam tratar o câncer de boca, incluindo cirurgia e radioterapia, sendo esta última de caráter exclusivo ou associado à quimioterapia, podem afetar o equilíbrio dos microorganismos que habitam a boca (microbiota oral), causando uma alteração quantitativa ou qualitativa destes microorganismos (disbiose). Esta disbiose pode ser um fator importante no desenvolvimento de infecções pós-cirúrgicas, assim como no surgimento e severidade da mucosite oral.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Convidamos você a participar deste estudo, que visa compreender as bases do desenvolvimento de complicações devido ao tratamento oncológico, como infecções pós-cirúrgicas e a mucosite oral, que é um conjunto de lesões inflamatórias (feridas), que podem progredir para a formação de úlceras (aftas), podendo causar intensa dor e desconforto. Através deste estudo iremos analisar se microorganismos que habitam a boca (bactérias e fungos) estão associados com o surgimento e grau de severidade de infecções pós-cirúrgicas e da mucosite oral, o que pode nos ajudar no desenvolvimento de futuros métodos preventivos e terapêuticos.

VI – DESENHO DA PESQUISA

Os pacientes que participaram desta pesquisa deveram ter sido diagnosticados com carcinoma epidermoide oral e todos deverão ser submetidos inicialmente à cirurgia, podendo ser seguida ou não de radioterapia. A radioterapia poderá ser de caráter exclusivo ou usado concomitantemente a quimioterapia. Para os pacientes que serão submetidos à quimioterapia serão considerados dois tipos de regimes: Regime 1 (Cisplatina 100mg/m², 21 em 21 dias, 3 ciclos) ou Regime 2 [Cisplatina até 50mg (dose cheia) semanal, sendo 5 ou 6 ciclos). Assim, os pacientes serão divididos em grupos diferentes dependendo do tratamento oncológico que será submetido: Grupo A (Radioterapia exclusiva); Grupo B (Radioterapia + Regime 1 da quimioterapia) e Grupo C (Radioterapia + Regime 2 da quimioterapia).

VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Caso você aceite participar da presente pesquisa, você passará inicialmente por uma avaliação clínica, com duração de até 30 minutos, quando serão coletadas informações gerais pertinentes à pesquisa tais como idade, sexo, localização do tumor, estadiamento clínico, hábitos de fumar ou beber e tratamento oncológico que será realizado. Ao mesmo tempo, será realizado um exame clínico oral para avaliar sua condição oral e periodontal. Este mesmo exame será repetido após o término do seu tratamento oncológico. Caso não se sinta confortável ou constrangido para responder alguma questão sinta-se a vontade para recusar. Posteriormente, será realizada a coleta de células presentes na sua cavidade oral através do uso de um tipo de escova (*swab*) bucal e saliva, ambos sendo procedimentos não invasivos e utilizados para retirada de material genético (DNA) com intuito de avaliar a microbiota. A coleta através do *swab* será diferente dependendo do estudo, conforme os objetivos deste projeto. Para avaliar o impacto da cirurgia na microbiota oral e infecções pós-operatórias coletaremos, amostra de região adjacente as bordas do tumor e, após a excisão cirúrgica do tumor, coletaremos de região próxima as feridas cirúrgicas. Para analisar em relação a radio e quimioterapia e mucosite oral, coletaremos amostra da mucosa jugal (direita e

Rúbrica do
pesquisador
responsável:

Rúbrica do
participante:



esquerda), borda de língua (direita e esquerda) e mucosa labial (superior e inferior). Para coleta de saliva, você será orientado a despejar um pequeno volume de saliva em um recipiente apropriado. Estas duas técnicas de coletas serão realizadas em 7 momentos: dois momentos serão antes da cirurgia, um deles é coletado no ambulatório e outro no pré-operatório, até cinco dias após a cirurgia, uma a duas semanas após a cirurgia, antes de iniciar a radioterapia, uma semana após o início da radioterapia e até uma semana após o fim da radioterapia. A coleta das amostras através das duas técnicas demora cerca de 15 minutos, sendo o material coletado encaminhado para o Laboratório de Genômica Médica do Centro internacional de pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center para análise. Após a cirurgia, você será avaliado semanalmente para verificar infecções do sítio cirúrgico. Durante a radioterapia, você será avaliado semanalmente para verificar o possível desenvolvimento e/ou progressão de mucosite, e neste momento será fotografado para termos um acompanhamento. Destaca-se que as fotos não lhe identificarão, sendo apenas fotografadas as regiões da cavidade oral. Caso desenvolva mucosite oral, você será submetido à aplicação do laser curativo até a última sessão de radioterapia, como é de rotina do Departamento de Estomatologia do A.C. Camargo Cancer Center. Além disso, previamente ao início do tratamento oncológico, você passará por uma adequação do meio bucal, caso necessário devendo incluir a realização de uma raspagem periodontal e remoção de dentes potencialmente em risco. Todos estes são procedimentos de rotina (exceto a coleta de amostras) devem ser realizados independentemente da sua participação neste projeto. E ressaltamos que todos os procedimentos serão realizados em dias que você já estiver programado para vir ao hospital para procedimentos de rotina.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

De modo geral não há riscos neste estudo. Todas as perguntas que serão feitas a você, e também os métodos de coleta de amostras que serão utilizados neste estudo foram previamente empregados em outros estudos. Se o uso do swab ou coleta de saliva ocasionar desconforto, as respectivas amostras não serão coletadas.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o surgimento ou a severidade de infecções pós-cirúrgicas e mucosite oral, desta forma ajudando no desenvolvimento de métodos preventivos e terapêuticos.

X - CONFIDENCIALIDADE

Todos os esforços serão feitos no sentido de manter a privacidade das informações, que ficarão, restritas aos médicos pesquisadores e enfermeiros diretamente envolvidos neste projeto e aos membros do Comitê de Ética em Pesquisa. Neste sentido, todo e qualquer dado que possa levar à sua identificação será codificado, fazendo com que o risco de perda de confidencialidade seja mínimo. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Rubrica do
pesquisador
responsável:

Rubrica do
participante:



XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Embora seja pouco provável que ocorra danos, pois não há nenhum risco potencial decorrente do estudo, garantimos que qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

O pesquisador e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONE PARA CONTATO EM CASO DE QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** (011) 2189-5000 – ramal: 5023 entrar em contato com Dr. Emmanuel Dias Neto.

XIII. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XIV. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dr. Emmanuel Dias-Neto

Laboratório de Genômica Médica do Centro Internacional de Pesquisa A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramal 5023

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu, _____ declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa
(Dr. Emmanuel Dias-Neto)

_____/_____/_____
Data

Apêndice 2 – Diversidade alfa e beta em relação à infecção do sítio cirúrgico e parâmetros clínicos/cirúrgicos

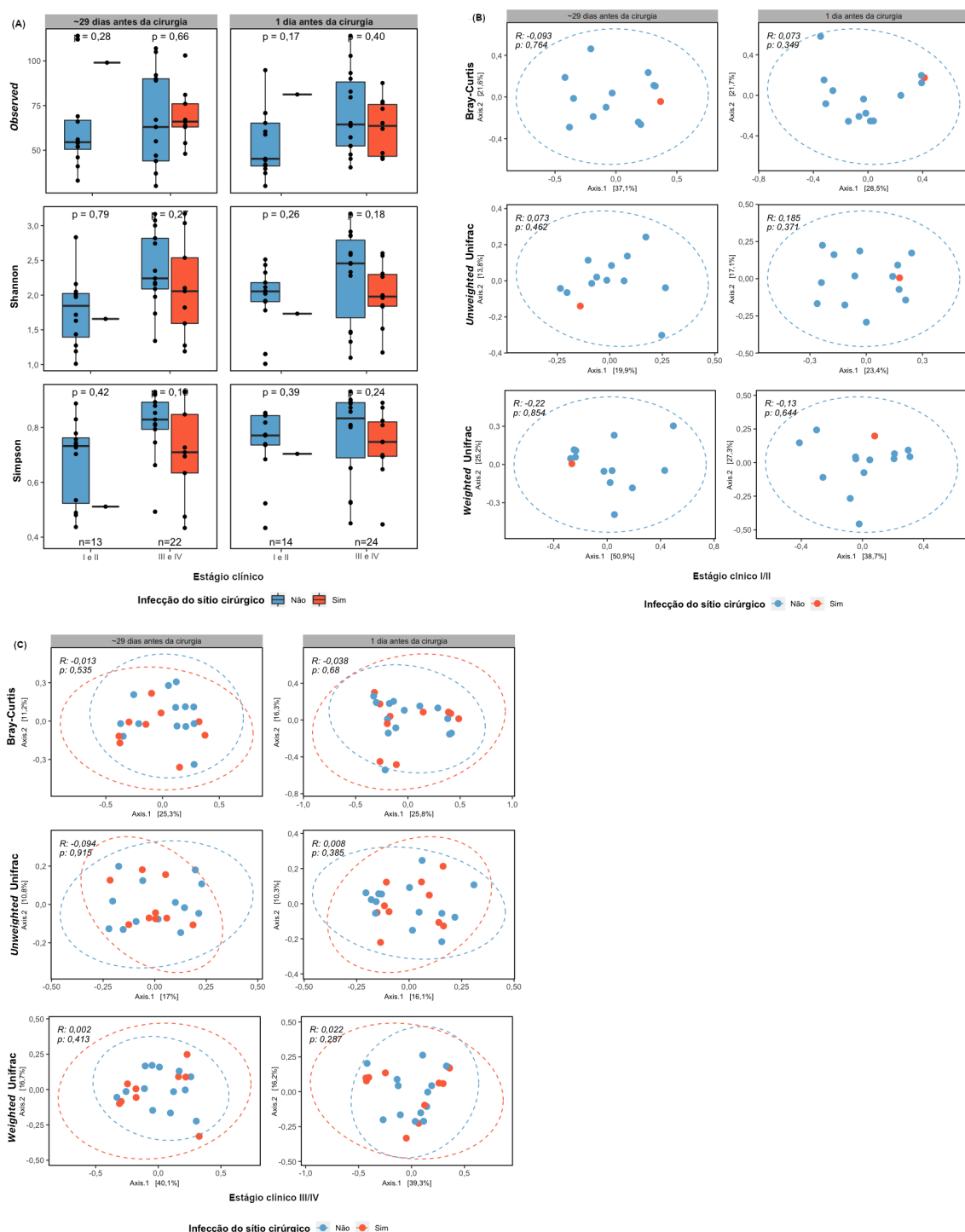


Figura A2.1 – Diversidade a nível de OTU em relação à infecção do sítio cirúrgico e estágio clínico nos momentos I/II **(A)**: Diversidade alfa (teste não paramétrico U de Mann-Whitney); Diversidade beta de acordo com o estágio clínico I/II **(B)** e III/IV **(C)** R: coeficiente de similaridade de ANOSIM).

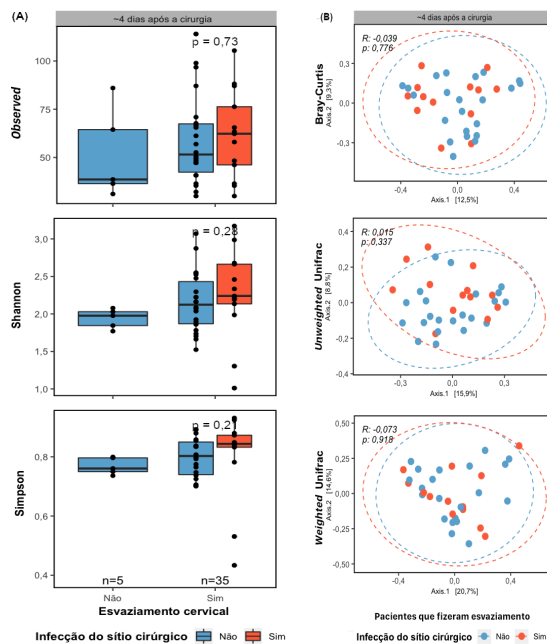


Figura A2.2 – Diversidade a nível de OTU em relação à infecção do sítio cirúrgico e esvaziamento cervical no momento III (A): Diversidade alfa (teste não paramétrico U de Mann-Whitney); **(B):** Diversidade beta de acordo com os pacientes que fizeram esvaziamento cervical (R : coeficiente de similaridade de ANOSIM).

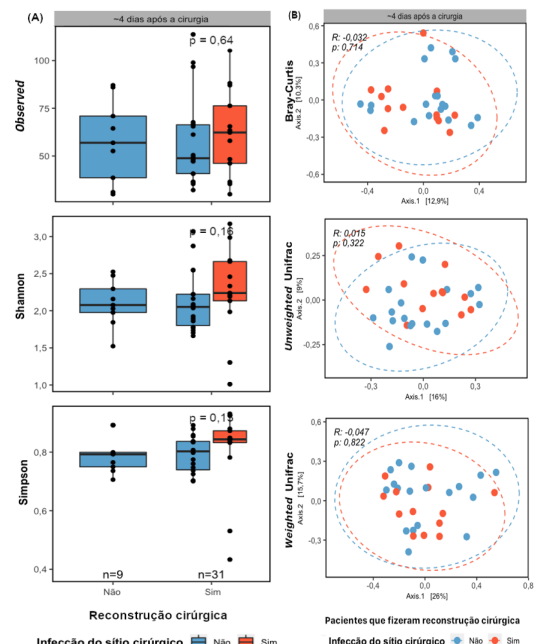


Figura A2.3 – Diversidade a nível de OTU em relação à infecção do sítio cirúrgico e reconstrução cirúrgica no momento III (A): Diversidade alfa (teste não paramétrico U de Mann-Whitney); **(B):** Diversidade beta de acordo com os pacientes que fizeram reconstrução cirúrgica (R : coeficiente de similaridade de ANOSIM).

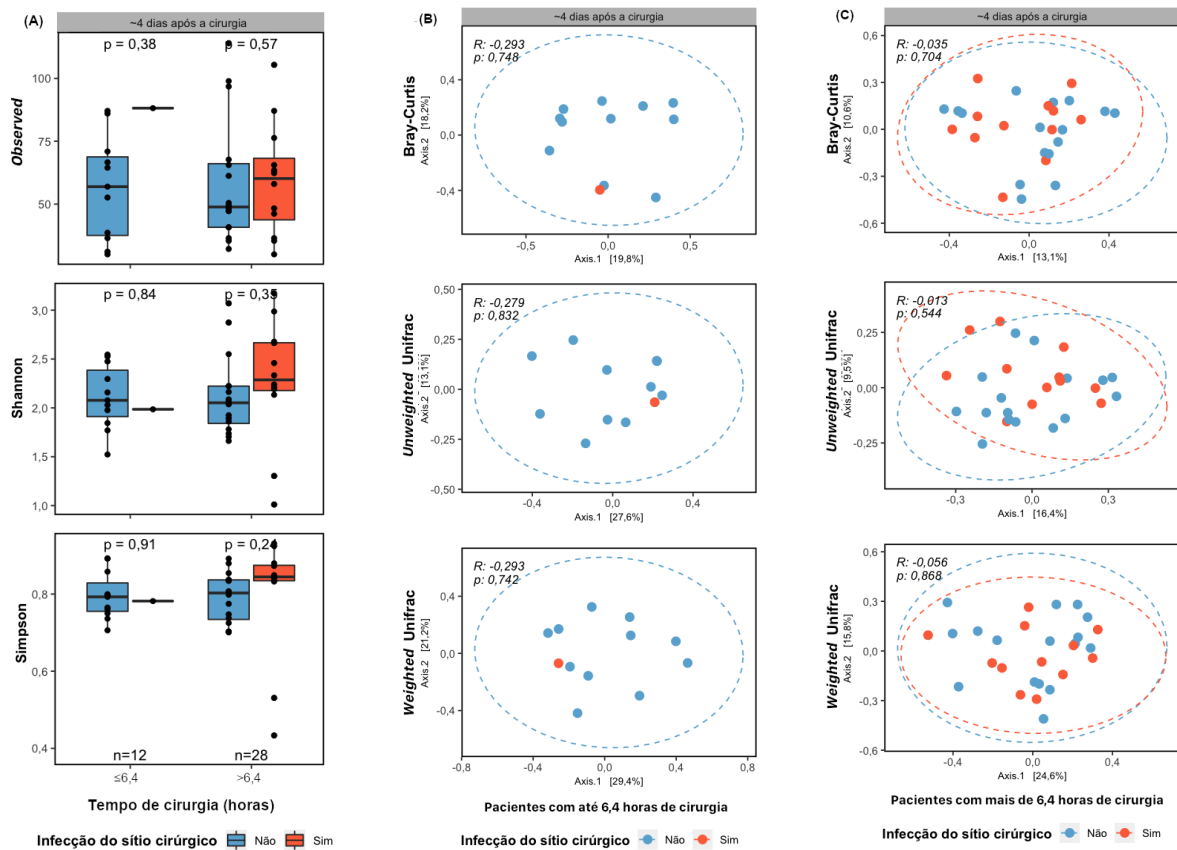


Figura A2.4 – Diversidade a nível de OTU em relação à infecção do sítio cirúrgico e tempo de cirurgia (horas) no momento III **(A)**: Diversidade alfa (teste não paramétrico U de Mann-Whitney); Diversidade beta a nível de OTU com os pacientes que tiveram até 6,4 horas de cirurgia **(B)** e mais de 6,4 horas de cirurgia **(C)** (R : coeficiente de similaridade de ANOSIM).

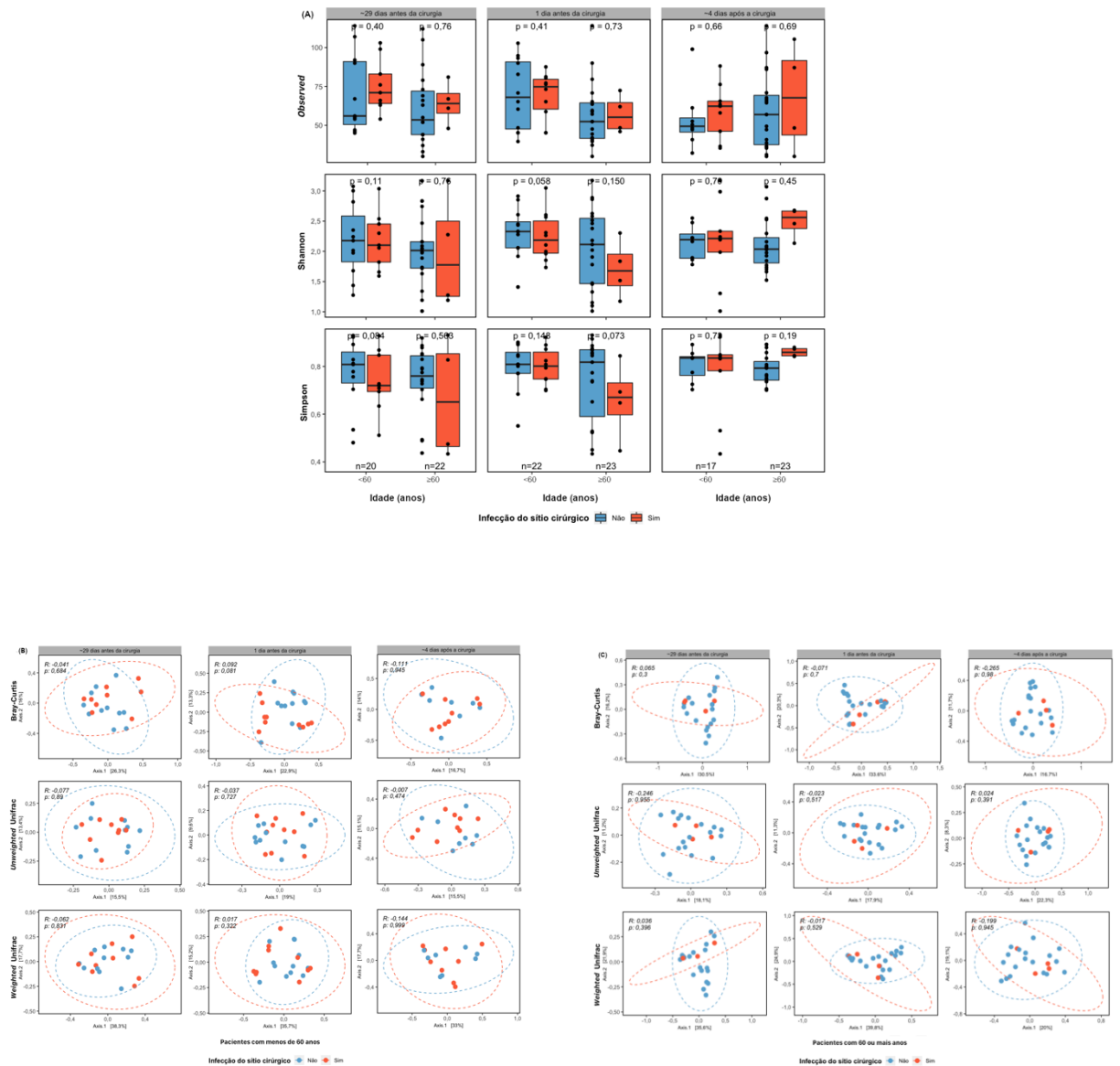
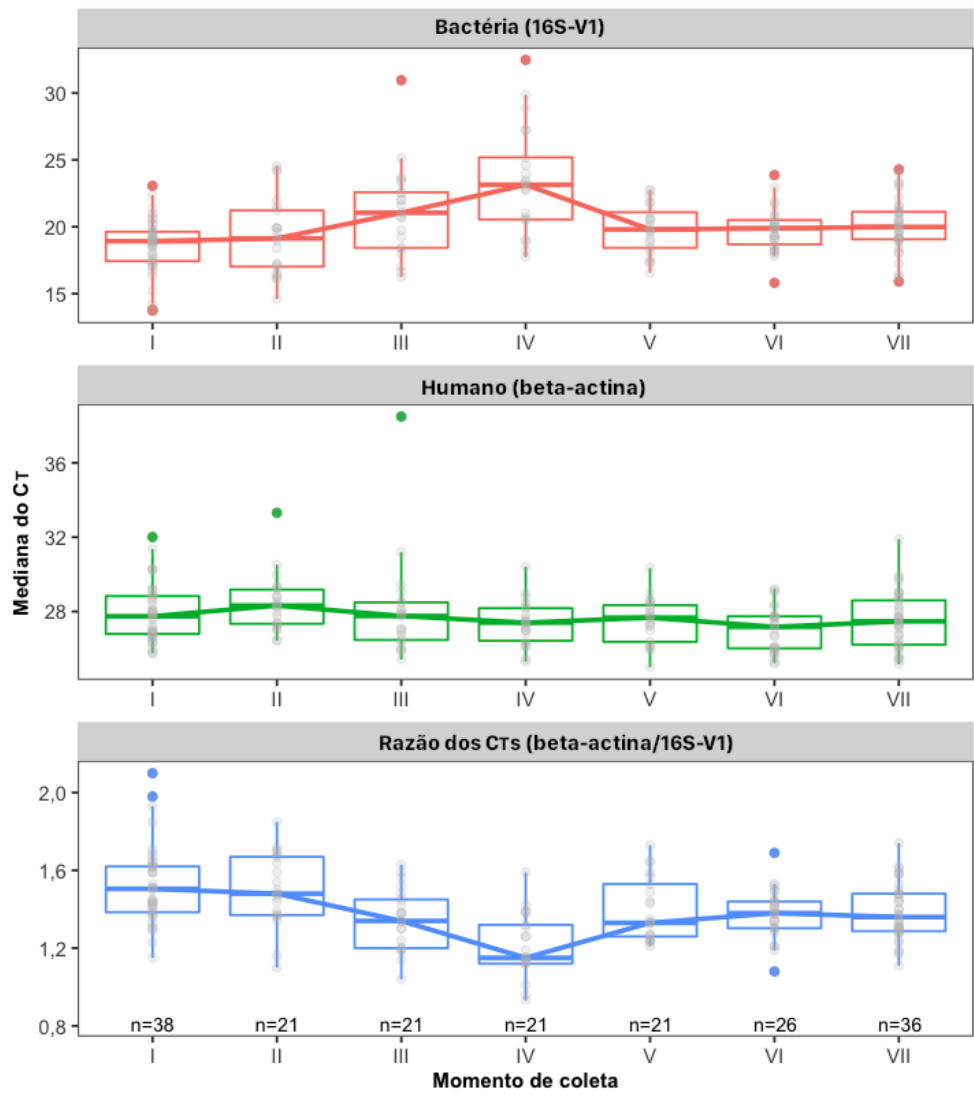


Figura A2.5 – Diversidade a nível de OTU em relação à idade nos momentos I, II e III (A): Diversidade alfa (teste não paramétrico U de Mann-Whitney); Diversidade beta a nível de OTU com os pacientes que menos de 60 anos (B) e com 60 ou mais anos (C) (R: coeficiente de similaridade de ANOSIM).

Apêndice 3 - Perfil dos CTs (bacteriano, humano e sua razão) de acordo com o momento da coleta (I a VII) de todos os pacientes dos módulos I e II do estudo



Apêndice 4 - Perfil das bactérias mais abundantes de acordo com o momento da coleta (I a VII) de todos os pacientes dos módulos I e II do estudo

