



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA/RENORBIO

PROJETO DE PESQUISA

**CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE
SÍTIOS COM PERIODONTITE CRÔNICA EM MULHERES COM E SEM
CÂNCER DE MAMA**

Vitória-ES
2020

UNIDADES EXECUTORAS

- Núcleo de Periodontia/NUPET – Clínica de Periodontia do (Ambulatório 2) Instituto de Odontologia da UFES – IOUFES, Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica (PPGCO), Departamento de Clínica Odontológica, Centro de Ciências da Saúde, CCS/UFES, Vitória, ES;
- Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano (LBMCMH) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec)/RENORBIO, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia (PPGBF), Centro de Ciências da Saúde, CCS/UFES, Vitória, ES;
- Laboratório de Regulação Neurohormonal e da Circulação – Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, CCS/UFES, Vitória, ES;
- Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI), Departamento de Patologia, CCS/UFES, Vitória, ES.
- Laboratório de Biologia Oral, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de Guarulhos, SP.
- Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia e de Análises Clínicas do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), CCS/UFES, Vitória, ES.
- Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense- UENF- RJ.

EQUIPE EXECUTORA

- Prof. Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa - Coordenador Adjunto do NUPET – Prof. Associado IV do Departamento Clínica Odontológica – Coordenador Geral do Projeto, CCS/UFES, Vitória, ES; CPF: 450.734.737-87; RG: 275.950 SSP/ES. Email: alfredofeitosaufes@gmail.com; Responsável pela supervisão geral do projeto no Centro; mentor do projeto; redação e tipo de desenho experimental do projeto, responsável pela parceria com o NDI/UFES para análise das amostras de fluido gengival, parceria com a Universidade de Guraulhos/UnG para análise do biofilme subgengival; proponente do tratamento odontológico; da análise dos exames contidos nos prontuários das pacientes com e sem câncer de mama do projeto; da calibração clínica da aluna de doutorado; e da seleção de alunos de graduação de Odontologia e de Medicina no projeto;
- Prof.^a Dr.^a Glaucia Rodrigues de Abreu - Colaboradora - Coordenadora Adjunta do Projeto no CCS – Prof.^a. Titular do Departamento de Ciências Fisiológicas, CCS/UFES, Vitória, ES; CPF: 776.847.457-00; Email: abreugr1994@gmail.com; Responsável pela análise final das citocinas do fluido gengival; e pela supervisão geral da equipe de trabalho no projeto;
- Prof.^a Dr.^a Leticia Batista Azevedo Rangel - Colaboradora- Coordenadora Adjunta do Projeto - Prof.^a Titular do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Coordenadora do LBCMCH – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec/RENORBIO), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmácia (PGBF), CCS/UFES - Vitória, ES; Email Ibarangel@yahoo.com; Tel 27- 995897368.
- Prof.Dr.Luiz Alberto Sobral Vieira Junior – Colaborador – Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - Diretor Geral do HUCAM/UFES; CCS/UFES, Vitória, ES; responsável pelo encaminhamento de pacientes; CPF: RG: email: Tel: 27- 999097276.
- Maria da Conceição Machado Gomes - Doutoranda em Biotecnologia em Saúde/RENORBIO – UFES, Cirurgiã-Dentista, Especialista em Educação em Saúde, Mestre em Clínica Odontológica; E-mail: falecomaria@gmail.com; CPF: 955.076.397-87. Tel: (27) 9 9805-6922. Responsável pela execução dos exames clínicos periodontais, pela coleta

das amostras de placa subgengival, coleta das amostras de fluido gengival e supervisão da equipe de alunos de graduação, odontograma; tomadas radiográficas, tratamento periodontal e odontológico complementar das pacientes, análise laboratorial da microbiota e quantificação das citocinas.

- Dr. Wesley Vargas Moura – Colaborador - Oncologista –Hospital Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, ES; responsável pelo encaminhamento de pacientes; RG: , CPF: , Email: wesley@neon.med.br , Tel: 27- 992945205.

- Dr^a. Janine Martins Machado – Colaboradora – Oncologista – HUCAM/CCS-UFES; Vitória, ES; CPF: 077.446.197-73; Tel 27- 981284416; Email:janinemartinsmachado@outlook.com. Responsável pelas atividades dos exames clínico, radiográfico e complementares das pacientes com e sem câncer de mama do Ambulatório de Ginecologia e Mastologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) no projeto.

- Prof. Dr. Sérgio Lins de Azevedo Vaz – Colaborador – Professor Adjunto do Departamento de Clínica Odontológica, CCS/UFES, Vitória, ES; CPF: 106.541.417-03; Email:sergiolinsv@gmail.com, Tel 27- 999761103: Responsável pelas análises das tomadas radiográficas periapicais/interproximais das pacientes com e sem câncer de mama do projeto;
- Prof^a. Dr^a. Magda Feres Figueiredo – Colaboradora - Coordenadora do Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular, Faculdade de Odontologia da Universidade de Guarulhos, Guarulhos, SP; CPF: 866.833.577-49; RG: 37957403-2 SSP/SP, Tel: (11) 9 8579-2332. Email:mferes@ung.br. Responsável pela identificação microbiana molecular (DNA) do biofilme subgengival das amostras das pacientes com e sem câncer de mama do projeto;
- Dr. Alan Trindade Branco – Colaborador: Pesquisador DCR- CNPq, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Farmácia, CCS/UFES, Vitória, ES; E-mail: allantbcderj@hotmail.com; CPF: 077.610.227-39; tel: 27-996913562.

- Lorenzo Lyrio Stringari, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde/CCS-UFES; E-mail: lstringari@gmail.com; CPF: 116.644.087-70; **Tel:27-** 981132008 responsável pela análise de citocinas do fluido sulcular gengival;
- Anselmo Dantas – Colaborador, Técnico em Saúde da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Espírito Santo; Email: dantases@gmail.com; CPF: 575.994.757-53; tel: 9 9903-4682; Responsável pela organização técnica do projeto quanto aos ambientes organizacionais;
- Fausto Frizzera Borges Filho – Colaborador, Prof Titular do Curso de Odontologia das Faculdades Integradas Espírito Santenses – FAESA, Vitória-ES; E-mail: faustofrizzera@yahoo.com.br; CPF: 116.871.287-40; RG: 1943143 SSP-ES; Tel: 9 9945-2339, responsável pela análise final do projeto com relação aos objetivos odontológicos do projeto.
- Waniara Aguiar de Oliveira, Colaboradora, aluna do 2º período de Medicina/UFES, matrícula: CPF: 042.997.075-75; RG: 1005623295- BA, Endereço: Av. Santos Evangelista, 26 Jardim Camburi, Vitória-ES, CEP: 29092 090 - Email: waniara.aguiar@gmail.com/Tel: (27) 9 9897-8046; responsável pelo acompanhamento dos prontuários das pacientes com câncer de mama no Ambulatório de Ginecologia e Mastologia do HUCAM com a equipe médica do projeto.
- Alexssandro Pimenta Ferminiano; aluno do 9º período de odontologia/UFES, matrícula 2014203556; CPF: 149266627-01; RG: 332916-7 ES; nasc: 16/12/1993. Responsável pelo acompanhamento clínico de Periodontia e no Serviço de Radiologia do IOUFES.
- Roberto da Silva Ribeiro Jr; aluno do curso de Farmácia /UFES- auxilio no armazenamento das amostras.

RESUMO

A doença periodontal tem sido associada ao câncer de cabeça e pescoço; interessante em pacientes nunca fumantes ou consumidores de álcool. Ademais, comprometimento na saúde bucal tem correlação com a incidência de outros cânceres, como o pancreático e o gastrointestinal, apontando os periodontopatógenos como marcadores biológicos potenciais do câncer. Neste trabalho, a avaliação de parâmetros clínicos, radiográficos, microbiológicos dos efeitos da quimioterapia em relação à doença periodontal em pacientes saudáveis ou portadoras de câncer de mama (CAM) estão sendo conduzidas por meio de estudo com delineamento caso-controle longitudinal, contendo aspectos epidemiológicos e terapêuticos periodontais, sendo o fator etiológico das doenças periodontais o biofilme dental. Serão selecionadas 100 (n=50 por grupo) pacientes do Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HUCAM/UFES e do Ambulatório dois (2) do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES) com diagnóstico confirmado de CAM e conforme protocolos terapêuticos com drogas anti-neoplásicas (quimioterapia) adotados, e com pelo menos um sítio periodontal apresentando bolsas periodontais profundas com profundidade de sondagem e nível clínico de inserção $\geq 4,0$ mm foram incluídas no estudo. Todas as pacientes vêm recebendo profilaxia periodontal e aplicação tópica de flúor. Ainda, vislumbramos estabelecer a possível co-expressão de periodontopatógenos nas bolsas periodontais e nas biópsias de pacientes com CAM, posto há dados robustos acerca do papel de agentes componentes de microbiotas em tecidos tumorais. Os resultados deste projeto florescerão informações a serem aplicadas em diferentes protocolos epidemiológicos e terapêuticos periodontais no contexto do aprimoramento do tratamento do CAM. No decorrer do desenvolvimento do estudo, notamos menor incidência de ocorrência de Covid-19 em pacientes com CAM em comparação com as saudáveis, com pouca ou nenhuma queixa de sintomatologia da doença, sugerindo a relação dos quimioterápicos com a terapêutica da virose. Há sugestão de efeito protetivo de agentes antineoplásicos contra o vírus SARS-CoV-2; contudo os dados ainda são incipientes. Procederemos com a testagem de todas as pacientes por qRT-PCR em apoio da Secretaria Estadual de Saúde e disponibilidade do Laboratório Central (Lacen) do Espírito Santo com o intuito de melhor compreendermos nossos dados preliminares. Os resultados do projeto têm a potencialidade de gerar informações essenciais para serem aplicadas em diferentes protocolos epidemiológicos no tratamento do CAM e da Covid-19. Por fim, diante da complexidade desta proposta e com o objetivo primordial de promovermos assistência de qualidade às mulheres com CAM, aliaremos análise pormenorizada de possíveis interações medicamentosas e encaminhamento de propostas diferenciadas de tratamento aos médicos assistencialistas em caso de ocorrência de comprometimento da eficácia terapêutica de quaisquer mazelas investigadas e, principalmente, ocorrência de fenocópia.

Palavras-chave: Câncer de mama, Terapia anti-neoplásica, Microbiota, Nível ósseo, Citocinas.

1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma enfermidade de natureza infecciosa que está associada primeiramente à colonização das superfícies dos dentes por bactérias anaeróbias Gram-negativas que induzem uma resposta inflamatória a qual pode acarretar a destruição dos tecidos periodontais. O biofilme bacteriano é o principal responsável por esta perda de tecidos uma vez que o seu acúmulo na superfície dental atua como um agente irritativo e desencadeia a resposta inflamatória-imunológica no tecido gengival adjacente (OFFENBACHER, 1996; PAGE, 1998). Estudos recentes têm mostrado a relação entre doença periodontal e câncer (FREUDENHEIM et al., 2015; SÖDER et al., 2011), possivelmente devido a aspectos crônicos da inflamação da doença periodontal. Das espécies bacterianas ligadas ao câncer, o patógeno oral *Fusobacterium nucleatum* tem sido associado ao câncer colorretal e esofágico. Em um estudo recente, foi encontrado acúmulo de DNA da espécie *F.nucleatum* em amostras de tecidos com câncer de mama levando à supressão da resposta imune promovendo crescimento e progressão metastática, (PARHI et al., 2020) e a espécie bacteriana oral *Porphyromonas gingivalis*, pode ativar a via antiapoptótica promovendo imunossupressão e, possivelmente, oncogênese em cânceres bucais e outros (ARJUNAN et al., 2018).

A taxa de prevalência de bactérias periodontais em indivíduos com câncer pode estar associada à saúde do paciente, existência de qualquer condição oral patogênica, tempo de quimioterapia ou radioterapia, estágio da doença, cirurgia, tipo de câncer, idade do paciente e uso prévio ou atual de antibioticoterapia (SAYEHMIRI et al., 2015). A resposta do hospedeiro envolve citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, prostaglandinas, receptores Toll-like, e enzimas proteolíticas, os quais têm sido demonstrados um papel importante na patogênese da periodontite (MAHANONDA e PICHYANGKFUL, 2007; SORSA et al., 2006). Estudos têm sido realizados analisando resultados *in vitro* e *in vivo* para identificar genes responsáveis pela periodontite. Kim et al. (2006) e Demmer et al. (2008) mostraram um número de genes que estavam regulados na periodontite comparado aos controles saudáveis.

1.1 Câncer de Mama

Dados epidemiológicos indicam o câncer de mama ser a malignidade mais frequente em mulheres em todo o mundo (JEMAL, 2011; SIEGEL, 2011). O cenário é alarmante também no Espírito Santo, onde foram esperados mais de mil novos casos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres (INCA, 2016).

Com prevalência estimada ao longo da vida de 12% para mulheres que se encontram sob risco usual, representa 23% do total de diagnósticos de câncer em mulheres e 14% das mortes por câncer em mulheres nos EUA (JEMAL, 2011). Em virtude do acima exposto, esta condição destaca-se como importante problema de saúde pública, representando a principal causa de morte por câncer nos países em desenvolvimento e a segunda principal causa nas regiões desenvolvidas, superada somente por câncer de pulmão (OMS, 2013). Dentre os diversos subtipos moleculares dessa doença, cabe destacar que cerca de 15-25% desses casos são classificados como HER2-positivos (Human Epidermal Growth fator Receptor 2) – ou seja, as células tumorais apresentam mutação no gene HER2 ou superexpressão dessa proteína em suas membranas plasmáticas (ROSS, 2009). Tumores que apresentam esta alteração molecular demonstram fenótipo clínico mais agressivo e têm pior prognóstico quando comparados com cânceres de mama luminais HER2- negativos. Isto se deve ao crescimento celular desregulado e sobrevida celular anormal mediada pela hiperexpressão desse receptor HER2 nas células neoplásicas (OWENS et al., 2004; SLAMON et al., 1987; SLAMON et al., 1989; WOLFF et al., 2007; YARDEN; SLIWKOWSKI, 2001; YAZIJI et al., 2004). A situação no Brasil assemelha-se bastante ao cenário internacional. Dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) demonstram que essa neoplasia, excluindo-se tumores de pele não-melanoma, representa o câncer mais frequente em mulheres nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste, estimando a ocorrência de 57.960 novos casos para 2017 (INCA, 2016). Existem poucos estudos sobre o perfil molecular dos casos nacionais, mas dados provenientes de um estudo de coorte retrospectiva conduzida por

Liedke e colaboradores identificaram uma prevalência de 13% para tumores HER2-positivos (LIEDKE et al., 2013).

1.2 COVID 19 e Câncer

SARS-CoV-2 é a causa de COVID-19, esta doença foi declarada uma pandemia da Organização Mundial da Saúde (OMS), e está tendo efeitos graves nas vidas individuais e nas economias em todo o mundo. A infecção com SARS-CoV-2 é caracterizada por um amplo espectro de síndromes clínicas, que variam de doença assintomática ou leve sintomas semelhantes aos da influenza a pneumonia grave, síndrome respiratória aguda grave e podendo levar o indivíduo ao óbito (LE BERT et al., 2020). Embora o SARS-CoV-2 infecte principalmente as partes superiores e inferiores do trato respiratório, também pode afetar o intestino, coração, fígado, rim, cérebro e outros órgãos. Estudos clínicos relataram os sinais e sintomas mais comuns como tosse (86%), febre ou calafrios (85%), falta de respiração (80%), diarreia (26%) e náuseas ou vômitos (24%). Nenhum tratamento mostrou benefício convincente ainda para os pacientes com COVID- 19, mas a Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos concedeu autorização de uso de emergência para o reaproveitamento do uso de medicamentos aprovados ou sob investigação além do escopo da indicação médica original. Não apenas de medicamentos antivirais, mas também daqueles usados em outras doenças como o câncer, é digno de consideração para encurtar cronogramas para identificar uma terapia eficaz para COVID-19 (SAINI et al., 2020). É comum observar a capacidade de um único vírus de causar diferentes manifestações patológicas em humanos. Isso geralmente é devido a vários fatores contribuintes, incluindo o tamanho do inóculo viral, o histórico genético dos pacientes e a presença de concomitantes condições patológicas. Além disso, uma imunidade adaptativa estabelecida para o vírus ou outros microorganismos podem reduzir a susceptibilidade ou aumentar a gravidade da doença. Células T específicas para SARS-CoV-2 acabaram de começar a ser caracterizadas em pacientes com COVID-19 e seu potencial papel protetor tem sido relatada em estudos de pacientes que se recuperaram da SARS e MERS (LE BERT et al., 2020). Embora muitos dos detalhes sobre o vírus SARS-CoV-2 e seus efeitos em humanos ainda não foram elucidados, alguns dados interessantes na semelhança entre a fisiopatologia de COVID-19 e câncer estão começando a surgir.

2. JUSTIFICATIVA

O tratamento periodontal no Ambulatório 2 do Instituto de Odontologia em indivíduos com e sem câncer de mama constitui parte da continuidade do projeto de pesquisa inicial (*PROJETO DE PESQUISA* intitulado “EFEITO DE TERAPIAS ANTI-NEOPLÁSICAS DO CANCER DE MAMA SOBRE A DOENÇA PERIODONTAL” com cadastro e aprovação na PLATAFORMA BRASIL sob nº: 21597313.2.0000.5060 que investigou a microbiota dos sítios periodontais não saudáveis em uma população de mulheres com e sem câncer de mama.

Nossos resultados do projeto básico acima relatado apresentam perfil microbiológico (contagem bacteriana) significativa em relação aos parâmetros clínicos periodontais. De acordo com a literatura atual, a presença de patógenos subgengivais no meio tumoral inibem a apoptose favorecendo a progressão da malignidade além de servir como futuras análises de efeitos terapêuticos para os pacientes com diagnóstico de câncer. Este projeto geral permitiu a condução de produtos científicos, tais como: dissertação de Mestrado (03) junto ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica (PPGCO), artigos publicados e submetidos. Esta nova proposta buscar aprofundar nossos estudos nas bases celulares e moleculares do câncer humano alcançando alternativas, inovadoras ou incrementais, para o tratamento da doença, seja periodontal ou até mesmo do câncer de mama. Neste contexto, os Laboratórios de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano (LBCMCH), sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Letícia Batista Azevedo Rangel, de Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da UnG sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Magda Feres e do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI-UFES) tem nos auxiliado muito na qualificação destes aportes que agora vem sendo um novo desafio entre a Odontologia Clínica e Laboratorial nos níveis de mestrado e doutorado no alcance de processos incrementadores de ferramentas tecnológicas e biotecnológicas (marcadores de diagnósticos/prognósticos/terapêuticos e novos agentes antineoplásicos).

3. OBJETIVOS

Geral: Estudar a produção de citocinas no fluido gengival e a microbiota subgengival de sítios periodontais de mulheres com e sem câncer de mama sob quimioterapia antineoplásica e a presença de patógenos subgengivais no meio tumoral de biópsias de mama.

Específicos:

- 3.1- Avaliar a condição bucal e periodontal de mulheres com e sem câncer de mama;
- 3.2- Caracterizar a condição sociodemográfica das mulheres com e câncer de mama;
- 3.3- Comparar os níveis de produção das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α nos fluidos gengivais dos sítios com periodontite nos grupos;
- 3.4- Caracterizar a microbiota subgengival dos sítios com periodontite e dos sítios periodontais clinicamente saudáveis nos grupos;
- 3.5- Comparar o perfil das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α com as características clínicas periodontais e com a microbiota subgengival dos sítios com periodontite nos grupos.
- 3.6- Avaliar o perfil do (os) patógenos orais presentes no meio tumoral de biópsias de mama por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR);
- 3.7- Comparar os casos de COVID 19 entre os grupos por testagem imunológica e RT-PCR.

4. METODOLOGIA

TIPO DE ESTUDO E DELINEAMENTO DA PESQUISA

A proposta do presente trabalho é um estudo observacional caso-controle com acompanhamento longitudinal constituído por mulheres com e sem câncer de mama expostas a doença periodontal.

LOCAL DE ESTUDO

Será realizado na Clínica de Periodontia do Instituto de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (IOUFES) localizados na Av. Marechal Campos, 1355, Santa Cecília, CEP: 29043-260, Vitória-ES com as pacientes assistidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM). A coleta para testagem da COVID 19 será realizada no laboratório de análises clínicas do HUCAM com agendamento prévio de acordo com os protocolos de segurança e precessadas por RtPCR no Laboratório Central (LACEN-ES). A análise das biópsias de tumores de mama por PCR será realizada no laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) sob coordenação do Prof Dr Arnoldo Rocha Façanha e equipe.

POPULAÇÃO DE ESTUDO

Mulheres com diagnóstico confirmado de câncer de mama (CA) assistidas no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) portadoras de doença periodontal (Periodontite crônica), e, de mulheres sem diagnóstico positivo para câncer de mama (Diagnóstico por Imagem – Mamografia realizado no Ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia do HUCAM) assistidas na Clínica de Periodontia e do Serviço de Radiologia Odontológica do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES) com diagnóstico clínico e radiográfico de doença periodontal (Periodontite crônica). As pacientes serão divididas em dois grupos: 1) grupo Caso: 50 (cinquenta) pacientes com diagnóstico positivo para o câncer de mama expostas ou não a doença periodontal crônica e que serão submetidas à quimioterapia

antineoplásica; e, 2) grupo Controle: 50 (cinquenta) pacientes sem diagnóstico positivo para o câncer de mama expostas ou não a doença periodontal crônica

As mulheres do Grupo Caso e Controle serão avaliadas em 3 (três) momentos: T0/Baseline; T1 e T2 com intervalos de 90 dias em média e constituem na análises de diagnósticos para o câncer de mama (exame anátomo- histopatológico), diagnósticos da doença periodontal (pelo menos um sítio periodontal), questionários médico-odontológico, coletas do biofilme e do fluido bubgengival, Rx interproximal, adequação da cavidade bucal (exodontias, restaurações provisórias e/ou definitivas), quimioterapia inicial e terapia periodontal básica consistindo de raspagem e alisamento radicular, polimento e aplicação tópica de flúor. A Quimioterapia inicial deve ser iniciada após a adequação bucal e Terapia periodontal. Esta fase deverá terminar em até 90 dias. Na fase final serão feitas a testagem para COVID 19 em todas as pacientes do grupo caso e controle e análise das biópsias de tumores de mama da 50 pacientes do grupo caso por PCR para identificar a possível presença de patógenos orais como indicadores de risco para progressão do câncer .

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão considerados como critérios de inclusão:

- 1) Mulheres **com** diagnóstico histopatológico de câncer de mama e que ainda não tenham realizado nenhum tratamento antineoplásico (radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia expostas ou não a doença periodontal crônica;
- 2) Mulheres **sem** diagnóstico positivo para câncer de mama expostas ou não a doença periodontal crônica;
- 3) Ter idade acima de 30 anos;
- 4) Ter pelo menos de 10 a 15 elementos dentários;

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1) Ter outras doenças sistêmicas;
- 2) Possuir menos de 15 elementos dentários;
- 3) Usar próteses dentárias extensas;

- 4) Ser portador de alguma condição sistêmica que contra indique o tratamento odontológico;
- 5) Gravidez e lactação;
- 6) Ter menos de 30 anos de idade;
- 7) Ser alérgica ao flúor;
- 8) Recusar-se em assinar Termo de Consentimento ((TCLE);

TAMANHO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

O cálculo da amostragem para as mulheres com diagnóstico positivo para câncer de mama exigida para este tipo de investigação foi baseado na disponibilidade de mulheres que se apresentam mensalmente na Clínica de Oncologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM - UFES). Como o tratamento anti- neoplásico pode ser múltiplo, ou seja, somente quimioterapia, radioterapia ou associação de quimioterapia com radioterapia e tamoxifeno, alguns tipos de estadiamentos podem exigir previamente a realização de cirurgia de esvaziamento linfático e posteriormente a terapia antineoplásica. Neste sentido, optamos por fazer uma amostragem de conveniência somente com pacientes com diagnóstico positivo para quimioterapia. Para possibilitar uma relação mais segura e realística da casuística, optamos por fazer uma amostragem com relação 1:1, ou seja, para cada caso (mulher com câncer de mama) 1 mulher controle (mulheres sem câncer de mama). Portanto, teremos um grupo de doentes intitulado câncer de mama e um grupo sem doença, ou seja, sem neoplasia maligna de mama. O fator de risco que envolve os pacientes expostos em ambos os grupos é a doença periodontal (Periodontite crônica). Assim, o cálculo amostral foi escolhido considerando a quantidade de amostras (placa subgengival e fluido gengival) viáveis de serem coletadas e a incidência da doença (novos casos): 1.130 no Estado e 140 novos casos ao ano na capital por 100 mil habitantes (<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/espírito-santo-vitoria.asp>). O programa utilizado para a realização do cálculo amostral foi o SPSS versão 2.0. Os parâmetros utilizados no cálculo foram: a prevalência de periodontite entre os casos de 79.2%, com razão de chances de 2.8, número de controles por caso de 1:1, poder de 90%, nível de confiança de 5%, onde chegou-se ao tamanho de amostra de 50 mulheres em cada grupo, o que resultou em um tamanho de amostra de 100 mulheres.

ABORDAGEM AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Antes da entrevista e do exame clínico serem iniciados, cada indivíduo entrevistado e examinado terá uma explanação detalhada sobre os objetivos da pesquisa como esclarecimentos sobre os inconvenientes e benefícios. O fundamento do projeto será de que nenhum prejuízo ocorra ao participante, caso não queira participar. A participação será voluntária, com direito à recusa, abandono da entrevista e/ou exame clínico quando desejar. Garantir-se-á sigilo de todas as informações coletadas,

inclusive em relação à identificação do indivíduo. Será esclarecido que o resultado da pesquisa poderá ser divulgado em revista científica, congressos nacionais ou internacionais, palestras e/ou conferências.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

As pacientes que concordarem com a participação assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE- APÊNDICE D), de acordo com as diretrizes e normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº 441 de 2011 e Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)/MS). Além disso, todos os envolvidos terão seus direitos fundamentais garantidos (informação, privacidade, recusa inócua, desistência, continuidade do atendimento, acesso ao pesquisador e ao comitê de ética, além de garantia de acompanhamento das possíveis doenças odontológicas diagnosticadas, entre outros). Então, serão encaminhados ao cirurgião- dentista para explicar sobre os procedimentos que serão realizados. CAAE: 88131918.6000.5060.

COLETA DE DADOS

As pacientes serão avaliadas por uma cirurgiã-dentista, Mestre em Clínica Odontológica (MCMG) e doutoranda em Biotecnologia em Saúde do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/RENORBIO da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), por 1 aluno de graduando em odontologia, 1 aluno graduando em medicina e 2 profissionais da enfermagem treinados para auxiliar a coleta das amostras para testagem da COVID 19 . Os indivíduos serão entrevistados através de questionário semi-estruturado (APÊNDICES A1 e A2) e apresentarem o laudo de biópsia e imunohistoquímico positivos para o câncer de mama (grupo caso) e aquelas que não possuem diagnóstico para o câncer de mama (grupo controle).

Avaliação Dentária (cpod)

Será utilizado o Odontograma (APÊNDICE B) padrão para registro dos dentes hígidos (H), cariados (C), obturados (O), perdidos (P) e indicados para extração (IE) (CPOD), conforme modelo formulário do curso de graduação de Odontologia da UFES do IOUFES.

Avaliação da condição periodontal

Os exames clínicos periodontais serão registrados no formulário Periodontograma (APÊNDICE C) e realizados por uma cirurgiã-dentista (MCMG), calibrada e supervisionada por um professor responsável da Periodontia. A calibração será realizada para atender as mensurações de Profundidade de bolsa (PB), Nível de Inserção Clínica (NIC), Índice de Placa Visível (IPV), Sangramento à sondagem (SS) e Índice de Sangramento gengival marginal (ISG), e escolher um sítio periodontal de qualquer elemento dentário na maxila ou mandíbula com $PB \geq 4\text{mm}$ e $NIC \geq 2\text{mm}$. Será utilizado o coeficiente kappa de Cohen para medir a variabilidade intra e inter-examinador com relação aos índices clínicos periodontais. Perfil igual ou acima de 70% representa boa aceitação do teste. As mensurações clínicas periodontais serão realizadas sobre a superfície de todos os dentes em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto- vestibular, mésio-lingual/palatino, lingual/palatino e disto lingual/palatino; exceto os terceiros molares), utilizando-se sonda periodontal reta milimetrada modelo Carolina do Norte (PCPUNC-BR 15, Hufriedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Serão avaliados os seguintes parâmetros periodontais: (1) profundidade de sondagem (PS), aferindo-se a distância, em milímetros, entre a margem gengival

livre e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal; (2) sondagem do nível de inserção clínico (NIC), aferindo-se a distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a porção mais apical do sulco/bolsa periodontal; (3) índice de placa visível (IPV): presença (escore 1) ou ausência (escore 0); (4) índice de sangramento gengival marginal (ISG): presença (escore 1) ou ausência (escore 0), aferido após percorrer levemente a sonda ao longo do sulco/bolsa gengival; (5) sangramento à sondagem (SS): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de sangramento após 20 segundos da sondagem; (6) supuração (SUP): presença (escore 1) ou ausência (escore 0) de supuração espontânea ou após 20 segundos da sondagem; (7) mobilidade dentária (MD), mensurado após uso de instrumento metálico tipo sonda ou espelho clínico apoiado na face vestibular ou palatina, mesial e distal do dente; (8) lesões de furca (LF) utilizando-se sonda periodontal curva milimetrada de Nabers nos molares superiores e inferiores (Vestibular/mesial/distal) e primeiros pré-molares superiores (Mesial/distal) e molares inferiores (Vestibular/lingual). A presença de periodontite crônica foi definida se: PBS $\geq$ 4,0mm e NCI $\geq$ 4,0mm em algum dente e no mesmo sítio e não contíguo, classificando-se a doença periodontal em localizada (menos de 30% dos dentes envolvidos) e generalizada (mais de 30% dos dentes afetados) (ARMITAGE, 1999). O diagnóstico clínico de periodontite crônica baseia-se nas seguintes características: (1) Prevalência maior em adultos, podendo ocorrer em crianças e adolescentes; (2) Taxas de progressão baixas a moderadas; (3) Quantidade de depósitos microbianos consistente com a severidade da destruição periodontal; (4) Nenhum padrão de agregação familiar, e (5) Presença frequente de cálculo subgengival (ARMITAGE, 2004).

Amostras de Biofilme Subgengival e Fluido da Bolsa Periodontal

Para cada paciente serão extraídas amostras de placa subgengival e de fluido das bolsas periodontais mais profunda. As amostras serão coletadas no Ambulatório 2 do IOUFES, logo transferidas para um tubo de plástico Eppendorf e em seguida, mantidas em gelo seco e armazenados em freezer a - 80°C no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano sob coordenação da Prof^a.Dra.Letícia Batista de Azevedo Rangel do Curso de

Farmácia e Bioquímica da UFES. As amostras de placa subgengival e do fluido gengival não serão utilizadas para outros projetos de pesquisa e serão descartadas e incineradas após seu uso neste projeto.

Coleta da Biofilme Subgengival

Após periodontograma completo do (a) paciente, será realizado isolamento relativo e raspagem supra-gengival finalizando com gaze estéril sobre a coroa dentária após irrigação com seringa tríplice. Será selecionado um (01) sítio periodontal com a maior profundidade de bolsa ($\geq 4,0\text{mm}$). Será removida a placa subgengival destes sítios com curetas periodontais Gracey estéreis retas 5-6, 7-8 ou 11-12 ou 13-14, preferencialmente com um golpe de raspagem, ou até 3 golpes, transferida para um tubo plástico de Eppendorf contendo solução 150 μl de TE (Tris- EDTA) mais 100 μl de solução NaOH fresca e em seguida armazenado em freezer a -80°C .

Coleta de Fluido da Bolsa Periodontal

Certificando que a região do sulco gengival esteja previamente sem placa visível clinicamente e seca suavemente com gaze estéril, serão introduzidos 2 cones de papéis endodôntico Dentsplay 35x40 em cada sítio (1 sítio com bolsa periodontal mais profunda) em cada mulher de cada grupo durante 30 segundos, para a coleta do fluido da bolsa periodontal, transferindo para um tubo de plástico Eppendorf com 200 μl de solução Tampão Fosfato de Sódio (PBS) e armazenado a -80°C .

Aquisição das biópsias de tumores de mama das pacientes do grupo caso

Serão selecionadas 50 amostras de biópsias de tumores de mama das pacientes do grupo caso fixadas em bloco de parafina que serão adquiridas pelo Departamento de Patologia Humana da UFES-HUCAM após aprovação do comitê de ética CCS e HUCAM.

Amostras para o diagnóstico da COVID 19

Serão coletadas por punção venosa no antebraço das pacientes em ambos os grupos caso e controle, as amostras de sangue e colocadas em tubos plásticos de 5ml e o plasma centrifugado dentro de 6 horas para sorologia de IgG e IgM. Serão submetidas a exames de Rt-PCR em tempo real para diagnóstico de COVID-19, as amostras de

secreção nasofaríngea e orofaríngea que serão coletadas de acordo com os protocolos estabelecidos entre o 3º e o 7º dia após o início dos sintomas, quando o indivíduo está na fase aguda da infecção somente. O formulário e as amostras devem

ser colocadas em um saco de risco biológico e posteriormente enviados para processamento laboratorial. O jejum não é obrigatório. As amostras serão identificadas com os dados do pacientes e o nome como siglas e demais informações necessárias para rastreamento e armazenadas em freezer -80°C para processamento laboratorial posterior. Em todas as pacientes do grupo caso e controle será feita a testagem sorológica. As pacientes que testarem positivo para COVID 19 serão testadas novamente em 14, 30/60 dias em ambos os grupos. Para as pacientes com sintomas até 7 a 10 dias no momento da coleta, será feito o exame de PCR também em ambos os grupos caso e controle, após aprovação desta emenda pelo comitê de ética e pesquisa CCS e HUCAM.

Terapia Periodontal Básica

Serão realizados tratamentos periodontais básicos (raspagem e alisamento radiculares supra e subgingival, controle de placa, polimento corono-radicular, bochechos com clorexidina a 0,12%, aplicação tópica de flúor, instruções de higiene oral) e reavaliação após seis meses para todos os pacientes dos grupos caso e controle.

Exame Radiográfico

As pacientes serão encaminhadas para a realização do exame radiográfico no Ambulatório 4 (Serviço de Diagnóstico Radiológico Oral), no qual cada paciente será submetida à realização de radiografias de (01) dente selecionado com bolsas periodontais (sítio com bolsa periodontal mais profunda) em cada paciente do grupo caso (mulheres com câncer de mama) e do grupo controle (mulheres sem câncer de mama). Serão utilizados posicionadores do tipo Hanshin. (DentsplyRinn, Elgin, IL, EUA) para técnica interproximal. As radiografias serão realizadas no aparelho Timex 70E (Gnatus, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), operando a 70kVp e 7mA, com tempo de exposição na região de molares igual a 0,63 seg, e 0,5 seg para região de pré-molares. Serão utilizados filmes radiográficos 1.2 (periapical padrão), sensibilidade E (Ektaspeed, Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA). Os filmes serão processados manualmente segundo o método tempo- temperatura, em tanques de processamento instalados em uma câmara escura do tipo quarto. Um

operador experiente e devidamente treinado executará as técnicas e o processamento radiográfico. As pacientes do Grupo Caso comparecerão ao Serviço de Radiologia Odontológica (Ambulatório 4) para a realização dos exames radiográficos em três momentos distintos: T0 (antes do início da quimioterapia), T1 e T2, o mesmo para as pacientes do Grupo Controle, ou seja, em três momentos distintos: T0, T1 e T2.

4.9. Avaliação Radiográfica

A coleta dos dados radiográficos será realizada por dois avaliadores previamente treinados em sessões idênticas às aquelas que serão realizadas no ambiente das avaliações, utilizando imagens não pertencentes à amostra do estudo. Após o treinamento, os exames serão realizados às cegas quanto aos grupos. Em ambiente com iluminação reduzida, o NOA das áreas proximais (mesiais e distais) de cada elemento dentário será mensurado por dois avaliadores, de forma independente (figura 1). Para isso, as radiografias serão fixadas a negatoscópio de luz fria e adaptadas em máscaras negras. As mensurações serão efetuadas da junção esmalte-cimento (JCE) à crista óssea alveolar (COA) utilizando-se um paquímetro digital e lupa com magnificação de 1.3x, como realizado nos estudos de Bahrami et al. (2006) e Vandenberghe et al. (2011). A avaliação radiográfica dos dentes que possuem indicação para extração não será realizada.

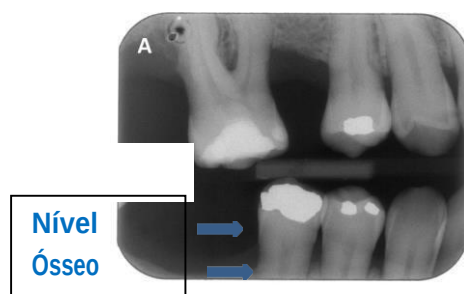


Figura 1: Nível ósseo alveolar, mensurado da junção esmalte-cimento (JEC) à crista óssea alveolar (COA).

4.10. Cronograma das Atividades de Campo

Grupo Caso

TO=Baseline: pré-quimioterapia	T1=90 dias pós-quimioterapia	T2 = 90 dias pós terapia periodontal
--------------------------------	------------------------------	--------------------------------------

Questionário Médico- Odontológico Diagnóstico para Neoplasia de Mama Exame clínico periodontal, Periodontograma, Odontograma, Coleta de placa subgingival Coleta do fluido gengival Avaliação radiográfica Adequação bucal Terapia periodontal Básica	Questionário Médico- Odontológico Exame clínico periodontal, Periodontograma, Odontograma, Terapia periodontal básica Coleta de placa subgingival Coleta do fluido gengival Avaliação radiográfica	Questionário Médico- Odontológica Exame clínico periodontal, Periodontograma, Odontograma, Coleta de placa subgingival Coleta do fluido gengival Avaliação radiográfica Terapia periodontal básica
---	---	--

Grupo Controle

Fase 1= Baseline	Fase 2 = 90 dias em média pós baseline	Fase 3=90 dias pós terapia periodontal
Questionário Médico- Odontológico Diagnóstico Por Imagem para Neoplasia de Mama Exame clínico periodontal, Periodontograma, Odontograma, Coleta de placa subgingival Coleta do fluido gengival Avaliação radiográfica Terapia periodontal básica	Questionário Médico- Odontológico Exame clínico periodontal, Periodontograma, Odontograma, Terapia periodontal básica Coleta de placa subgingival Coleta do fluido gengival Avaliação radiográfica	Questionário Médico- Odontológico Exame clínico periodontal, Periodontograma, Odontograma Coleta de placa subgingival Coleta do fluido gengival Avaliação radiográfica Terapia periodontal básica

OBS: após a última fase serão feitas as coletas de sangue para testagem da COVID 19 em ambos os grupos e análise de biópsias de tumores de mama por PCR.

ELISA para quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α

Serão coletadas um total de 300 amostras distribuídas em 3 momentos da pesquisa (como citado anteriormente) de fluido gengival das bolsas periodontais das mulheres com e sem câncer de mama. Os níveis das citocinas pró- inflamatórias nas amostras de fluido gengival dos sítios com bolsas periodontais nos grupos serão determinados através do método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) por meio do *Human Uncoated ELISA Kit* (Invitrogen- BioSource International, Camarillo, CA). Para a sensibilização inicial da placa será adicionado o anticorpo de captura diluído adicionando 48 μ L de solução AB-CAP para 12 mL de *coating buffer solution*. Em cada placa de ELISA (COSTAR 9018, Corning Life Science, Lowell, MA, USA) serão pipetados 50 μ L/poço do anticorpo de captura diluído. A placa será então selada e incubada por 24 horas a 4°C. Posteriormente, as placas serão lavadas 3 vezes com 500 μ L/poço com uma solução de lavagem (1x PBS, 0.05% Tween 20) em uma lavadora automática. Este protocolo de lavagem será utilizado em todas as etapas de lavagem das placas. Para o bloqueio dos poços, uma solução de 15 mL de *Assay Diluent* será preparada, e adicionará 200 μ L por poço. Logo após as placas serão incubadas a temperatura ambiente por 1 hora, lavadas e adicionará 50 μ L das amostras clínicas em cada um dos poços. Em seguida, os padrões disponíveis no kit serão diluídos de forma seriada dos para confecção da curva padrão e as placas incubadas por 24 horas. Após as placas serem lavadas novamente, e adicionará 50 μ L de anticorpo de detecção por poço, e as placas serão incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Passado o período de incubação, as placas serão lavadas novamente e então serão adicionados 50 μ L/poço de *Avidin-HRP* diluída em *1x assay diluent*. As placas serão seladas e incubadas por mais 30 minutos. Após esse tempo, as placas serão lavadas, e adicionará 50 μ L de *substrate solution* e novamente incubadas por 15 minutos. Passado o tempo de incubação, serão adicionados 25 μ L/poço da solução de parada (1M H₃PO₄). As placas serão então colocadas em uma leitora de ELISA (ELx 800 - Bio- Tek) e lidas e ajustadas no comprimento de onda de 450 nm.

Análise Microbiológica do Biofilme Subgengival (UNG)

Serão coletadas 300 amostras de biofilme (placa subgengival) das bolsas periodontais distribuídas em 3 momentos da pesquisa (como citado anteriormente) da bolsa mais periodontal mais profunda, utilizando-se curetas

periodontais Gracey (Hu-friedyMfgCo Inc. Chigago IL). Será selecionado um sítio com bolsa periodontal mais profunda e um (01) sítio periodontal com bolsa rasa em cada mulher de cada grupo. As amostras serão transferidas para tubos de plásticos (Eppendorf) contendo 300ul de solução tampão TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, pH 7,6) e estocados a -80°C , logo após enviadas para hibridização checkerboard DNA-DNA e hibridização das membranas com as sondas de DNA. Para detecção das espécies cada sinal produzido por uma determinada sonda na amostra de placa será comparado em intensidade ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 bactérias. Desta forma, o número “0” será registrado quando não houver detecção do sinal; “1” equivalerá a um sinal menos intenso que o controle de 10 células; “2” equivalerá a aproximadamente 10^5 células; “3”, entre 10^5 e 10^6 células; “4” aproximadamente 10^6 células e “5”, mais de 10^6 células. Estes registros serão então utilizados para determinar os níveis das diferentes espécies investigadas no estudo, expressos em nível médio de cada espécie (contagem) em cada sítio.

Reação em cadeia de polymerase (PCR) do DNA Bacteriano

50 amostras de biópsias de tumores de mama fixadas em bloco de parafina serão processadas neste ensaio. Para controle positivo interno, foi utilizada uma amostra de biópsia de uma paciente que teve a progressão da periodontite durante a quimioterapia. O controle negativo consistiu de água destilada e deionizada. Os tecidos embebidos em blocos de parafina serão desparafinados em 600μl de xileno. Serão colocados em banho-maria e pré aquecidos por 10 min à 65°C , seguido de 45 min a 67°C . Após incubação, os tubos serão centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a uma temperatura de 25°C . Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e ao precipitado adicionará 600μl de etanol a 95°C Gl. Centrifugará os tubos novamente a 10.000 rpm 5 min a 25°C e

desprezar o sobrenadante. Para extração de DNA, ao material biológico obtido na desparafinização adicionará 1ml de água destilada mais 200µl de solução de proteinase K na concentração de 10mg/ml. O material será deixado em banho-maria por 3 horas a 55°C e adicionará mais 100µL de solução de proteinase K (pK) na concentração de 10 µg/mL, deixando-se os tubos por 9 horas à temperatura de 60°C. Ao final da digestão proteolítica com pK, todo o material será transferido para tubos novos, onde se adicionou 600 µL de álcool isopropílico PA. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado por 1 minuto e depois centrifugado à 14.000 rpm por 6 minutos à temperatura de 25°C. Após a centrifugação, desprezou-se todo o conteúdo dos tubos que foram então deixados em posição invertida para secar. Adicionou-se aos tubos secos 50 µL de água destilada e deionizada que foram, por sua vez, levados à temperatura de 65°C por 15 minutos para re-hidratação do DNA. Os tubos foram então congelados à temperatura de - 20°C até o momento de uso.

Quantificação do DNA por Fluorometria

Terminado o processo de extração, as amostras serão quantificadas em um fluorômetro DQ200 Dynaquant Fluorometer (*Hoeffer Inc.*) utilizando-se o protocolo indicado pelo fabricante, serão obtidas concentrações de DNA satisfatórias (Tabela II).

Amplificação por PCR

As amostras foram submetidas à PCR para amplificação de fragmentos genômicos de DNA bacteriano mediante à amplificação da região cromossômica. Utilizará um termociclador Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler AB (*Applied Biosystems*, USA) Com a totalidade de 40 ciclos, as possíveis cópias da região alvo poderão ser em número de bilhões.

Infra-Estrutura da Instituição Executora e das Colaboradoras:

- Microscópio Olympus AX70, acoplado ao sistema de imagem U-MCB com *software Sigma Image*,
- Duas microcentrífugas Sigma, modulo 2/3;
- Centrífuga refrigerada;
- Criostato SLEE, Mars, modelo MHR;
- Balança analítica Optronic;
- Balança digital ACATE;

- pHmetro;
- Termociclador para PCR;
- Deionizador TKA 800/1900;
- Capela de exaustão;
- Autoclave;
- Microondas;
- Freezers e geladeiras;
- Microscópio eletrônico;

Análise Estatística

A análise estatística será caracterizada por meio da frequência observada, porcentagem, medidas de tendência central e de variabilidade. O teste *t* de Student será utilizado para verificar as diferenças entre as médias das variáveis sócio clínicas demográficas dos pacientes entre os grupos caso e controle. A regressão de Poisson servirá para quantificar a razão de risco de ter dentes cariados, obturados, perdidos e com extração indicada entre os grupos avaliados. O teste ANOVA de 1 via (um braço/cauda) será usado para análise de uma variável contínua e diversas variáveis categóricas. As análises estatísticas serão realizadas pelo software Stata versão 12 e o IBM SPSS *statistics* versão 21. O nível de significância será de 5% e intervalo de confiança de 95%. Os dados serão registrados em uma planilha no programa Excel da Microsoft, versão 2010.

5. RESULTADOS E IMPACTOS ESPERADOS

Como resultados diretos do projeto, espera-se:

- 1) Obter um melhor entendimento da microbiota oral, em ambos os grupos;
- 2) Determinar a diversidade das comunidades intituladas de complexos microbianos nos microambientes bucais (bolsas periodontais), através de estudos quantitativo e qualitativo de seus constituintes;
- 3) Conhecer as espécies de bactérias relacionadas à condição do desenvolvimento do câncer como requisito para compreender alguns fatores relacionados à sua provável origem;
- 4) Identificar espécies de bactérias raras ou previamente não relatadas;
- 5) Determinar o nível de qualidade de vida por meio de intervenções bucais na redução de agravos e prováveis co-morbididades;
- 6) Treinar pessoal qualificado para o exercício da pesquisa e do magistério superior no campo da Biotecnologia em Saúde;
- 7) Desenvolver pesquisas na área da Biotecnologia em Saúde, sob perspectiva multi e interdisciplinar marcadores de diagnóstico para a doença periodontal e para o câncer de mama

Espera-se conhecer o perfil microbiológico e inflamatório da doença periodontal e o efeito da terapêutica periodontal adotada para essas pacientes no sentido de se propor uma metodologia de tratamento apropriado visando obter resposta clínica bucal mais favorável ao processo saúde – doença no sentido da redução de tempo terapêutico, menor tempo de sessões empregadas, e redução do número de visitas dos pacientes e melhor qualidade de vida. Ainda não há na literatura dados que respondam a este questionamento. Existe a possibilidade dos resultados encontrados nos grupos serem semelhantes, e essa observação será extremamente valiosa em virtude da escassez de informações sobre o tema. Para tanto, espera-se encontrar desfechos primários relacionados às características clínicas sócio-demográficas mais prevalentes nos grupos investigados. Além disso, encontrar uma redução do número total de bactérias subgengivais, redução do número de espécies bacterianas consideradas mais patogênicas como o dos Complexos Vermelho e Laranja, e redução dos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α . O conhecimento da diversidade bacteriana nos microambientes bolsas periodontais possibilita a determinação do grau de similaridade das comunidades microbianas inter e entre pacientes, podendo direcionar futuras terapias antimicrobianas específicas, seja em nível de sítio ou indivíduo, mais eficaz e seguro. Por outro lado, a identificação de bactérias raras ou até mesmo desconhecidas, trará possibilidade da realização de investigações complementares mais aprofundadas sobre o seu papel na etiologia das doenças bucais. Por fim, o conhecimento técnico-científico adquirido neste projeto poderá ser utilizado em outras investigações similares conduzidas na região do Estado do Espírito Santo ou sob a forma de estudos multicêntricos nacionais e internacionais, principalmente na área de detecção molecular de patógenos bucais humanos e projetar a adoção de políticas de saúde pública bucal neste grupo de risco vulnerável. Além disso, encontrar uma redução dos níveis das citocinas expressas na resposta inflamatória da doença periodontal após intervenção bucal neste grupo de risco. Portanto, a proposta deste estudo visa identificar alterações presentes nas amostras de placa dental e do fluido gengival de mucosas gengivais (periodonto doente) de pacientes com câncer de mama para o desenvolvimento de biomarcadores moleculares como as citocinas pró-inflamatórias para diagnóstico de doença periodontal, a fim de comparar a exposição da periodontite nos grupos com e sem câncer de mama e, dessa forma, contribuir para estudos futuros que visam identificar a

relação destes biomarcadores presentes na periodontite com a doença câncer de mama. Logo, busca-se poder contribuir para a saúde pública fornecendo novos dados de pesquisa na área de câncer de mama, doença que leva à morte de milhares de mulheres no mundo, todos os anos, e que vem crescendo de forma preocupante. Os resultados obtidos neste estudo servirão de instrumento para outros projetos que envolvam a busca do entendimento da doença periodontal, sua evolução e terapêutica, a fim de beneficiar a população, não só com informação a respeito dos fatores causadores como também sobre as formas de prevenção e melhora da qualidade de vida.

CRONOGRAMA

[illegible]

Ano:2019

[illegible]

Avaliação Radiográfica											X	X	X
------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---	---

Ano: 2020													
AÇÕES/ETAPAS	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Pesquisa Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Terapêutica Periodontal e Avaliação Radiográfica	X	X											
Avaliação Elisa/Fluido Gengival Fase 2			X										
Escrita e Submissão de Emenda na Plataforma Brasil-CCS e aprovação										X	X	X	
Escrita e Submissão de Artigo											X		X
Exame de Qualificação de Tese													X

Ano: 2021

AÇÕES/ETAPAS	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Pesquisa Bibliográfica	X	X	X	X	X								
Terapêutica Periodontal Fase 3			X										
Avaliação Elisa/Fluido Gengival Fase 3	X												
Avaliação Radiográfica Fase 3	X	X											
Avaliação Microbiológica/Placa dental Fase 1,2 e 3		X											
Análise do DNA bacteriano nas biópsias do grupo caso por PCR		X											
Coleta de amostras para testagem da COVID 19 nos grupos e análise laboratorial.		X											
Escrita, submissão de artigo, revisão e defesa da tese				X	X								

6. ORÇAMENTO PREVISTO

O orçamento deste estudo será compartilhado entre os pesquisadores responsáveis pelo projeto na UFES e dentro do possível será submetido às agências de fomento FAPES, CNPq, Vale, etc.

Item	Quantidade	Descrição	Preço unitário	Preço total
01	4.500 Unidades	Tubos tipo Eppendorf/Criotubo2,0ml		R\$ 300,00
02	02	Passagem aérea (ida e volta) para Guarulhos/SP Congresso da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (Campinas-SP) ou Evento de Biotecnologia	R\$ 250,00	R\$ 500,00
03	----	Análise Estatística	-----	-----
04	2 diárias	Hospedagem Guarulhos/SP	R\$250,00	R\$500,00
total				R\$ 1.300,00

Elementos de despesas laboratoriais	Valores (R\$)
Material para manutenção das linhagens (meio de cultura, antibióticos, antifúngicos, soro, sistema de filtração, utensílios plásticos e descartáveis, dentre outros)	R\$ 500,00
Pipetas, ponteiros plásticos, etc.	R\$ 500,00
Material de consume	R\$ 500,00
Soluções PBS e TE	R\$ 185,00
kit citocinas	R\$11.000,00
Sondas de DNA para checkerboard	R\$ 2.500,00
Material checkerboard	R\$ 5.000,00
Total	R\$21.485,00

Material para testagem da COVID 19 e análise de biópsias de tumores de mama por PCR

Elementos de despesas laboratoriais	Valores (R\$)
Material para PCR de biópsia de tumores de mama, kit de extração e amplificação de DNA . <u>Fonte: adquiridos pelo material de consumo do Centro de Ciências da Saúde requisitado via memorando à direção do CCS.</u>	R\$ 2200,00
Material de EPI	R\$ 1000,00
Tubos para coletas sanguíneas, seringas descartáveis e insumos para coleta de swab de 100 pacientes	R\$ 300,00
Total	R\$ 3500,00

OBS: os itens como: ponteiros plásticos descartáveis, soluções PBS, TE e tubos falcon serão adquiridos pelo laboratório da orientadora Prof Leticia Batista Azevedo Rangel. Material de EPI e de coleta de amostras para testagem da COVID 19 já estão comprados com recursos próprios da doutoranda Maria da Conceição Machado Gomes. Os testes para COVID 19 serão feitos em parceria com o laboratório central (LACEN) e com autorização da secretaria estadual de saúde (SESA) cuja anuência está anexada na PB.

DIVULGAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados referentes à este presente projeto de pesquisa serão divulgados conforme descrição a seguir:

1. Apresentação dos dados em pelo menos 01 congresso nacional e 01 congresso internacional com franco incentivo à participação dos alunos envolvidos na execução do projeto;
2. Publicação em revistas indexadas no QUALIS CAPES.

REFERÊNCIAS

ARJUNAN, P. et al. Oral Pathobiont Activates Anti-Apoptotic Pathway, Promoting both Immune Suppression and Oncogenic Cell Proliferation.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil, 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em: 07 de dezembro de 2017.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, 61(2): 69–90, 2011.

ROSS JS, SLODKOWSKA EA, SYMMANS WF, PUSZTAI L, RAVDIN PM, HORTOBAGYI GN. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. **The Oncologist**, 14(4):320-68, 2009.

SIEGEL R, WARD E, BRAWLEY O, JEMAL A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin**, 61(4):212, 2011.

OFFENBACHER S. Periodontal Diseases: Pathogenesis. **Ann Periodontol**, 1996; 1:821-78.

PAGE RC. Periodontal Diseases: A New Paradigm. **J Den Educ**, 1998; 62:812-21;

SORSA T, TJÄDERHANE L, KONTTINEN YT et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. **Ann Med**, 2006; 38(5): 306-21;

PAPAPANOU PN, ABRON A, VERBITSKY M, PICOLOS D, YANG J, QIN J et al. Gene expression signatures in chronic and aggressive periodontitis: a pilot study. **Eur J Oral Sci**, 2004; 1123: 216-223;

PARHI, L., et al. Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. **NATURE COMMUNICATIONS** | (2020) 11: 3259

MAHANONDA R; PICHYANGKUL S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. **Periodontol 2000**, 2007; 43:41-55;

DEMMER RT, BEHLE JH, WOLF DL, HANDFIELD M, KEBSCHULL M, CELENTI R et al. Transcriptomes in healthy and diseased gingival tissues. **J Periodontol**, 2008; 79:2112-2124;

KIM DM, RAMONI MF, NEVINS M et al. The gene expression profile in refractory periodontitis patients. **J Periodontol**. 2006; 77:1043-1050;

LIEDKE PER, FINKELSTEIN DM, SZYMONIFKA J, BARRIOS CH, CHAVARRI-GUERRA Y, BINES J, et al. Outcomes of breast cancer in Brazil related to health care coverage: a retrospective cohort study. **Cancer Epidemiol, Bio & Prev**, 2014; 23(1):126-133.

APÊNDICE A**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO/CCS****A1 -QUESTIONÁRIO AVALIAÇÃO MÉDICA-ODONTOLÓGICA**

1) Está sobre tratamento médico?

() Sim () Não

Por qual motivo? _____

2) Está tomando algum medicamento?

() Sim () Não

Qual (is)? _____

3) Já esteve hospitalizado?

() Sim () Não

Qual motivo? _____

4) Já teve ou tem alguma das enfermidades abaixo citadas:

Doença do coração () Sim () Não () Não sei

Hipertensão arterial () Sim () Não () Não sei

Hipotensão arterial () Sim () Não () Não sei

Alergia () Sim () Não () Não sei _____

Asma () Sim () Não () Não sei

Artrite () Sim () Não () Não sei

Úlcera () Sim () Não () Não sei

Doença nos rins () Sim () Não () Não sei

Epilepsia () Sim () Não () Não sei

Diabetes () Sim () Não () Não sei

Sinusite () Sim () Não () Não sei

Hepatite () Sim () Não () Não sei

Sarampo () Sim () Não () Não sei

Gastrite () Sim () Não () Não sei

Tuberculose () Sim () Não () Não sei

É portador do Vírus HIV? () Sim () Não () Não sei

Doenças da infância? () Sim () Não () Não sei

COVID 19 () Sim () Não () Não sei

Relate os sintomas:

5) Já sofreu algum traumatismo na face? () Sim () Não () Não sei

6) Apresentou alguma reação adversa ao tratamento médico ou odontológico (lipotímia, síncope)? () Sim () Não () Não sei _____

7) Você percebe que a sua saúde bucal está: Boa () Regular () Ruim () Não sei ()

8) Você percebe que a sua saúde geral está: Boa () Regular () Ruim () Não sei ()

9) Ganhou () ou () Perdeu peso nos últimos dois anos?

Avaliação do histórico odontológico

10) Tem acompanhamento odontológico?

() Sim () Não () Não sei () vezes por ano

Data do último atendimento: _____

Experiências negativas no tratamento odontológico? () Sim () Não

11) Tratamentos anteriores: () Periodontia () Endodontia () Ortodontia

() Protético () Restauração () Cirúrgico

Outros: _____

12) Sangramento gengival: () Sim () Não () Não sei

Quando: () Provocada () Espontânea

13) Sente dor nos dentes ou próximos a ele: () Sim () Não () Não sei

Se sente dor, ela é: () Forte () Fraca () Localizada () Difusa

14) Sua gengiva cresceu (aumento gengival)? () Sim () Não () Não sei

15) Sua gengiva diminuiu (recessão gengival)? () Sim () Não () Não sei

16) Seus dentes estão ou já estiveram moles? () Sim () Não () Não sei

17) Sua gengiva tem ou já teve bolhas (abscessos, fístula)? () Sim () Não () Não sei

18) Algum dentista já te disse que você tem doença periodontal? () Sim () Não

() Não sei

19) Dificuldade de mastigação/deglutição: () Sim () Não () Não sei

20) Dor na ATM? () Sim () Não () Não sei

21) Aftas recorrentes: () Sim () Não () Não sei

22) Herpes labial: () Sim () Não () Não sei

23) Já fez radioterapia de cabeça e pescoço? () Sim () Não () Não sei

24) Outro problema de saúde bucal não relacionado? _____

Avaliação dos hábitos comportamentais

25) Bruxismo _____ Outros _____

26) Frequência de escovação: () 1 () 2 () 3 () 4

27) Tipo de escova dental: () Macia () Média () Dura () Não sabe

28) Uso de fio dental: () Sim () Não () Às vezes () Nunca

29) Uso de bochechos: () Não () Não sei () Sim, Qual? _____

Frequência: _____.

30) Usa palito dental? () Não () Sim. Frequência: _____ 31)

31) Consome doce/açúcar? () Sim () Não () Não sei. Frequência: _____

32) Alimentação saudável: () Sim () Não () Não sei

33) Tem horários específicos para se alimentar? () Sim () Não () Às vezes () Nunca

34) Tem sensação de boca ou lábios ressecados? () Sim () Não () Não sei

35) Usa prótese dentária? () Sim () Não () Às vezes () Nunca

Tipo de higienização da prótese: _____

A2- QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO /COVID 19

Nome da Unidade: HUCAM/CCS/UFES

Nome do paciente: _____

DN: ____/____/____

Locais de trabalho:

DATA: ____/____/____

1- Apresentou ou apresenta algum dos sinais e sintomas abaixo?

	Sim há 15 dias	Sim na última semana	Sim apresento no momento	Data de início de sintomas	Não
Desconforto respiratório					
Falta de ar/cansaço					
Congestão nasal/coriza Irritação, coceira ou dor de garganta					
Tosse					
Crise de asma, bronquite e/ou rinite					
Episódio de diarreia					
Diminuição ou perda do olfato e/ou paladar					
Perda total ou diminuição do apetite					

2- EM ATIVIDADES DIVERSAS SE HOUVER

1. Tem contato com a população no desempenho de alguma função ? () Sim () Não

2. Que tipo de contato? () Direto: Sem barreira física ou distanciamento () Indireto: com separação por barreira física

3. Utiliza máscara durante todo o expediente de trabalho? () Sim () Não/ EPI? () Sim () Não

4. No seu local de trabalho o espaço é: () Ambiente compartilhado () Ambiente comum de uso individual () Acesso restrito

5. Em caso de ambiente compartilhado, existe a desinfecção do local entre um usuário e outro? () Sim () Não

) Não () Não se aplica (administrativo)

6. Tem acesso e faz uso de Álcool 70% (gel e líquido) durante o período de trabalho? () Sim () Não

7. Jornada de trabalho que está cumprindo () presencial 8 horas () presencial 6 horas () semi presencial () home office () outras

8. Faz pausa durante a jornada de trabalho? Se sim, duração do intervalo? () Sim: tempo: _____ () Não

9. Equipe de trabalho tem seguido orientações de boas práticas? () Sim () Não

10. Trabalha e mora na mesma cidade? () Sim () Não. Qual a cidade de moradia? _____

11. É usuário de: () Transporte público () Transporte particular próprio () Carona () Não usa transporte

12. Sobre a rotina de deslocamento após o início da quarentena, que atividades estão mantidas: () Compras presenciais () Shopping () Caminhada () Igreja () Trabalho () Rotina normal

13. Nos últimos 15 dias viajou, visitou ou recebeu visitas de parentes e amigos? () Sim () Não

14. Ficou afastado quando iniciou sintomas? () Não () Sim.

Data do Afastamento: ____/____/____ à ____/____/____

15. Alguém em sua casa apresenta sintoma ou teste positivo para COVID-19? () Sim () Não

16. Realizou algum dos testes para COVID-19?

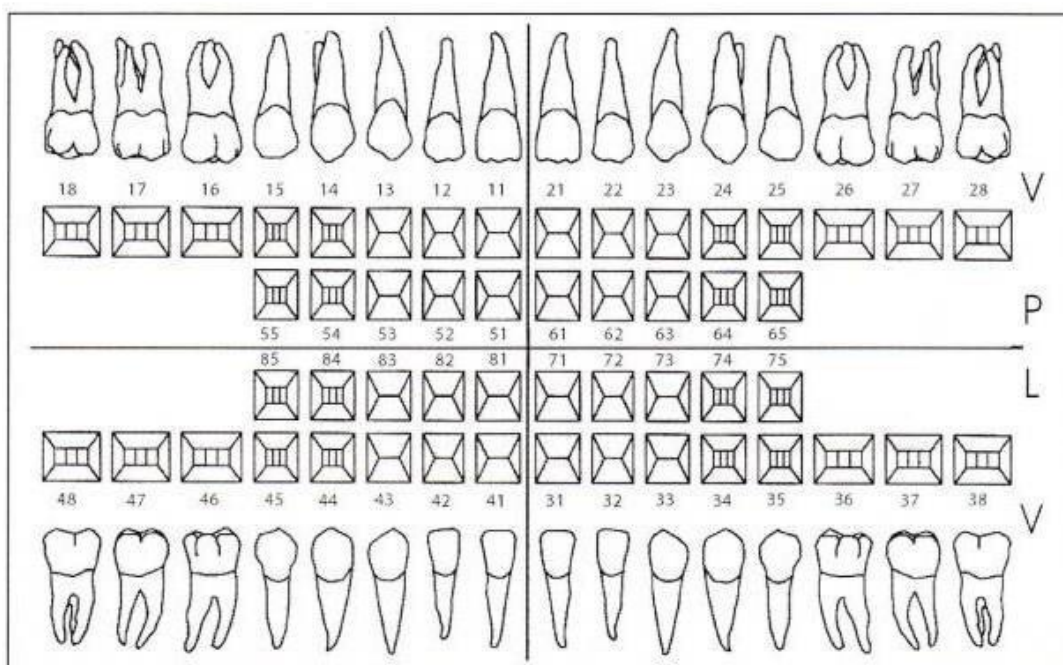
A. () RT-PCR Data: ____/____/____ Resultado: () Positivo () Negativo () Em andamento B. ()

Antígeno ou Anticorpos IgM/IgG Data: ____/____/____ Resultado: () Positivo () Negativo () Em andamento C. ()

Teste Rápido Data: Data: ____/____/____ Resultado: () Positivo () Negativo () Em andamento

APÊNDICE B

ODONTOGRAMA

[illegible]

PERIODONTOGRAMA



PERIODONTOGRAMA

NOME: _____

IDADE: _____

DATA: _____



	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
IPV																
ISG																
PS																
NCI																
SS																
SUP																
F																
M																
IPV																
ISG																
PS																
NCI																
SS																
SUP																

VESTIBULAR

PALATINA

	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
IPV																
ISG																
PS																
NCI																
SS																
SUP																
F																
M																
IPV																
ISG																
PS																
NCI																
SS																
SUP																
F																

VESTIBULAR

LINGUAL

LEGENDA:

IPV - ÍNDICE DE PLACA VISÍVEL (0 - sem placa ou 1 - com placa)

ISG - ÍNDICE DE SANGRAMENTO GENGIVAL (0 - sem sangramento ou 1 - com sangramento)

PS - PROFUNDIDADE DE SONDAGEM (mm)

NCI - NÍVEL CLÍNICO DE INSERÇÃO (mm)

SS - SANGRAMENTO A SONDAÇÃO (0 - não sangrou ou (1 - sangrou - marcar com caneta vermelha)

SUP - SUPURAÇÃO (0 - não supurou) ou (1 - supurou - marcar com caneta vermelha)

F - FURCA (nada, I, II ou III)

M - MOBILIDADE (nada, I, II ou III)

Ass. do participante/ paciente

Ass. do aluno

Ass. Do pesquisador/ professor

APÊNDICE C



APÊNDICE D

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO-UFES

Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória- ES, CEP 29040-090

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) e TCLE atualizado estará anexado

A Sra. _____ foi convidada a participar da pesquisa intitulada
**“CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS COM
PERIODONTITE CRÔNICA EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA”,**
sob responsabilidade de Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa.

JUSTIFICATIVA

A presença de placa dental pode causar uma inflamação na gengiva conhecida como periodontite (perda óssea ao redor dos dentes). Através do presente estudo, verificaremos quais são as substâncias (citocinas) contidas nas gengivas inflamadas e quais os germes (bactérias) presentes nestas gengivas das mulheres com câncer de mama antes e após o tratamento da quimioterapia e nas mulheres sem câncer de mama.

OBJETIVOS DA PESQUISA

Este trabalho propõe-se a realizar um estudo sobre a presença de citocinas e de bactérias nas gengivas inflamadas de mulheres com e sem câncer de mama.

PROCEDIMENTOS

Esta pesquisa constará de exame das gengivas, exame de Raios X dos dentes inflamados, da presença de dentes com cárie, dentes obturados, dentes perdidos, e dentes indicados para extração, e de raízes residuais através de um espelho bucal, sonda periodontal reta e curva, questionário sócio-demográfico e da coleta da secreção gengival de dois dentes com gengivas inflamadas e da coleta da placa dental dos mesmos dentes. Esses exames serão realizados por uma Cirurgiã-dentista, especialista em Periodontia (gengiva) e por alunos selecionados do Curso de Odontologia no Ambulatório 2 da Odontologia da UFES (Instituto de Odontologia da UFES-IOUFES) sob a Orientação do Prof. Dr. Alfredo Feitosa, durante três momentos: Um momento antes de iniciara quimioterapia; o segundo momento de até 3 meses após a quimioterapia e o terceiro momento, seis meses após a última intervenção dos Dentistas nos dentes e nas gengivas. O tratamento das gengivas será feito por meio de raspagem e alisamento das raízes das gengivas inflamadas, controle de placa dental, polimento dos dentes com pasta abrasiva e aplicação tópica de flúor em todos os dentes de todas as pacientes. As amostras das secreções das gengivas inflamadas para verificar a presença das citocinas serão armazenadas em freezer a -80° C e serão

analisados no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da UFES e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFES sob coordenação da Dr^a. Leticia Batista de Azevedo Rangel; e as amostras de placa dental serão analisadas no Laboratório de Biologia Oral, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de Guarulhos sob coordenação da Dr^a. Magda Feres.

DURAÇÃO E LOCAL DA PESQUISA

Os procedimentos odontológicos (Exame das gengivas, Raios X das gengivas inflamadas; raspagem das raízes dos dentes inflamados; controle de placa dental, polimento dos dentes com pasta abrasiva e aplicação tópica de flúor nos dentes) serão realizados na Clínica de Periodontia do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES) no Ambulatório 2 sob a coordenação do Prof. Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa e sob condução da Doutoranda Maria da Conceição Machado Gomes (BIOTECH) e dos alunos selecionados do Curso de Odontologia e os exames laboratoriais serão realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer Humano do Curso de Farmácia e Bioquímica da UFES e no Laboratório de Biologia Oral, Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos (UnG). A duração dessa pesquisa é de até dois (02) anos. Todas as pacientes receberão gratuitamente o tratamento gengival e será assistidas e acompanhadas por uma especialista (MCMG) e pelos alunos selecionados do Curso de Odontologia no Ambulatório 2 do Instituto de Odontologia da UFES (IOUFES).

RISCOS E DESCONFORTOS

O desconforto será mínimo, tais como: dor, pequeno edema do local, sangramento gengival no momento da raspagem das gengivas. Todas as pacientes serão informadas dessa situação clínica que é de rotina na prática odontológica, e poderão receber anestesia local ou regional caso haja algum desconforto maior. As pacientes receberão medicação (analgésicos) pelos Dentistas para tratar a dor de acordo com a orientação médica. Para os prováveis edemas após os tratamentos das gengivas serão prescritos aplicação de compressas com gelo no local, e todas as medidas terapêuticas serão realizadas por meio de ações de rotina da prática odontológica a ser realizado pela especialista em Periodontia (MCMG) e pelos alunos selecionados do Curso de Odontologia.

BENEFÍCIOS

Os resultados desta pesquisa poderão contribuir para saber quais são as alterações que ocorrem na quantidade de citocinas (moléculas) responsáveis pela inflamação e na quantidade de bactérias nas gengivas, antes e após a terapia bucal (tratamento periodontal) dos tecidos gengivais com inflamação gengival. Dessa maneira, a Dentista (Periodontista) poderá orientar melhor os pacientes quanto ao período de retorno de suas consultas ao Dentista; quanto aos cuidados que devem ser tomado em relação à adequada higienização bucal no período de tratamento gengival, bem como alertar à população das consequências da falta de higiene oral.

GARANTIA DE MANUTENÇÃO DO SIGILO E PRIVACIDADE

Toda informação obtida neste estudo será confidencial. Em nenhum momento o seu nome será divulgado, sendo tratado apenas por um número ou sigla. Apenas as pessoas envolvidas no estudo terão acesso a estas informações. Os pesquisadores se comprometem a resguardar sua identidade durante todas as fases da pesquisa, inclusive após publicação.

DESTINO DE MATERIAIS E/OU DADOS DA PESQUISA

Todos os resultados do trabalho em questão serão tornados públicos pelos meios normais de comunicação científica. Poderão ser apresentados através de publicações em periódicos científicos nacionais e internacionais, apresentados oralmente, como palestras, conferências e sob forma de painéis em encontros científicos ou congressos na área tratada.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO FINANCEIRO

Como os exames serão realizados no mesmo local para o tratamento, não haverá nenhuma despesa adicional para participar da pesquisa. Portanto, não haverá o ressarcimento.

GARANTIA DE INDENIZAÇÃO

Em qualquer momento, se houver algum dano, comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

GARANTIA DE RECUSA EM PARTICIPAR DA PESQUISA E/OU RETIRADA DE CONSENTIMENTO

A participante não é obrigada a participar da pesquisa e de negar a responder perguntas que não fazem parte da estrutura dos exames podendo deixar de participar dela em qualquer momento de sua execução, sem que haja penalidades ou prejuízos decorrentes de sua recusa, bem como caso decida retirar seu consentimento.

ESCLARECIMENTOS E DÚVIDAS

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa ou para relatar algum problema, a Sra. pode contatar a pesquisadora MARIA DA CONCEIÇÃO MACHADO GOMES no telefone (27) 9 9805-6922, e-mail falecomaria@gmail.com, ou endereço Rua Aurora de Aguiar Ferreira, nº 90 Bloco: O Apto: 303 Jardim Camburi, Vitória-ES CEP: 29090-310, BRASIL, ou o Dr. ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA no telefone (27) 3335-7273/7191, e-mail: alfredofeitosaufes@gmail.com, ou no endereço Rua Piratininga, nº 33 Apto: 703ª Praia da Costa, Vila Velha CEP: 29101-220, BRASIL. Tem a garantia de que receberá todas as informações, respostas e esclarecimentos sobre qualquer dúvida à cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a esta pesquisa. O Comitê de Ética em Pesquisa do CCS (27) 3335-7201, e-mail cepe@ccs.ufes.br ou correio: **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, GEP (gerência de ensino e pesquisa), Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe, CEP 29040-090, Vitória-ES, Brasil.** O CEPE tem a função de analisar os projetos de pesquisa visando a proteção dos participantes dentro de padrões éticos nacionais e internacionais. Seu horário de funcionamento é de segunda a sexta-feira, de 8 às 14 horas.

DECLARAÇÃO DE INFORMAÇÃO, ASSINATURA E DE RECEBIMENTO DE UMA VIA ORIGINAL

Declaro que fui verbalmente informado e esclarecido sobre o presente documento, entendendo todos os termos acima expostos, e que voluntariamente aceito participar deste estudo. Também declaro ter recebido uma Via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de igual teor, assinada pelo(a) pesquisador(a) principal ou seu representante, rubricada em todas as páginas.

Vitória-ES, _____ de _____ de _____

Participante da pesquisa/Responsável legal

DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Na qualidade de pesquisador responsável pela pesquisa "**CITOCINAS DO FLUIDO GENGIVAL E MICROBIOTA SUBGENGIVAL DE SÍTIOS COM PERIODONTITE CRÔNICA EM MULHERES COM E SEM CÂNCER DE MAMA**", sob a responsabilidade do Professor: Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, eu, Maria da Conceição Machado Gomes, declaro ter cumprido as exigências do(s) item(s) IV.3 e IV.4, da Resolução CNS 466/12, a qual estabelece diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa – Pesquisador Responsável

Maria da Conceição Machado Gomes

ANEXO 1: CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL CID 10

1.1 K05 - GENGIVITE E DOENÇAS PERIODONTAIS

K050 - Gengivite aguda

K051 - Gengivite crônica

K052 - Periodontite aguda

K053 - Periodontite crônica

K054 - Periodontose

K055 - Outras doenças periodontais

K056 - Doença periodontal, sem outra especificação