

Francisco Isaak Nicolás Ciesielski

Microrganismos oportunistas e exógenos na microbiota bucal de pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço

ARAÇATUBA-SP

2010

Francisco Isaak Nicolás Ciesielski

Microrganismos oportunistas e exógenos na microbiota bucal de pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, para a obtenção do Grau de “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior

ARAÇATUBA-SP

2010

Dedicatória

A Hilda e Telma, minhas mães, por terem sido as responsáveis por tudo o que sou e pelo seu amor incondicional e onipresente.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Elerson Gaetti Jardim Júnior,

Pela confiança e amizade e por fazer acreditar que a busca do conhecimento é fundamental para o sucesso. Também por mostrar que, apesar das distâncias, existem pessoas que nos amam, independente das suas idades, e que precisam de nós, ainda que não nos falem.

A Ricélia Possagno,

minha namorada, pela compreensão, amor e apoio

A professora Ana Cláudia Okamoto,

Por me acolher como parte da equipe da Microbiologia e Imunologia, e por mostrar que o amor e a responsabilidade ao que se faz é necessário no caminho da felicidade.

Aos professores Alvimar Lima de Castro e Glauco Issamu Miyahara

Pelo acolhimento, incentivo, confiança e amizade.

A colega de Mestrado Fátima Regina Nunes Souza

Por possibilitar a continuação de um trabalho de grande valor científico e social.

As acadêmicas e estagiárias da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e Laboratório de Microbiologia e Imunologia

Pela inestimável ajuda, amizade e confiança.

Aos Professores amigos Rosângela Pironti de Castro, Tito Lúcio Fernandes e William Abib Scheidt,

Por terem sido mestres na condução e transmissão do conhecimento

Aos amigos do mestrado em Cirurgia Cassiano Pereira e Walter Gealh

Pelo incentivo e pelos momentos de alegria compartilhados.

Aos Amigos da Pós-Graduação Antonio Carlos Marqueti e Jorgiana Sangalli

Por mostrar que, apesar de existirem tempos difíceis em nossas vidas, nunca podemos perder a alegria e que a dedicação e o empenho são fundamentais para o sucesso.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do seu coordenador, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior pela oportunidade da realização do curso de Mestrado em Odontologia na área de concentração em Estomatologia.

A Prof.^a Dr.^a. Christiane Marie Schweitzer pela inestimável ajuda.

Ao Dr. Winston Bastos, diretor clínico da Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa/PR e ao Dr. Rubens Adão da Silva, médico do Instituto Sul Paranaense de Oncologia em Ponta Grossa/PR, pela atenção e incentivo.

Aos Drs. Edson Alves (Superintendente da Secretaria de Saúde de Ponta Grossa/PR), Edson Chaves (Gerente de Odontologia Secretaria de Saúde de Ponta Grossa/PR) e Paulo Roberto Pagano (Gerente de Especialidades Odontológicas da Secretaria de Saúde de Ponta Grossa/PR) por me permitir realizar este curso, entendendo que a ampliação do conhecimento pessoal se traduz também em melhorias no atendimento da saúde pública.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, em especial Mirian, Robson, Marli, Elaine e Marcelinho.

Aos funcionários da Pós-Graduação Valéria Zagato e Diogo Reatto,

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos profissionais do Centro de Especialidades Odontológicas, pelo incentivo, amizade e suporte em especial a Dra. Patrícia Macedo, Dra. Fabiana Hess e Dra. Alexandra Moreira da Cunha.

Aos amigos do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Estomatologia, Ortodontia, Prótese Dental, Periodontia e Clínica Integrada.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho. (Processo 2007/54851-0)

A todas as pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Ciesielski FIN. Microrganismos oportunistas e exógenos na microbiota bucal de pacientes oncológicos submetidos à radioterapia de cabeça e pescoço [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2010.

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de microrganismos exógenos e oportunistas (bactérias entéricas, pseudomonados, leveduras e *Helicobacter pylori*) na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de câncer de cabeça e pescoço. Cincoenta pacientes que iria receber radioterapia foram examinados antes, durante e 30 dias após radioterapia. Amostras de saliva, mucosa e biofilme foram coletadas e os microrganismos foram detectados por cultura e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram as leveduras mais prevalentes nos pacientes submetidos a radioterapia. Gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, e *Pseudomonas* forma as bactérias mais frequentemente cultivadas. As bactérias alvo foram cultivadas de 77.8% dos pacientes edêntulos e 46.9% dos pacientes dentados 30 dias após a radioterapia. Por PCR, estes microrganismos foram detectados em todos os pacientes edêntulos e 78.1% dos pacientes dentados. Bactérias não orais e espécies de *Cândida* foram mais prevalentes nestes pacientes. Modificações no meio ambiente oral devido a radioterapia parecem facilitar a colonização por estes microrganismos.

Palavras-chave: Radioterapia, Câncer, Câncer de Cabeça e Pescoço, Microbiologia, PCR.

Ciesielski FIN. Opportunistic microorganisms and exogenous in buccal microbiota of cancer patients undergoing radiotherapy for head and neck. [dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2010.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the occurrence of opportunistic and exogenous microorganisms (enteric bacteria, pseudomonads, yeasts and *Helicobacter pylori*) in the oral cavity of patients undergoing radiotherapy (RT) for treatment of head and neck cancer. Fifty patients receiving RT were examined before, during and 30 days after RT. Saliva, mucosa, and biofilm samples were collected and microorganisms were detected by culture and Polymerase Chain Reaction (PCR). *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* were the most prevalent yeasts in patients submitted to RT. Genera *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, and *Pseudomonas* were the most frequently cultivated bacteria. Targeted bacteria were cultivated from 77.8% edentulous and 46.9% dentate patients 30 days after RT. By PCR, these microorganisms were detected from all edentulous patients and from 78.1% of dentate patients. Non-oral bacteria and *Candida* species were prevalent in these patients. Modifications of the oral environment due to RT seem to facilitate the colonization of these microorganisms.

Keywords: Radiotherapy, Cancer, Head and Neck Neoplasms, Microbiology, PCR

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Características demográficas e características adicionais dos pacientes antes da radioterapia. Página 26

Tabela 2 – Bactérias alvo cultivadas dos pacientes antes e 30 dias após a Radioterapia. Página 29

Tabela 3 – Bactérias alvo e pseudomonados dos pacientes irradiados antes e 30 dias após radioterapia. Resultados obtidos por PCR. Página 30

Tabela 4 – Espécies de *Candida* na cavidade bucal antes e após radioterapia: ocorrência, contagem média e desvio padrão. Página 31

*Observação: Embora a norma da Revista Clinical Oral Investigation peça para se colocar as tabelas ao final do texto, nesta dissertação as tabelas estão colocadas logo após os resultados para facilitar a compreensão.

Lista de Abreviaturas

CCP = Câncer de Cabeça e Pescoço

RT = Radioterapia

cGy = centigrays

mL = mililitros

U = unidade

μ L = microlitro

PBS= Solução Tampão de Fosfato

g = gramas

EVA = etil violeta azida

$^{\circ}$ C = graus Celsius

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

nm = nanômetros

PCR = Reação em Cadeia da Polimerase

Mg^{+2} = magnésio

mM = milímetro

dNTP = desoxirribonucleotídeo trifosfatado

Taq = *Thermus aquaticus*

μ M = micrometro

ng =nanogramas

TBE = Tris/Borato/EDTA

UV = ultra violeta

p = valor p

Sumário

1 Introdução	12
2 Material e Método	15
2.1 Estudo da População e exames clínicos	15
2.2 Amostras clínicas e isolamento e identificação microbiana	17
2.3 Análise por PCR	19
2.4 Análises Estatísticas	20
3 Resultado	22
4 Discussão	33
Referências	40
Anexos	46

Introdução

1 Introdução

O tratamento do câncer de cabeça e pescoço (CCP) consiste em cirurgia, radioterapia (RT) ou uma combinação de ambos. A quimioterapia também tem sido utilizada para complementar o tratamento [1]. Entretanto, há evidências suficientes que mostram que o uso de radioterapia em tratamento de CCP é prejudicial devido a muitos efeitos colaterais incluindo: mucosite, disfunção de glândulas salivares, cáries de radiação e osteorradioneecrose [2, 3]. Estes complicam o uso contínuo e expandido da RT [2, 3].

Na maioria dos casos, a ocorrência e a severidade destas reações dependem da dose de radiação, o volume dos tecidos irradiados, esquema de fracionamento, o tipo de radiação ionizante, a localização da área irradiada, idade do paciente, condições sistêmicas, tratamentos concomitantes [2], higiene oral e consumo de tabaco e álcool [3].

Em pacientes submetidos a RT, a disfunção da glândula salivar leva à diminuição da produção de saliva, uma depuração reduzida de carboidratos e ácidos orgânicos, diminuição da capacidade tampão e remineralização dos dentes [4, 5], além de alterar a microbiota oral [6]. Por conseguinte, a colonização e infecção oral por *Candida* spp. [1], microrganismos entéricos e outras bactérias patogênicas pode ser comum [6]. No entanto, a composição da microbiota oral em pacientes submetidos à radioterapia com CCP permanece obscura.

Também não é claro o papel de microrganismos oportunistas na patogênese da mucosite oral e outros efeitos colaterais da radioterapia.

O envolvimento de microrganismos como fungos e espécies entéricas na patogênese da infecção oral em pacientes com deficiência imunológica grave tem sido amplamente discutido [2]. Esses microrganismos entéricos freqüentemente agem como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana que se espalham para outras populações microbianas [7].

O uso de nistatina suspensão para reduzir a candidose tornou-se uma prática comum em pacientes submetidos a RT em certos centros de radioterapia brasileira, porém esse protocolo é também muito dependente da adesão do paciente. Infelizmente, não há nenhuma evidência clínica ou microbiológica para demonstrar que este esquema terapêutico é eficaz em pacientes com baixo nível socioeconômico e má higiene oral.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de leveduras, pseudomonados, bactérias entéricas e *Helicobacter pylori* na microbiota bucal de pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a RT e usando suspensão de nistatina tópica diariamente.

Materials e Métodos

2 Materiais e Métodos

2.1 Estudo da população e Exames Clínicos

Um total de 50 pacientes (38 masculinos e 12 femininos), examinados no Centro de Radioterapia de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, com idades entre 16-80 anos (idade média de 59,5 anos), com diagnóstico histopatológico de doença maligna foram incluídos no estudo. Quarenta e quatro indivíduos apresentaram carcinoma de células escamosas, quatro pacientes abrigaram carcinoma de células acinares, um paciente apresentou carcinoma de células escamosas basais e uma paciente tinha neoplasia maligna indiferenciada.

Dados demográficos adicionais e características gerais dos pacientes estão apresentadas na Tabela 1. Os pacientes foram submetidos a RT para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço. Pacientes que apresentavam doença cardiovascular não controlada, doenças pulmonares, diabetes mellitus, doença renal ou hepática e doenças sistêmicas adicionais foram excluídos. Pacientes que necessitaram de profilaxia com antibióticos e/ou esteróides nos últimos 6 meses antes da radioterapia também foram excluídos. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento para serem incluídos neste estudo, que foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP (número 136/2007).

As avaliações clínicas incluíram profundidade de sondagem, recessão, sangramento à sondagem (sim / não), e determinação do índice de placa

(presença / ausência) [8]. A perda de inserção clínica foi calculada pela soma da profundidade de sondagem e medidas de recessão. Medições periodontais foram realizadas em seis sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual e disto-lingual) para todos os dentes. O índice gengival [8] foi avaliado para avaliar a gravidade da inflamação gengival. Pacientes com gengivite tiveram pelo menos dois sítios anatômicos com gengivite com base nos seguintes critérios: índice gengival > 0, profundidade de sondagem < 3 mm e perda de inserção = 0. Pacientes com periodontite crônica apresentaram pelo menos dois sítios periodontais com os seguintes critérios: índice gengival > 0, profundidade de sondagem ≥ 5 mm e perda de inserção ≥ 5 mm.

A equipe médica do Centro de Radioterapia forneceu dados sobre a saúde sistêmica e medicamentos utilizados pelos pacientes. Os pacientes foram orientados pela equipe médica do Centro de Radioterapia a procurar tratamento dentário do sistema local de saúde pública antes da RT. No entanto, apenas 34% dos doentes procuraram tratamento odontológico, que consistiu na eliminação de infecções, extrações dentárias, tratamento periodontal e procedimentos restauradores antes de serem submetidos a RT.

Dados de pacientes que não completaram a RT foram excluídos do estudo. A dose média recebida pelos pacientes variou 4320-7020 cGy (dose média de 6233 cGy ± 954,5 cGy) e a dose de fracionamento foi de 180 cGy. A radioterapia foi realizada com um acelerador linear. Todos os pacientes foram instruídos a usar 5 mL de uma suspensão oral contendo 100.000 U / mL de nistatina aquosa três vezes ao dia (Micostatin ®, Bristol-Myers Squibb, São

Paulo, Brasil), a fim de evitar a candidose oral durante a RT.

Os exames clínicos foram realizados com os pacientes antes do tratamento dentário e RT (fase 1), 15-22 dias após a primeira sessão da RT (fase 2), imediatamente após a conclusão da RT (estágio 3), e 30 dias após a RT (fase 4). Durante as visitas ao Centro de Radioterapia, a presença e severidade da mucosite em pacientes foram avaliadas de acordo com critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional do Câncer, como descrito anteriormente [9]. Xerostomia foi avaliada utilizando os critérios clínicos [10], descrita pelos pacientes em um questionário. Xerostomia leve foi confirmada em alguns pacientes que aparentemente não tinham conhecimento desta situação [11].

2.2 Amostras Clínicas, isolamento e identificação microbiana

Antes do exame clínico, a saliva em repouso total, a mucosa oral (incluindo o dorso da língua), biofilme supragengival e biofilme subgengival foram coletados de cada paciente para contagem das bactérias alvos e leveduras. A saliva foi coletada utilizando um método de drenagem. Os pacientes foram colocados em uma sala silenciosa e solicitados para não beberem, comerem ou limparem suas bocas por 1 hora antes da coleta de saliva. Eles ainda foram instruídos a não engolir a saliva durante o período de coleta. A mucosa oral foi coletada utilizando um swab estéril e transferido para uma solução constituída por 300 µL de PBS (solução tampão fosfato) e 300 µL de água ultra pura. Biofilme supragengival foi coletado por raspagem. Amostra subgengival dos três sítios periodontais mais doentes foram coletados com

cones de papel estéreis introduzidos na região apical da bolsa periodontal ou sulco gengival inflamado e permaneciam por 30 segundos. As pontas de papel foram transferidas para uma solução constituída por 300 µL de PBS e 300 µL de água ultra pura. Amostras clínicas foram processadas no prazo de 2 horas.

As amostras foram diluídas em água peptonada (0,1 mL de cada diluição foi transferida para ágar Sabouraud Dextrose com 100 µg / mL de cloranfenicol) e incubadas por 3-7 dias em temperatura ambiente para o isolamento de leveduras. Os espécimes foram também inoculados em água peptonada e caldo etil violeta azida (caldo de EVA, Difco) e incubadas 3-7 dias em temperatura ambiente. Posteriormente, do crescimento microbiano observado em água peptonada, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para ágar Eosina azul de metileno (agar SS), ágar MacConkey, ágar verde brilhante e Ágar Infusão Cérebro Coração suplementado com sangue desfibrinado de cavalo.

Dos tubos contendo caldo EVA, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para Agar bile esculina e incubadas em aerobiose por 48 horas a 37°C, a fim de isolar as bactérias entéricas e pseudomonados. A identificação das leveduras foi realizada por assimilação de carbono e nitrogênio, fermentação de carboidratos, formação de tubo germinativo (a 37°C e 39°C), a morfologia colonial em CHROMagar *Candida* (MastDiagnostica, Paris, França), e o crescimento a 37°C e 42°C. As espécies bacterianas foram identificadas usando os seguintes métodos: características coloniais, coloração de Gram, crescimento de 10% cloreto de sódio, a produção de gás da glicose, e testes bioquímicos utilizando a API-20E kit comercial (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França). Algumas bactérias isoladas foram identificadas utilizando o BBL

Crystal Enteric / não fermentadores sistema (BD Microbiology Systems, Baltimore, MD), seguindo as recomendações do fabricante.

2.3 Análise por PCR

O DNA de todas as amostras clínicas transportados em água ultra pura estéril foi extraído utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de DNA bacteriano foram determinados com um espectrofotômetro (Beckman Instruments, Richmond, Wash, E.U.A.) a A260 nm. Presença de *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* sp., *E. faecalis*, *E. faecium*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas* spp. e *P. aeruginosa* foi detectada por PCR, utilizando pares de primers específicos [12-16]. DNA de *P. aeruginosa* ATCC 10145, *P. putida* ATCC 49128, *E. coli* ATCC 35218 e ATCC 25922, *Acinetobacter haemolyticus* ATCC 19002, ATCC 35667 *E. faecium* e *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizado como controle positivo.

PCR foi realizada em volumes de 25 µL contendo tampão 1X PCR / Mg⁺² (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, E.U.A.), 0,2 mM de cada dNTP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, E.U.A.), 0,5 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,4 µM de cada par de primers (Invitrogen) e 10 ng de modelo. Amplificação foi realizada em um termociclador de DNA (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700, Norwalk, CT, E.U.A.) programada a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 30 segundos. Isto foi seguido por uma temperatura de anelamento específica para cada par de

primers variando entre 30 segundos e 1 minuto, e 72 °C por 6 minutos, para permitir a conclusão da ampliação do DNA. Produtos de amplificação foram comparados por eletroforese em uma solução de 1% em gel de agarose em tampão TBE 1X, corado com brometo de etídio (0,5 mg / mL). Estes foram fotografados em um transiluminador UV (Eastman Kodak Co., NY, E.U.A.).

2.4 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Incs v.13, Chicago, IL, E.U.A.). A frequência de detecção de microrganismos foi calculada para cada assunto. Diferenças significativas entre os doentes foram testados usando o teste de Mann-Whitney, qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Diferenças de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativas.

Resultados

3 Resultados

Dezoito pacientes (36%) eram desdentados e usavam prótese total e 32 pacientes (64%) tinham pelo menos seis dentes (média de $12,4 \pm 5,7$). Um exame periodontal completo foi realizado, sendo que 14 dos 32 pacientes dentados tinham periodontite e 18 apresentavam gengivite. Dez pacientes dentados usavam dentadura completa superior e prótese parcial inferior de extremos livres.

Antes do tratamento de radiação, os pacientes não tiveram nenhuma evidência clínica ou queixa da mucosite, dermatite, candidose, xerostomia, ou disgeusia. No entanto, logo após o término da radioterapia, estes efeitos secundários puderam ser observados em 90%, 86%, 54%, 94% e 88% dos pacientes, respectivamente. Esses percentuais foram reduzidos para 80%, 76%, 30%, 62% e 76%, 30 dias após a conclusão do tratamento.

Imediatamente após a RT, apenas cinco pacientes não apresentaram nenhum sinal clínico da mucosite, oito apresentaram mucosite nível I, nove apresentaram mucosite grau II, vinte e um apresentou mucosite grau III e sete indivíduos apresentaram ulcerações extensas (mucosite nível IV). A ocorrência de mucosite esteve associada com o desenvolvimento de xerostomia (qui-Quadrado, $p= 0.021$).

Em relação ao sexo, não houve correlação com a ocorrência de mucosite, dermatite (teste exato de Fisher, $p = 0.578$), disgeusia (teste exato de Fisher, $p = 1.0$) ou xerostomia (teste exato de Fisher, $p = 0.568$). A presença de próteses totais ou condição dental (ou seja, presença ou ausência de cárie

cavidades) não influenciou a ocorrência de mucosite (qui-quadrado, $p = 0.139$), dermatite (qui-quadrado, $p = 0.822$), disgeusia (qui-quadrado, $p = 0.792$) ou xerostomia (qui-quadrado, $p = 0.822$). A condição periodontal também não influenciou a ocorrência de mucosite (qui-quadrado, $p = 0.779$), dermatite (qui-quadrado, $p = 0.940$), xerostomia (qui-quadrado, $p = 0.382$), ou disgeusia (qui-quadrado, $p = 0.205$).

Inicialmente, antes da radioterapia, os microrganismos entéricos foram cultivados em amostras de mucosa oral de quatro pacientes edêntulos (22,2%) e de biofilme subgengival de três pacientes dentados (16,7%). Isolados foram identificados como *E. faecalis* em seis amostras de pacientes desdentados totais ou dentados, e *Citrobacter freundii* foi identificado em uma amostra de um paciente desdentado. Além disso, 30 dias após a RT, bactérias entéricas e pseudomonados foram cultivados em 77,8% dos pacientes desdentados totais e de 46,9% dos pacientes dentados. A identificação de bactérias cultivadas é apresentada na tabela 2, e os gêneros mais freqüentemente encontrados foram *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus* e *Pseudomonas*. Além disso, os pacientes desdentados apresentaram uma maior freqüência de colonização oral por microrganismos entéricos ($p = 0.038$) e a radioterapia foi associada com um aumento significativo da ocorrência destes microrganismos ($p < 0.001$). Isto foi confirmado por PCR (tabela 3). No que diz respeito aos pseudomonados, quando os dados obtidos a partir de culturas são considerados, a radioterapia parece aumentar a freqüência de colonização da cavidade oral por estes microrganismos. No entanto, quando os dados de PCR são considerados, esta já não é estatisticamente significativa.

Como evidenciado por PCR, antes da RT, bactérias específicas foram detectadas em 55,6% dos pacientes desdentados, e em 43,8% dos pacientes dentados, enquanto 30 dias após a RT, esses valores aumentaram para 100% e 78,3%, respectivamente. A ocorrência de microrganismos entéricos não foi associada com gengivite ou periodontite, mas eles foram observados em maior frequência entre os consumidores de tabaco ($p = 0.031$) e pacientes com nível III ou IV de mucosite ($p = 0.042$).

H. pylori mostrou associação com *Candida* sp. nas amostras de mucosa (teste de correlação de Spearman $P < 0.001$), sensação de queimação (Teste de Mann-Whitney, $P = 0.021$) e higiene precária (Teste de Mann-Whitney, $P = 0.033$). Além disso, através de ANOVA de medidas repetidas para dados categóricos, verificou-se aumento significativo da prevalência desse microrganismo com a radioterapia ($P = 0.009$).

Quinze pacientes (30%) foram colonizadas por *Candida* spp. inicialmente, aumentando para 78% na RT e 84% após RT. Este aumento não está diretamente relacionado ao estado dental ou periodontal (Tabela 4). Trinta dias após a conclusão da radioterapia, as leveduras foram recuperadas de todos os indivíduos desdentados e de 75% dos pacientes dentados. Os fungos isolados foram identificados como *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. A presença de *Candida albicans* concomitantemente com uma espécie não-albicans foi particularmente comum após a RT (Tabela 4).

A ocorrência de *Candida* spp. foi aumentada na RT (qui-quadrado, $P < 0.001$). No entanto, as populações destes fungos e da extensão do envolvimento

periodontal não foram estatisticamente relacionados à ocorrência e níveis de *Candida* spp. na cavidade oral.

Tabela 1. Características demográficas e adicionais dos pacientes antes da radioterapia

Característica	Pacientes	Pacientes
	Edentulos	Dentados
	N (%)	N (%)
Gênero		
Masculino (N= 38)	15 (30.0)	23 (46.0)
Feminino (N= 12)	3 (6.0)	9 (18.0)
Educação		
Analfabeto (N= 8)	3 (6.0)	5 (10.0)
Ensino Básico (N= 34)	12 (24.0)	22 (44.0)
Ensino Superior (N= 8.0)	3 (6.0)	5 (10.0)
História de consumo de tabaco		
Sim 1 (N= 45)	17 (34.0)	28 (56.0)
Historia de consumo de álcool		
Sim 2 (N= 37)	13 (26.0)	24 (48.0)
Raça ou afiliação étnica 3		
Branco (N= 26)	10 (20.0)	16 (32.0)
Negro (N= 8)	3 (6.0)	5 (10.0)
Asiático (N= 2)	0 (0.0)	2 (4.0)
Miscigenado (N= 14)	5 (10.0)	9 (18.0)
Tratamento dental prévio a RT		
Sim (N= 19)	5 (10.0)	14 (28.0)
Não (N= 31)	13 (26.0)	18 (36.0)

Tabela 1. Continuação

Característica	Pacientes	Pacientes
	Edêntulos	Dentados
	N (%)	N (%)
Outros tratamentos para câncer de cabeça e pescoço		
Cirurgia (N=20)	8 (16.0)	12 (24.0)
Quimioterapia (N= 3)	0 (0.0)	3 (6.0)
Cirurgia e Quimioterapia (N= 4)	1 (2.0)	3 (6.0)
Nenhum (N= 23)	9 (18.0)	14 (28.0)
Regiões Irradiadas		
Cervicofacial direita e esquerda, fossa supraclavicular (N=30)	11 (22.0)	19 (38.0)
Cervicofacial direita e esquerda (N= 7)	2 (4.0)	5 (10.0)
Cervical direita e esquerda (N= 5)	2 (4.0)	3 (6.0)
Cervicofacial esquerda e fossa supraclavicular (N=3)	0 (0.0)	3 (6.0)
Direita cervicofacial e fossa supraclavicular (N=2)	1 (2.0)	1 (2.0)
Orbital direita, facial direita, cervicofacial direita, fossa supraclavicular (N=1)	1 (2.0)	0 (0.0)
Facial direita, cervical direita, frontal (N=1)	0 (0.0)	1 (2.0)
Frontal, cervicofacial direita e esquerda, fossa supraclavicular (N=1)	1 (2.0)	0 (0.0)

Tabela I. Continuação

1 No mínimo 10 cigarros por dia nos últimos 5 anos.

2 No mínimo duas doses diárias de *cachaça*, uma bebida alcoólica destilada produzida a partir da fermentação do caldo de cana do Brasil, com teor alcoólico de 38-48% v / v. Somente seis desses pacientes não são auto-declarados alcoólatras.

3 No Brasil o padrão racial é auto declarado.

Tabela 2. Bactérias alvo cultivadas dos pacientes antes da RT e 30 dias após a RT. Resultados obtidos por cultura.

Microrganismo	1 Pacientes Edentulos	2 Pacientes Dentados
	N (%)	N (%)
Antes da RT		
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (5.6)	0 (0.0)
<i>Enterococcus faecalis</i>	3 (16.7)	3 (16.7)
Total	4 (22.2)	3 (16.7)
30 dias após RT		
<i>Citrobacter freundii</i>	2 (11.1)	5 (15.6)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3 (16.7)	4 (12.5)
<i>E. intermedius</i>	4 (22.2)	2 (6.3)
<i>E. sakazakii</i>	4 (22.2)	2(6.3)
<i>Enterococcus</i> sp.	2 (11.1)	0 (0.0)
<i>Enterococcus faecalis</i>	6 (33.3)	6 (18.7)
<i>Escherichia coli</i>	1 (5.6)	1 (3.1)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6 (33.3)	3 (9.4)
<i>Morganella morganii</i>	2 (11.1)	2(6.3)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1 (5.6)	1 (3.1)
<i>Proteus mirabilis</i>	3 (16.7)	3 (9.4)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1 (5.6)	0 (0.0)
<i>Pseudomonas</i> sp.	2 (11.1)	0 (0.0)
<i>P. aeruginosa</i>	4 (22.2)	2 (6.3)
Total *	14 (77.8)	15 (46.9)

Tabela 3. Bactérias alvo e pseudomonados dos pacientes irradiados antes e 30 dias após a RT. Resultados obtidos por PCR.

Microorganismo	1 Pacientes	2 Pacientes
	Edentulos	Dentados
	N (%)	N (%)
Antes RT		
<i>Enterococcus</i> sp.	5 (27.8)	6 (18.7)
<i>E. faecalis</i>	3 (16.7)	4 (12.5)
<i>E. faecium</i>	1 (5.6)	2 (6.3)
<i>Enterobacteriaceae</i>	5 (27.8)	7 (21.9)
<i>H. pylori</i>	4 (22.2)	11 (34.4)
<i>Pseudomonas</i> sp.	4 (22.2)	3 (9.4)
<i>P. aeruginosa</i>	2 (12.5)	1 (3.1)
Total*	10 (55.6)	14 (43.8)
30 dias após RT		
<i>Enterococcus</i> spp.	11 (61.1)	11 (34.4)
<i>E. faecalis</i>	8 (44.4)	11 (34.4)
<i>E. faecium</i>	2 (11.1)	2 (6.3)
<i>Enterobacteriaceae</i>	12 (66.7)	19 (59.4)
<i>H. pylori</i>	8 (44.4)	15 (46.9)
<i>Pseudomonas</i> sp.	5 (27.8)	5 (15.6)
<i>P. aeruginosa</i>	4 (22.2)	5 (15.6)
Total*	18 (100.0)	25 (78.1)

1 N=18; 2 N=32; * Alguns pacientes são colonizados por mais de uma única espécie de microrganismo entérico ou pseudomonado.

Tabela 4. Espécies de *Candida* na cavidade oral antes e após radioterapia: ocorrência, contagem média e desvio padrão.

Microrganismo	Início ¹ N (%)		IAR ² N (%)		30d RT ³ N (%)	
	EP ⁴	DP ⁵	EP	DP	EP	DP
<i>C. albicans</i>	9 (50.0)	6 (18.7)	18 (100)	21 (65.6)	18 (100)	20 (62.5)
<i>C. tropicalis</i>	1 (5.6)	1 (3.1)	5 (27.8)	1 (3.1)	5 (27.8)	4 (12.5)
<i>C. krusei</i>	1 (5.6)	2 (6.25)	2 (11.1)	2 (6.3)	4 (22.2)	2 (6.3)
<i>C. glabrata</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (11.1)	0 (0.0)	3 (16.7)	2 (6.3)
<i>C. parapsilosis</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.6)	0 (0.0)	3 (16.7)	1 (3.1)
Total	9 (50.0)	6 (18.8)	18 (100)	21 (65.6)	18 (100)	24 (75.0)
Média ± DP ⁶	305.83 ± 204.5	23 ±14.5	1117 ± 903.6	77.2 ± 52.3	6305.7 ± 2041.9	468 ± 209

1 Início: imediatamente antes da RT;

2 IAR: imediatamente após a conclusão da RT;

3 30 dias após a RT.

4 Pacientes Edentulos

5 Pacientes Dentados

6 Contagem Média UFC ± desvio padrão nas amostras positivas.

Discussão

4 Discussão

O risco de mucosite é uma grande preocupação para os pacientes que recebem RT para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço [1, 17]. Susceptibilidade a mucosite está relacionado com alterações quantitativas e qualitativas na saliva, microbiota oral e estado imunológico [4, 6]. Conseqüentemente, as medidas preventivas antes, durante e após a radioterapia são necessárias e devem incluir instruções sobre dieta, higiene bucal e uso de compostos químicos para impedir a acumulação microbiana do biofilme sobre superfícies dentárias, incluindo próteses totais ou parciais.

Foi difícil avaliar a influência da dose de radiação sobre a ocorrência e a severidade da mucosite, bem como outros efeitos colaterais da RT, porque a maioria dos pacientes recebeu 7020 cGy (66%). O número de pacientes que receberam 5.040 cGy (20%), 6660 cGy (10%) e 4320 cGy (4%) era demasiado pequeno para permitir conclusões estatisticamente confiáveis. No entanto, não houve correlação significativa entre o regime de RT, já descrito, e a incidência de mucosite, dermatite (teste exato de Fisher, $P = 0.398$), disgeusia (teste exato de Fisher, $P = 0.398$) ou xerostomia (teste exato de Fisher, $P = 0.091$). Também não havia uma correlação entre o nível de educação formal, o álcool e o consumo de tabaco e grau de efeitos colaterais oral da RT.

Alguns estudos [18-20] e os resultados deste estudo indicam que a radioterapia aumenta bactérias entéricas e *Candida* durante o período imediatamente após a RT. Vários fatores podem contribuir para a colonização oral por estas espécies microbianas, tais como a hipossalivação induzida pela radiação, tabagismo, alcoolismo e presença de prótese [21]. Como observado

na tabela 1, a grande maioria dos pacientes eram consumidores de tabaco e álcool, e apenas seis pacientes se consideraram dependentes do consumo de álcool em grandes quantidades. Embora não exista uma uniformidade sobre a influência do álcool sobre *H. pylori*, evidências indicam que bebidas alcoólicas podem facilitar a erradicação desse microrganismo em regimes de tratamento intensivo com antiácidos associados com antimicrobianos, sendo que Baena et al. [22] também responsabilizaram o etanol pela modificação na produção de muco protetor, aumentando-a. Além disso, um número significativo de pacientes tinha usado dentaduras completas por 5-10 anos em condições duvidosas de higiene e manutenção. Isto confirma a conhecida relação entre a higiene da prótese e presença de bactérias entéricas e leveduras [23]. Também, pacientes vivendo em situação sócio-econômica baixa e com estilo de vida não saudável estão mais predispostos a aquisição de infecções bacterianas, principalmente por *H.pylori* [24, 25].

Muitos fatores apóiam a colonização de microrganismos entéricos na cavidade bucal de pacientes irradiados, incluindo: má higiene bucal e corporal (que pode se apresentar na maioria dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço [26]), contato com água e alimentos contaminados por esgotos e supressão da microbiota oral por antibióticos de largo espectro. Na verdade, a grande maioria dos pacientes tinha condições de higiene muito pobres, especialmente os portadores de próteses totais e parciais. Estas condições de higiene, podem aparentemente, ter aumentado o desconforto produzido por xerostomia e mucosite e sensação de ardência.

A possibilidade de transmissão de cocos e bastonetes entéricos para a cavidade oral de pacientes submetidos a RT para o tratamento de câncer de

cabeça e pescoço por meio de água potável ou alimentos contaminados por esgotos é uma preocupação real. Dezesesseis por cento dos pacientes eram agricultores e tratamento de água para as pessoas que vivem nas áreas rurais do Brasil ainda é pobre, com iniciativas para o tratamento de esgotos domésticos nessas áreas praticamente inexistente. Além disso, embora o tratamento da água para consumo seja universal, outros 40% dos doentes vivia nos subúrbios, onde as fontes de água contaminada por esgotos domésticos são comuns e tratamento de esgoto é insuficiente.

Apesar da alta frequência de bactérias entéricas e outros microrganismos superinfectantes, o seu papel na patogênese da mucosite permanece obscuro. Bactérias gram-negativas podem intensificar o processo inflamatório, bem como exacerbar a formação de úlceras pela liberação de proteases e endotoxinas [7], que interagem com células do hospedeiro para induzir a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias [27]. Infecção com *H. pylori*, especialmente com cepas positivas para fator de virulência *cagA*, previsivelmente causam uma resposta inflamatória, que inclui indução a expressão de ciclooxigenase (COX-2) e a invasão do tecido local por neutrófilos e fagócitos, acompanhados pela produção de citocinas pró-inflamatórias [28]. Desta forma, microrganismos podem potencializar a depressão das respostas do hospedeiro e assim maximizar sua persistência [29].

Embora a colonização da cavidade oral por estes microrganismos oportunistas podem ser transitórios [6], os resultados desta investigação sugerem que estes microrganismos são susceptíveis a permanecer na cavidade oral por semanas ou mais após a RT. Como o número de espécies detectadas e sua prevalência aumentada durante e logo após a RT, não há

evidências para sugerir que a sua presença na cavidade bucal seja passageira ou será significativamente reduzida no período posterior ao indicado no presente estudo. Os resultados do estudo de Jia [28], mostram uma significativa correlação entre biofilme dental e infecção gástrica por *H. pylori* que foi consistente com a noção de que a cavidade bucal pode ser um reservatório para *H. pylori* e uma fonte potencial para reinfecção estomacal, mesmo para sujeitos submetidos de forma bem sucedida à erradicação sistêmica do *H. pylori* da mucosa gástrica. Este estudo também mostrou que *H. pylori* foi erradicado da mucosa gástrica dos pacientes com gastrite ou úlcera péptica após remoção e controle do biofilme dental; neste mesmo estudo a prevalência de reinfecção gástrica por *H. pylori* foi significativamente mais baixa do que no grupo sem controle do biofilme dental, entretanto, apesar da remoção e controle da placa dental a taxa de infecção de *H. pylori* gástrico foi de 19,64%, supondo-se que o *H. pylori* pode vir pela dieta, utensílios ou *H. pylori* residual na saliva.

Assim, a maior ocorrência de cocos e bastonetes entéricos na presente investigação pode ser associada ao fato de que nenhum estudo sobre os efeitos da RT em cavidade bucal parece ter sido realizado com uma população que apresenta tantos fatores predisponentes para a ocorrência de micoses e infecções oportunistas. Além disso, a xerostomia e mucosite podem interferir na ingestão alimentar e podem agravar a desnutrição crônica que é comum entre as populações mais pobres, incluindo os pacientes avaliados neste estudo. A desnutrição pode predispor o paciente a infecções oportunistas evidenciando uma das desigualdades sociais mais marcantes no mundo.

A combinação desses fatores na população pode explicar parcialmente a alta frequência de patógenos, em comparação com dados provenientes de outros países onde a desigualdade social não é tão pronunciada como é no Brasil (de acordo com Almstahl et al. [20], onde os pacientes não usavam próteses e receberam tratamento odontológico). Além disso, os resultados aqui apresentados se aplicam a um curto período de tempo, imediatamente antes, durante e depois do IR, e, portanto, estes efeitos podem representar a fase aguda da infecção ou colonização por leveduras e microrganismos entéricos. A incidência de infecções fúngicas tem sido relatado como sendo tão alta quanto 40% em pacientes com neoplasias [30], ou aqueles submetidos a RT como também observado no presente estudo. Estas infecções em pacientes com câncer avançado ou em pacientes irradiados comumente envolvem *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* [1, 30], *C. krusei* [31, 32], *C. glabrata* [32], *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* [30].

No presente estudo, a maioria dos pacientes eram adultos de meia idade do sexo masculino consumidores crônicos de tabaco e álcool e tinham avançado tumores malignos. É sabido que o tabaco, o uso de prótese e o álcool podem aumentar a colonização por patógenos oportunistas, principalmente os fungos [17, 33]. RT parece aumentar a frequência e a atividade de colonização oral por *Candida* spp., embora as diferenças entre colonizações leves e pesadas não teve influência direta sobre os sinais clínicos da mucosite.

Os resultados deste estudo confirmam o aumento do número de espécies não - *C. albicans* na microbiota de pacientes irradiados, mas este fenômeno não é à custa de uma redução da ocorrência de *C. albicans* na

população, como descrito na literatura [30, 32]. Em um estudo anterior [1], apesar de *C. albicans* ter sido a levedura mais freqüentemente detectada antes da radioterapia, esse microrganismo não era cultivado no final da RT. Isto pode ser devido ao uso extensivo de miconazol, nistatina e / ou cetoconazol no tratamento da candidose oral, como sugerido anteriormente [30]. Além disso, desde Jham et al. [1] saliva usada apenas para a detecção de leveduras, no presente inquérito, biofilme supragengival e subgengival foram coletados de modo a fornecer uma avaliação mais ampla da presença de espécies de *Candida* dentro do biofilme, onde a atividade de agentes antimicrobianos é reduzida.

O uso de nistatina tópica para reduzir candidose tornou-se uma prática comum em pacientes submetidos a RT em alguns centros brasileiros de radioterapia, mas este protocolo é também muito dependente da adesão do paciente. Embora candidose intra-oral e esofágica possam ser tratadas efetivamente com nistatina [34], a alta incidência de candidose e a freqüência de *Candida* relatada sugere que este agente antifúngico tópico não consegue evitar a colonização intra-oral ou disseminação de leveduras em pacientes submetidos a RT. A fim de reduzir populações de *Candida* spp., bem como a ocorrência de candidose, a administração oral de fluconazol também pode ser prescrita [34].

Referências

Referências

1. Jham BC, França EC, Oliveira RR, Santos VR, Kowalski LP, Freire ARS. *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:355-8.
2. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14:199-212.
3. Bonan PRF, Lopes MA, Pires FR, Almeida OP. Dental management of low socioeconomic level patients before radiotherapy of the head and neck with special emphasis on the prevention of osteoradionecrosis. *Braz Dent J* 2006;17:336-42.
4. Epstein JB, van der Meij EH, Lunn R, Stevenson-Moore P. Effects of compliance with fluoride gel application on caries and caries risk in patients after radiation therapy for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;82:268-75.
5. Shiboski CH, Hodgson TA, Ship JA, Schiodt M. Management of salivary hypofunction during and after radiotherapy *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:61-6.
6. Leung WK, Jin, LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral colonization of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and cocci in irradiated, dentate, xerostomic individuals. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:1-9.
7. Gonçalves MO, Coutinho-Filho WP, Pimenta FP, Pereira GA, Pereira JAA, Mattos-Guaraldi AL et al. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol* 2007;44:488-94.

8. Loe H. The gingival index, the plaque index and the retention index. *J Periodontol* 1967;38:610-6.
9. Trotti A. Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 2000;47:1-12.
10. Guggenheimer J, Moore PA. Xerostomia. Etiology, recognition and treatment. *J Am Dent Assoc* 2003;134:61-9.
11. Navazesh M. How can oral health care providers determine if patients have dry mouth? *J Am Dent Assoc* 2003;134:613-18.
12. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:1018-28.
13. Ke D, Picard FOJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M *et al.* Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 1999;37:3497-503.
14. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:289-95.
15. Cheng S, McCleskey FK, Gress MJ, Petroziello JM, Liu R, Namdari H *et al.* A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1248-50.
16. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2004;42:2074-9.

17. Ramirez-Amador V, Silverman S Jr, Mayer P, Tyler M, Quivey J. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84:149-53.
18. Samaranayake LP, Robertson AG, MacFarlane TW, Hunter IP, MacFarlane G, Soutar DS *et al.* The effect of chlorhexidine and benzydamine mouthwashes on mucositis induced by therapeutic irradiation. *Clin Radiol* 1988;39:291-4.
19. Abu-Shara KA, Ghareeb MA, Zaher S, Mobacher A, Khalifa MC, Saleh SZ. Radiotherapeutic effect on oropharyngeal flora in patients with head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 1993;107:222-7.
20. Almstahl A, Wikström M, Fagerberg-Mohlin B. Microflora in oral ecosystems in subjects with radiationinduced hyposalivation. *Oral Diseases* 2008;14: 541–9.
21. Epstein JB, Frelich MM, Le ND. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;76:169-74.
22. Baena JM, Lopez C, Hidalgo A, Rams F., J Sebastian J ; Garcia M. ; HernandezMaria R. Relation between alcohol consumption and the success of *Helicobacter pylori* eradication therapy using omeprazole, clarithromycin and amoxillin for 1 week. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14: 291–6.
23. Daniluk T, Fiedoruk K, Ściepuk M, Zaremba ML, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D *et al.* Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. *Adv Med Sci* 2006;51(Suppl. 1):86-90.

24. Murray LJ, Bamford KB, McCrum EE, Evans AE. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in 4742 randomly selected subjects from Northern Ireland. *Int J Epidemiol* 1997; 26:880-7.
25. Devrajani BR, Bajaj DR, Baloch GH, Devrajani T, Zulfiquar S, Shah ASZ and Bibi I. Frequency of *Helicobacter Pylori* Infection in Patients with Lichen Planus (A Hospital Based Cross Sectional Descriptive Study). *World J Med Sci* 2009; 4 (2): 74-78.
26. Hasturk H, Nunn M, Warbington M, Van Dyke TE. Efficacy of a fluoridated hydrogen peroxide-based mouthrinse for the treatment of gingivitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol* 2004;75:57-65.
27. Napeñas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK, Fox PC, Lockhart PB. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:48-59.
28. Jia CL, Jiang GS, Li CH, Li CR. Effect of Dental Plaque Control on Infection of *Helicobacter pylori* in Gastric Mucosa. *J. Periodontol* 2009; 80:1606-1609.
29. Cover, TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology*. 2009; 136:1863-1873.
30. Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17: 79-84.
31. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990's. *Eur J Clin Microbial Infect Dis* 1992;11:287-91.
32. Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW, *et al.* Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and

infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. J Clin Microbiol 1999;37:3896-900.

33. Mizugai H, Isogai E, Chiba I. Effect of denture wearing on occurrence of *Candida* species in the oral cavity. J Appl Res 2007;7:250-4.

34. Ilgenli T, Ören H, Uysal K. The acute effects of chemotherapy upon the oral cavity: Prevention and management. Turk J Cancer 2001;31:93-105.

Anexo

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JULIO DE MESQUITA FILHO
Rançuri de Aracatuba



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP-

FL.	81
PROJ.	111-01559
PLS	Bis

OF. 136/2007
CEP
SFC/D/bri

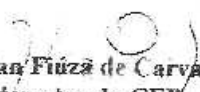
Aracatuba, 24 de outubro de 2007

Referência Processo FOA 2007-01559

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto "AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES SUBMETIDOS À RADIOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE LESÕES MALIGNAS DE CABECA E PESCOÇO" expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, deverá ser enviado o relatório parcial em 24/10/2008 e o relatório final em 24/10/2009.


Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ilmo Senhor
Dr. ELERSON GAETTI JARDIM JÚNIOR
Aracatuba-SP-

Ciente, De acordo,


Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior



Clinical Oral Investigations
Editor-in-Chief: Gottfried Schmalz
ISSN: 1432-6981 (print version)
ISSN: 1436-3771 (electronic version)
Journal no. 784
Springer
[Online version available](#)
[Online First articles available](#)

Title Page

The title page should include :

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations. Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.

Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

References

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. Doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.