

**UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE**

PAULA CRISTINA ANDRIONI

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE O
MICROBIOMA ORAL DE PACIENTES COM TUMOR DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Dissertação de Mestrado

Joaçaba

2019

Paula Cristina Andrioni

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE O
MICROBIOMA ORAL DE PACIENTES COM TUMOR DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biociências e Saúde - PPGBS, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biociências e Saúde, da Universidade do Oeste de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Glauber Wagner

Co-orientador: Prof. Dr. Antuani Rafael Baptistella

Joaçaba

2019

A573i

Andrioni, Paula Cristina.

Influência do tratamento quimioterápico sobre o microbioma oral de pacientes com tumor de cabeça e pescoço / Paula Cristina Andrioni. – 2019.

51 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Saúde)—Universidade do Oeste de Santa Catarina, 2019.

Bibliografia: f. 38-45.

1. Cabeça - Câncer. 2. Microbiota. 3. Quimioterapia – Efeito fisiológico. 4. Saliva – Análise. I. Título.

CDD 614

PAULA CRISTINA ANDRIONI

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO SOBRE O
MICROBIOMA ORAL DE PACIENTES COM TUMOR DE CABEÇA E
PESCOÇO**

Esta dissertação foi julgada e aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Saúde no Programa de Mestrado em Biociências e Saúde da Universidade do Oeste de Santa Catarina

Joaçaba, 26 de agosto de 2019.

Prof. Dr. Jovani Antônio Steffani
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Glauber Wagner
Orientador

Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi
UFSC
Examinador Externo

Prof. Dr. Jovani Antônio Steffani
UNOESC
Examinador Interno

Prof. Dr. Diego De Carvalho
UNOESC
Examinador Interno

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos Andrioni e Márcia Giacometi Andrioni, a minha avó Marlene de Giacometi, ao meu avô Alcidir de Giacometi (*In Memoriam*) e ao meu namorado Hyago Padilha, que sempre estiveram ao meu lado e com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer a Deus por todas as minhas conquistas e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais, que não mediram esforços em me ajudar durante a realização do mestrado.

Ao Professor Dr. Glauber Wagner meu Orientador, por compartilhar seus conhecimentos, pelo carinho, pela ajuda em meio a tantas dificuldades, possibilitando chegar ao final deste estudo. E por ter me proporcionado uma convivência maravilhosa e enriquecedora.

Ao Professor Dr. Antuani Baptistella meu Co-orientador, que compartilhou seus conhecimentos e sugestões e me ajudou desde o início desse projeto.

Ao Dr. Gabriel Manfro e aos Funcionários do Hospital Universitário Santa Terezinha (HUST) de Joaçaba, por ceder seus pacientes para realização das coletas ao longo desses dois anos. A todos os pacientes que permitiram a realização da coleta das amostras.

A Dra. Aline Fernandes Rodrigues Sereia, por me auxiliar durante o processo de sequenciamento das amostras. Aos Funcionários da Empresa Neoprospecta onde realizei o sequenciamento das amostras e me auxiliaram durante o projeto.

A Tatiany Soratto, do laboratório da UFSC, por auxiliar durante as análises de bioinformática.

Aos meus pais Márcia Giacometi Andrioni e Carlos Andrioni, e minha avó Marlene de Giacometi, agradeço pelo carinho, apoio, pelos incentivos e conselhos que me deram durante esses cinco anos e principalmente nessa reta final, vocês são os responsáveis por esse momento marcante na minha vida. Ao meu avô Alcidir de Giacometi (*In Memoriam*) que sempre me incentivou e nunca me permitiu desistir, agradeço por cada palavra de carinho e afeto, você sempre será meu exemplo de vida.

Ao meu namorado Hyago Padilha, por todo carinho, incentivo, pelas conversas, pelo apoio e pela disposição e preocupação em todos os momentos dessa caminhada, você parte desse momento especial em minha vida.

A todos que de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

“Você pode ser o quiser, desde que lute por isso”.

(Filme – Mãos Talentosas).

RESUMO

Distúrbios fisiológicos em pacientes submetidos a tratamentos quimioterápicos são bem conhecidos. Sabe-se também que a microbiota pode atuar como um importante fator na modulação do sistema imune de pacientes e podem ser utilizadas como marcadores para acompanhar o tratamento de certos tumores. A microbiota normalmente não estimula respostas imunes inflamatórias, mantendo assim um equilíbrio, mas, quando essa homeostasia é modificada o sistema imune gera respostas inflamatórias que podem promover o crescimento e o desenvolvimento tumoral. O presente trabalho buscou avaliar a alteração do perfil da microbiota oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP) frente ao tratamento quimioterápico utilizando 5-Fluororacil. Para tal, foi realizada a análise do microbioma salivar através do sequenciamento do marcador 16S rRNA utilizando plataforma Illumina. Foram geradas bibliotecas de 150pb com 100 mil leituras (*reads*) de cobertura *single-end*, para comparar a microbiota da saliva de 10 pacientes sem diagnóstico para CCP (controle) e 10 pacientes positivo para CCP, e caracterizar o efeito do tratamento quimioterápico (antimetabólitos) na alteração desta microbiota após 15, 30 e 45 dias do início do tratamento. A análise da composição microbiana foi realizada utilizando o programa Qiime2 e pacotes do R. Foram coletados metadados como consumo de bebida alcoólica e tabaco, peso, comorbidades, dosagem do tratamento, localização do tumor, estágio, tamanho do tumor, tipo de quimioterápico utilizado, se houve redução do tumor dos pacientes para avaliar a correlação destes fatores com alteração da microbiota. As análises dos metagenoma salivares destes pacientes permitiram concluir que os indivíduos submetidos ao tratamento quimioterápico (grupo quimioterapia) e os indivíduos do grupo controle não apresentaram diferenças significativas quando a diversidade e riqueza de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) entre elas e ao longo do tempo de estudo. Contudo, foi observado que o indivíduo Q4 apresentou uma diversidade distinta em relação aos demais pacientes. Também foi possível observar que o gênero *Streptococcus* é o mais abundante em ambos os grupos avaliados. Além disto, após a terceira coleta (final do tratamento quimioterápico) observamos um aumento de mais de três e oito vezes da abundância dos gêneros *Lautropia* e *Corynebacteriaceae*. Também foi observado que fatores como mucosite, consumo de cigarros e estadiamento dos tumores tiveram relação direta na abundância de

determinadas Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), conforme já descrito na literatura.

Palavras-Chave: Câncer. Microbiota. NGS. Quimioterapia.

ABSTRACT

Physiological disorders in patients undergoing chemotherapy treatments are well known. It is also known that microbiota can act as an important factor in modulating the immune system of patients and can be used as markers to accompany the treatment of certain tumors. The microbiota usually does not stimulate inflammatory immune responses, thus maintaining a balance, but when this homeostasis is modified the immune system generates inflammatory responses that can promote tumor growth and development. The present study aimed to evaluate the alteration of the oral microbiota profile in patients with head and neck cancer (CCP) facing chemotherapy treatment using 5-Fluororacil. For this, salivary microbiome analysis was performed by sequencing the 16S rRNA marker using Illumina platform. 150pb libraries with 100,000 single-end coverage reads were generated to compare the saliva microbiota of 10 patients without diagnosis for CCP (control) and 10 patients positive for CCP, and to characterize the effect of chemotherapy treatment (antimetabolites) in the alteration of this microbiota 15, 30 and 45 days after the beginning of the treatment. Microbial composition analysis was performed using Qiime2 program and R packages. Metadata were collected such as alcohol and tobacco consumption, weight, comorbidities, treatment dosage, tumor location, stage, tumor size, type of chemotherapy used, whether there was a tumor reduction in patients to evaluate the correlation of these factors with microbiota alteration. The analysis of salivary metagenomes of these patients showed that the individuals undergoing chemotherapy treatment (chemotherapy group) and the control group did not show significant differences when the diversity and richness of OTUs (Operational Taxonomic Units) between them and over time. study. However, it was observed that individual Q4 presented a distinct diversity in relation to the other patients. It was also observed that the genus *Streptococcus* is the most abundant in both groups evaluated. In addition, after the third collection (end of chemotherapy treatment) we observed an increase of more than three and eight times the abundance of the genera *Lautropia* and *Corynebacteriaceae*. It was also observed that factors such as mucositis, cigarette smoking and tumor staging were directly related to the abundance of certain Operating Taxonomic Units (OTUs), as described in the literature.

Keywords: Cancer. Microbiota. NGS. Chemotherapy.

Lista de figuras

Figura 1: Principais sítios de acometimento por neoplasia maligna de cabeça e pescoço.....	01
Figura 2: Diversidade do microbioma humano.....	05
Figura 3: Uso da Metagenômica.....	11
Figura 4: Curva de rarefação para cada amostra do Grupo Controle (GC) e por tempo de coleta.....	21
Figura 5: Curva de rarefação para cada amostra do Grupo Quimioterapia (GQ) e por tempo de coleta.....	21
Figura 6: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson no tempo T0 dos Grupos Controle e quimioterapia.....	22
Figura 7: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com o tempo de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupos Quimioterapia (GQ).....	22
Figura 8: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com cada paciente considerando todos os tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupos Quimioterapia (GQ).....	23
Figura 9: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com o tempo de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupos Controle (GC).....	23
Figura 10: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com cada paciente considerando todos os tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupos Controle (GC).....	23
Figura 11: Análise de PCA do índice da beta-diversidade da microbiota oral de cada indivíduo pertencentes aos Grupo Quimioterapia (GQ) e controle (GC) no tempo 0 (T0).....	24
Figura 12: Análise de PCA do índice da beta-diversidade (dissimilaridade Bray-curtis) da microbiota oral de cada indivíduo pertencentes aos Grupo Quimioterapia (GQ) nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3).....	25
Figura 13: Análise de PCA do índice da beta-diversidade (dissimilaridade Bray-curtis) da microbiota oral de cada indivíduo pertencentes aos Grupo Controle (GC) nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3).....	25
Figura 14: Abundância relativa a nível de gênero do Grupo Quimioterapia (GQ), tempo da coleta (T0, T1, T2 e T3) (colunas).....	26

Figura 15: Abundância relativa a nível de gênero do Grupo Controle (GC). Análise das comunidades bacterianas está apresentada para cada indivíduo (Q) (blocos) e por tempo da coleta (T0, T1, T2 e T3) (colunas).....	27
Figura 16: Variação da abundância de OTUs no tempo 0 (T0) entre os indivíduos dos Grupos Controle (GC) e Quimioterapia (GQ).....	28
Figura 17: Variação da abundância de OTUs no Grupo Controle Quimioterapia (GQ) após o ciclo de tratamento com o quimioterápico 5-fluorouracil.....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1: Períodos das coletas por grupo.....	15
Tabela 2: Dados sociodemográficos e clínicos dos indivíduos do Grupo Controle e do Grupo de pacientes submetidos a quimioterapia.....	20
Tabela 3: Correlação entre a abundância de presentes nas amostras do Grupo Quimioterapia (GQ) no tempo 0 (T0) e metadados avaliados pelo teste de Spearman.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.....	01
1.2 MICROBIOTA ORAL.....	04
1.3 MICROBIOTA E CÂNCER.....	07
1.4 QUIMIOTERÁPICOS E MICROBIOTA.....	08
1.5 METAGENÔMICA COMO ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO DA MICROBIOTA.....	10
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS E FORMAÇÃO DOS GRUPOS.....	15
3.2 COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA	16
3.3 SEQUENCIAMENTO DO MARCADOR RIBOSSOMAL 16S.....	16
3.4 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS OTUS.....	16
3.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	18
4 RESULTADOS.....	19
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÃO	36
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é uma designação utilizada para descrever os tumores malignos do trato aerodigestivo superior, que inclui a cavidade oral, faringe, laringe, seios maxilares, cavidade nasal, glândulas salivares e tireoide (Figura 1) (DOBROSSY, 2005).

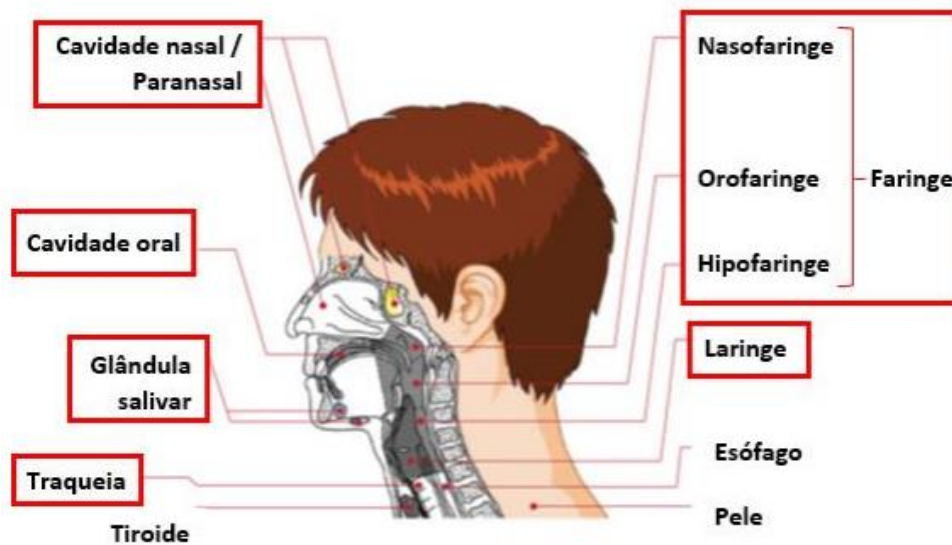


Figura 1 – Principais sítios de acometimento por neoplasia maligna de cabeça e pescoço. Adaptado de: STADLER et al., 2008.

Dentre os tipos histológicos de CCP o carcinoma espinocelular (CEC), também chamado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, representa cerca de 90% dos casos (GALBIATTI et al., 2013; HOFF et al., 2013). Considerando os principais fatores de risco, sabe-se que os estes tumores são mais frequentes entre homens, embora, nos últimos anos tem se observado um aumento em mulheres, possivelmente em razão da mudança de hábitos de consumo de tabaco e álcool, pois estes hábitos são os principais fatores de risco para tumores malignos de cabeça e pescoço (ZYGOGIANNI et al., 2011). Outros fatores como dieta (baixo consumo de fibras e vegetais), higiene bucal precária, radiação ultravioleta e exposições ocupacionais também foram identificados como de risco para a ocorrência desses tumores (SARTOR et al., 2007). Também à exposição ao

vírus do Papiloma Humano (HPV) e ao Vírus da Herpes Simples (HSV), têm sido associadas a estes tipos de tumores, onde na maioria das vezes apresentam crescimento local sem invasão profunda nos tecidos da cavidade bucal ou mandíbula (MAÑON et al., 2013).

A cavidade bucal compreende membranas mucosas da boca, ou seja, lábio, a base da língua, língua, gengiva, assoalho da boca e palato. A estimativa mundial de 2012 indicou a ocorrência de 300 mil casos novos de câncer em cavidade bucal e 145 mil óbitos por câncer de boca e lábio, sendo que cerca de 80% dos casos ocorreriam em países em desenvolvimento (BRASIL, 2014), com cerca de 11.280 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.010 em mulheres em 2014 (BRASIL, 2014; DOBROSSY, 2005).

Já na faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe) os dados epidemiológicos mais recentes demonstram que os principais fatores etiológicos importantes na ocorrência do câncer nessa localidade são, além dos expostos acima, fatores genéticos, exposição a poeiras, fumos, formaldeído e a contaminação pelo Vírus Epstein-Barr (EBV) (SALAMA; GILLISON; BRIZEL, 2013). Na orofaringe, as três principais regiões, envolvidas com o acometimento pelo câncer, são as tonsilas, base da língua e palato mole (SALAMA; GILLISON; BRIZEL, 2013). Tem se observado um aumento na incidência de câncer em amígdala e base da língua, entre a população jovem, relacionado a infecção pelo HPV (BRASIL, 2014). Com relação aos tumores malignos localizados na hipofaringe (laringofaringe), os seios piriformes, a região pós-cricóide e a parede posterior da faringe são as regiões mais afetadas (KRUSER et al., 2013). Pacientes que são acometidos por essa doença, apresentam comprometimento nas funções de fala ou deglutição. Para pacientes em estágio inicial da doença, a cirurgia, com preservação da voz, e a radioterapia isolada são opções de tratamento viáveis e aceitáveis. No entanto, quando o paciente inicia o tratamento já em estágio avançado da doença, há a necessidade de terapêutica combinada (KRUSER et al., 2013).

O câncer de laringe é um dos mais comuns, com incidência maior em homens com idade acima dos 40 anos, sendo novamente o tabaco e o álcool os seus principais fatores de risco, contudo exposição contínua a asbesto, pesticidas, tintas, poeira, gases de combustão de gasolina e diesel, também são reportados como agentes ocupacionais que podem aumentar o risco de câncer de laringe no indivíduo

exposto (SARTOR et al., 2007). No Brasil, foram estimados 6.870 novos casos de câncer de laringe em homens de 2014. (BRASIL, 2014). Considerando as regiões anatômicas da laringe, os tumores localizados na glote, podem invadir as áreas da supraglote e/ou subglote, possibilitando a disseminação linfática (MENDENHALL et al., 2013). Quando há invasão de subglote, de partes moles, e a destruição da cartilagem tireóide, o tratamento preferencial é a laringectomia total (HOFF et al., 2013). Contudo, vale destacar que o câncer de laringe apresenta alta possibilidade de cura (de 80% a 100%) quando diagnosticado precocemente (BRASIL, 2014).

Segundo Galbiati e colaboradores (2013), de maneira geral, o tratamento do CCP varia de acordo com o estágio em que ele se apresenta. Grande parte dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço são descobertos já em estágio avançado, o que diminui muito a sobrevida dos pacientes. Tumores diagnosticados em estágio iniciais são tratados com cirurgia ou radioterapia. Tumores em estágios avançados necessitam de tratamento multimodal, ou seja, a combinação de formas de tratamento associando a radioterapia a terapias antineoplásticas sistêmicas como a quimioterapia, antes ou após o período operatório. Nos casos de tumores avançados o tratamento unimodal não apresenta boa eficiência, podendo ocorrer recidivas e necessidade de tratamentos multimodais. Entretanto, esse tratamento multimodal envolvendo radioterapia e quimioterapia, costuma ocasionar grande toxicidade aos pacientes.

O tratamento tumoral é dependente principalmente do tamanho, da localização e da extensão do tumor, bem como da saúde geral do paciente (GIMENEZ et al., 2003), podendo envolver várias modalidades terapêuticas diferentes, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia. A associação de duas ou três modalidades, dependendo da localização do tumor, é frequentemente usada para a obtenção de melhor resultado e probabilidade de cura (HOFF et al., 2013). O tratamento cirúrgico do câncer pode ser aplicado com finalidade curativa ou paliativa. É considerado curativo quando feito nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos, e paliativo, com o objetivo de reduzir a população de células tumorais ou de controlar sintomas que põem em risco a vida do paciente ou comprometem a qualidade da sobrevida (GALBIATTI et al., 2013; BRASIL, 2014).

A quimioterapia é modalidade de tratamento que utiliza medicamentos específicos para destruição de células malignas, impedindo a formação de novo

DNA e bloqueando funções essenciais da célula ou induzindo a apoptose (INCA, 2014). A quimioterapia é classificada em três grandes áreas: neoadjuvante, terapêutica e adjuvante. A neoadjuvante caracteriza-se pelo uso da quimioterapia como tratamento inicial em pacientes que serão submetidos ao tratamento cirúrgico e/ou radioterápico, é utilizado quando há intenção de diminuir o tumor primário, para tornar factível a cirurgia ou possibilitar menor mutilação do órgão no processo cirúrgico (GIMENEZ et al., 2003).

A terapêutica é a primeira opção para o câncer avançado, para qual não existe tratamento alternativo, podendo ser curativo ou paliativo (GIMENEZ et al., 2003). A quimioterapia adjuvante associa tratamento sistêmico local, é utilizado após o tumor primário ter sido controlado por terapia cirúrgica ou radioterapia, essa forma de quimioterapia atua no combate a processos de metástase, permitindo que a droga exerça seu efeito. Contudo, o tratamento quimioterápico é agressivo, podendo afetar as funções biológicas do organismo, bem como a microbiota oral (MARQUES; BUZAID, 2006).

1.2 MICROBIOTA ORAL

A microbiota residente da cavidade bucal é diversa e consiste em uma ampla gama de vírus, micoplasmas, bactérias, fungos e até mesmo protozoários (MARSH; MARTIN'S., 2016). Os dentes, a gengiva, a língua, a garganta, e a mucosa bucal proporcionam diferentes superfícies para a colonização microbiana (LAMONT; JENKINSON, 2010). A produção de saliva, o consumo de açúcares e aminoácidos provenientes dos alimentos fornecem os nutrientes para o crescimento e desenvolvimento microbiano (JENKINSON; LAMONT, 2005).

Segundo Jenkinson e Lamont (2005), fatores ambientais da cavidade oral como: umidade, temperatura relativamente constante (34 °C a 36 °C), e pH próximo da neutralidade, permitem a formação de um microbiota com cerca de 700 grupos bacterianos, que habitam as diversas áreas da boca. A composição do microbiota oral varia de acordo com os hábitos alimentares, idade, função hormonal, fluxo salivar, condições imunológicas, higienização e o consumo de tabaco, álcool. A colonização da cavidade oral por micro-organismos inicia seis a dez horas após o nascimento, mais de 60% dos colonizadores primários no microbiota oral são:

Streptococcus (proveniente principalmente da mãe), *Actinomyces*, *Veillonella* e *Neisseria* (Figura 2).

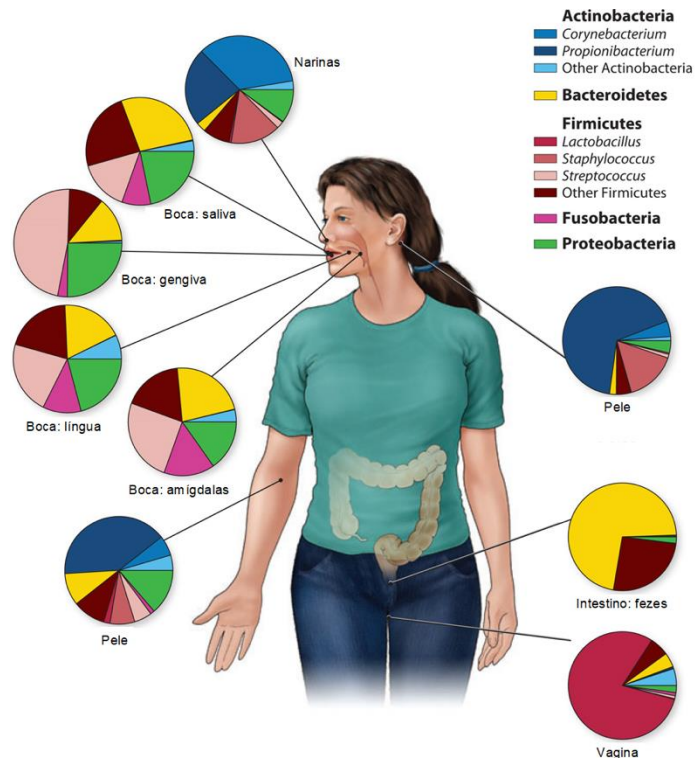


Figura 2 – Diversidade do microbioma nos diversos ambientes da anatomia humana. Adaptado de: *Human Microbiome Project (HMP/NIH)*.

A distribuição das bactérias na cavidade oral varia de acordo com o ambiente, as bactérias do grupo *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus* e *S. rattus*), *S. gordonii*, *Granulicatella adiacens*, *Abiotrophia defectiva* e *Streptococcus sanguis* encontram-se em grande quantidade nos dentes, já *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius* e *S. vestibularis*) encontram-se principalmente na língua. Espécies de *Actinomyces* se encontram particularmente em áreas próximo ao sulco gengival, podendo atuar como um patógeno oportunista causando uma condição inflamatória crônica. Enquanto que as espécies *S. mutans* e *S. sanguis* aparecem na cavidade oral somente após o nascimento dos dentes. Os micro-organismos que se encontram nas membranas e mucosas são *S. oralis* e *S. sanguis*. Enquanto que as espécies *Streptococcus costellatus* (subespécies *costellatus*, *viborgensis* e *pharyngis*), *S. intermedius* e *S. anginosus* (subespécies *anginosus* e *whileyi*) são encontradas em grande quantidade nos dentes e superfícies das mucosas, e são

importantes causas de doenças purulentas em seres humanos incluindo infecções maxilofaciais (AVILLA et al., 2009; CHARDIN et al., 2006; MARSH; MARTIN'S., 2016).

A língua é colonizada por uma grande diversidade de bactérias com predomínio de *S. salivares*, *S. mitis* e *Veillonella* spp (AVILLA et al., 2009; CHARDIN et al., 2006). Na sua maioria, estas bactérias são espécies comensais, ou seja, podem tornar-se patogênicas em respostas as mudanças do ambiente da cavidade oral, normalmente associada com a deficitária higiene oral do indivíduo. Por outro lado, muitas dessas espécies podem se associar a biofilmes que são resistentes ao tratamento de antibióticos (AVILLA et al., 2009; CHARDIN et al., 2006; ZAINAL-ABDIN et al., 2012).

Segundo Marsh e Martin's (2016), os fungos geralmente constituem uma porção relativamente pequena do microbiota bucal, as principais espécies de fungos encontradas na cavidade bucal são: *Aspergillus*, *Candida* spp, *Geotrichum* e *Mucor*. Os micro-organismos do domínio *Archaea*, são encontrados no biofilme dental, subgingival e nos canais radiculares, esses micro-organismos obtêm energia por meio da redução de CO₂ para metano, fazendo assim associações com patógenos periodontais.

Duas espécies de protozoários são frequentemente observadas na cavidade bucal, são elas: *Trichomonas tenax* e *Entamoeba gingivalis*, sua prevalência na cavidade bucal é variável, ambas espécies são anaeróbias estritas e embora sejam consideradas comensais inofensivos, há relatos de associação a doenças periodontais, onde tem sua incidência aumentada em indivíduos com higiene bucal deficiente (MARSH; MARTIN'S., 2016).

Além destes, a cavidade bucal é considerada um sítio de infecção de diversos vírus. O vírus mais frequentemente é o herpes simples tipo 1 (HSV-1), que quando reativado a partir da forma latente causa lesões secundárias infecciosas vesiculares nos tecidos orofaciais. Além deste, o papilomavírus humano (HPV) sendo os tipos 2 e 4 mais frequentes encontrados em lesões epiteliais, localizadas nos lábios e na boca, os tipos de HPV 2,4,6, 11 e 16 também são observados com uma frequência relativa em tecidos bucais de pacientes soropositivos para vírus da imunodeficiência humana (HIV). Um estudo recente têm explorado o possível papel do HPV no câncer

de boca, e tem se estabelecido que os tipos 16 e 18 são a causa de alguns casos de carcinoma orofaríngeo (MARSH; MARTIN'S., 2016).

1.3 MICROBIOTA E CÂNCER

A microbiota oral pode desempenhar um papel no desenvolvimento da carcinogênese. Estudos têm sido realizados e demonstram a associação entre o microbioma humano, a inflamação e o câncer, cada vez mais tem se demonstrado provas que comprovam essa relação (GALVÃO; DA CRUZ., 2016).

Torres e colaboradores (2015), demonstraram que indivíduos com doença periodontal tem maior probabilidade de desenvolver câncer, sendo que alguns fatores de risco estão associados, tais como: o consumo de tabaco e álcool, má higiene bucal, diabetes, índice de massa corporal elevado (IMC), dieta e imunodeficiência.

Estudos epidemiológicos demonstram que pacientes que apresentam carcinoma oral tem uma higiene oral deficitária, pois como o microbioma oral abriga bactérias patogênicas, como *Porphyromonas gingivalis*, este micro-organismo anaeróbio gram-negativo existe em grande número em doenças periodontais, este micro-organismo pode causar a inflamação, e muitas dessas inflamações podem causar doenças crônicas, podendo assim levar ao desenvolvimento de um cancro (MEURMAN, 2010; GAO et al., 2016).

Várias bactérias patogênicas podem desenvolver uma infecção ou promover o crescimento anormal de células pela evasão do sistema imune ou pelo desaparecimento da apoptose. Os patógenos celulares sobrevivem através da redução da capacidade do hospedeiro identifica-los como estranhos por meio de suas toxinas que podem alterar os ciclos celulares do hospedeiro e estimular a produção de substâncias inflamatórias ligadas aos danos do DNA (MAGER, et al., 2003).

Recentes pesquisas evidenciam que bactérias e leveduras podem promover a carcinogênese, por meios diretos ou indiretos. Os danos causados no DNA podem conduzir a perda de função ou expressão de genes supressores de tumor (HOOPER; WILSON; CREAN., 2009). Algumas bactérias encontradas na microbiota bucal, tal como a *P.gingivalis*, podem induzir expressão de COX-2 e

trazer um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, da mesma forma, as espécies de *Eikenella corrodens* são capazes de estimular células epiteliais humanas a produzir vários mediadores (YUMOTO et al., 2010), que podem, diretamente ou em conjunto com outros agentes cancerígenos, ativar proto-oncogenes específicos e, com isso, iniciar o desenvolvimento de uma lesão maligna pelo composto N-nitroso-benzilmetilamina (NBMA), capaz de induzir carcinoma de esôfago e da cavidade bucal (FONG et al., 1989).

Segundo Meurman (2018), a inflamação é a principal característica na maior parte das doenças crônicas, incluindo o câncer. As doenças malignas têm apresentado uma grande quantidade de citocinas e de fatores de crescimento que são liberados durante o processo inflamatório pelas células, podendo assim, influenciar na carcinogênese.

Portanto, há uma associação entre a precária higiene oral, e conseqüentemente a má saúde oral, promove a perda gradativa de dentes gerando assim um aumento no risco de câncer gastrointestinal, isto pode se desenvolver um carcinoma tanto na cavidade oral como no trato gastrointestinal (MEURMAN, 2010; GAO et al., 2016).

Segundo Galvão e Da Cruz (2016), outro estudo demonstrou que amostras de saliva com carcinoma no esôfago está altamente correlacionada com infecções na cavidade oral provocada por vários agentes patogênicos, incluindo *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus angino* e *Fusobacterium nucleatum*, foram os micro-organismos encontrados na cavidade oral e que estão associados ao câncer de colo e reto.

1.4 QUIMIOTERÁPICOS E MICROBIOTA

A mucosite é um dos efeitos colaterais mais debilitantes que o paciente submetido à quimioterapia pode desenvolver, é caracterizada pela inflamação e perda da barreira epitelial, provocando uma série de sinais e sintomas. Frequentemente é grave o suficiente para que o tratamento contra o câncer seja interrompido ou reduzido (GIBSON; KEEFE, 2006).

Segundo Rubenstein e Colaboradores (2004), a ocorrência da mucosite é de 80 a 100% dos pacientes submetidos a regimes denominados de alto risco, tais

como a radioterapia ou quimioterapia em pacientes com tumores na cabeça e pescoço. Além disso, agentes específicos de quimioterapia citotóxica, tais como 5-fluorouracil (5-FU), estão associados com mucosites mais graves.

Os entraves encontrados no uso dos diferentes quimioterápicos tem sido a toxicidade para os tecidos normais, o desenvolvimento de resistência celular aos agentes antineoplásicos e desequilíbrio da microbiota intestinal. Apesar de pouco se conhecer sobre o desequilíbrio da microbiota intestinal em pacientes com CCP, sabe-se que o desequilíbrio na microbiota gerado pela toxicidade do tratamento de tumores em geral, ocasionam mudanças na microbiota intestinal que resultam em ativação crônica do sistema imune e geração de um microambiente pró-inflamatório que pode favorecer o desenvolvimento e progressão de lesões neoplásicas no intestino (GABRILOVICH; NAGARA, 2009).

O papel da microbiota sobre a tumorigênese, têm sido estabelecido através da relação entre inflamação e carcinogênese, porém ainda não há total esclarecimento da contribuição dos mecanismos imunológicos e inflamação neste processo de malignização. Acredita-se que as células imunológicas, citocinas e outros mediadores do sistema imune além da disbiose, têm importante papel em praticamente todas as etapas da tumorigênese (CANDELA et al., 2014).

O que se conhece é que a microbiota intestinal normalmente não estimula respostas imunes inflamatórias, mantendo assim um equilíbrio intestinal, no entanto quando essa homeostasia é alterada o sistema imune desencadeia respostas inflamatórias que podem promover o crescimento e o desenvolvimento tumoral (GAGLIANI et al., 2014). As bactérias presentes no intestino interferem no desenvolvimento de tumores através de várias vias de sinalizações, sendo algumas, desencadeadas pela secreção de moléculas derivadas das próprias bactérias. Os mecanismos pelos quais as bactérias promovem tumorigênese podem ser diretos ou indiretos (SOBHANI et al., 2011)

Como as drogas utilizadas na quimioterapia têm ação tanto em células cancerosas, como também em células normais, há possibilidade dos efeitos terapêuticos e tóxicos dos quimioterápicos sobre a microbiota intestinal é dependente do tempo de exposição e que os diferentes tratamentos levam a mudanças complexas na microbiota intestinal destes indivíduos, os tornando mais

susceptíveis a infecções secundárias e no processo de recuperação nutricional dos indivíduos (GAGLIANI et al., 2014).

1.5 METAGENÔMICA COMO ESTRATÉGIA PARA O ESTUDO DA MICROBIOTA

Desde a década de 1970, os estudos de genoma vêm passando por diversos avanços. Um dos pontos limitantes da microbiologia clássica é o isolamento dos micro-organismos, uma vez que não se conhece um meio de cultura universal contendo fatores requeridos pela maioria dos micro-organismo existentes no ambiente (HANDELSMAN. 2004). Além disso, a microbiologia clássica consegue isolar em placas apenas 1% do total de micro-organismos presentes na amostra. Com isso, o estudo da biodiversidade de bactérias em um determinado ambiente torna-se impossível de obter (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

Atualmente, uma estratégia mais robusta para estudo de micro-organismos é a metagenômica, onde pode-se analisar amostras de diversos ambientes sem a necessidade de cultivo. Esta abordagem realizada por meio de tecnologias de sequenciamento de alto desempenho ou sequenciamento de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), pois permite gerar uma grande quantidade de dados genômicos dos diferentes micro-organismos presentes em uma mesma amostra biológica e posteriormente identificar as espécies presentes por meio de análises computacionais (Figura 3) (NESME et al., 2016; SIMON; DANIEL, 2011). Atualmente isto é possível em função da redução dos custos de sequenciamento, na qual aumentou consideravelmente o número de conjuntos de dados nos últimos anos. No futuro, a metagenômica será usada como ferramenta padrão para muitos laboratórios e cientistas que trabalham no campo de ecologia microbiana (TORSTEN et al., 2012).

A metagenômica permite além de identificar os micro-organismos presentes na amostra, realizar a análise da composição funcional das comunidades microbianas, provendo assim, uma descrição muito mais ampla a respeito do metabolismo presente naquela amostra, bem como o papel desta comunidade no estabelecimento de doenças (WANG et al., 2018). Além disto é possível utilizar abordagens metatranscriptômicas ou metaproteômicas para compreender melhor a

atividade microbiana em uma amostra biológica (WILMES; BOND, 2009.; GILBERT et al., 2010).

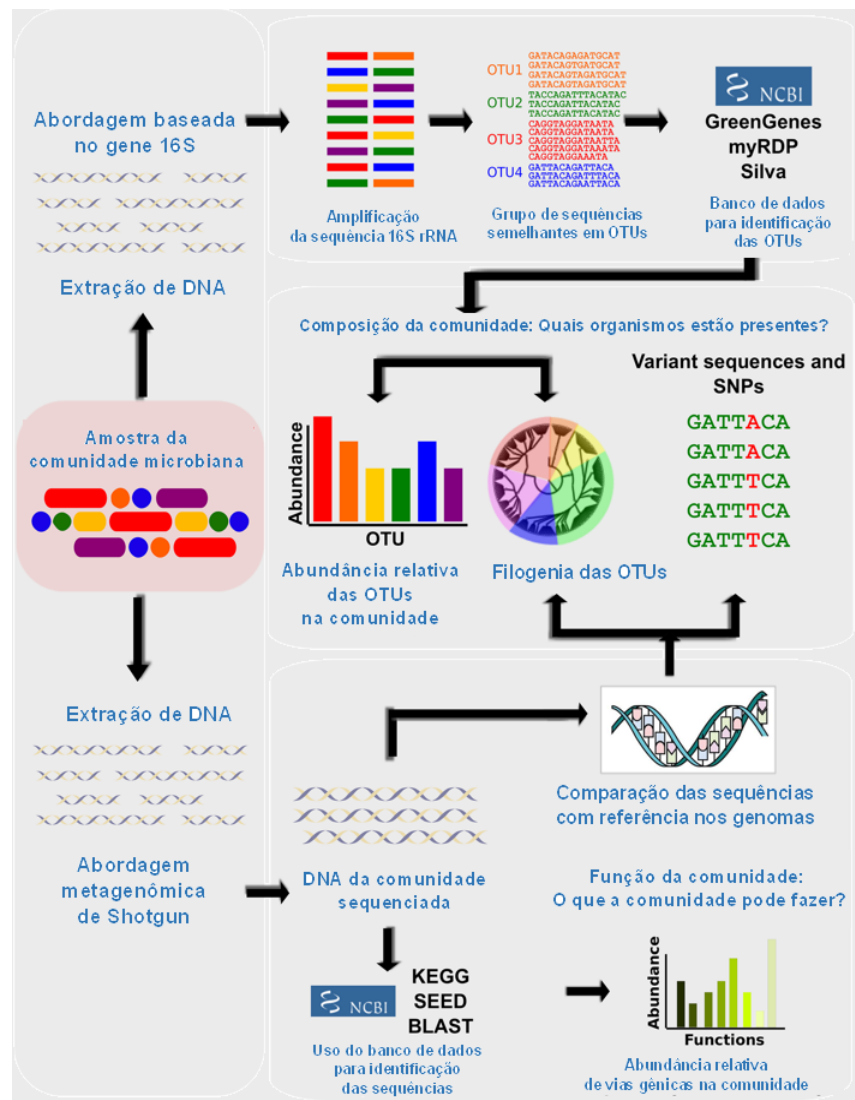


Figura 3 – Uso da Metagenômica: extração de DNA, sequenciamento da região de interesse região V3-V4 do gene 16S rRNA, realização da biblioteca de amostras, PCR em triplicata, sequenciamento e identificação das OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), Análise da composição da comunidade através da abundância relativa das OTUs, comparação e identificação das sequencias, análise da abundância da comunidade. Adaptado de: Morgan; Huttenhower (2012).

Segundo Peixoto (2013), nos métodos atuais de sequenciamento, existe uma limitação física que impede que sejam sequenciadas cadeias de nucleotídeos maiores que 1000 bases, devido a essa limitação, a cadeia de nucleotídeos é primeiro fragmentada e depois remontada para se obter a sequência original. Existem dois métodos principais para fragmentar o DNA: *Shotgun* e Digestão. O método de *Shotgun* consiste em submeter o DNA a altas taxas de vibrações,

fazendo com que a cadeia de nucleotídeos se quebre em vários pontos aleatórios. O método de Digestão utiliza enzimas especiais, chamadas de enzimas de restrição, que cortam o DNA em regiões específicas, conhecidas como sítios de restrição.

Para descrever e comparar as comunidades de uma maneira melhor, existem Alfa (α) e Beta (β) diversidade (KREBS, 1994). Através da diversidade Alfa, é possível analisar o acúmulo de espécies ou parcelas operacionais de unidades taxonômicas (OTUs). A Alfa diversidade tem sido usada para avaliar a eficiência da amostra e corrigir problemas de amostragem (SANDERS, 1968.; HECK et al., 1975 ; COLWELL; CODDINGTON, 1994).

Segundo Chao e colaboradores (1997) a diversidade Beta analisa a riqueza de espécies ou perfis de OTUs que podem ser contrastadas entre as amostras com base na comparação de suas diversidades, assim, há dois tipos de índices de diversidade beta, o de incidência e o de abundância. O índice de incidência utiliza os métodos de Jaccard e Sorensen, que tratam as espécies comuns e raras igualmente e apenas comparam o número de taxa compartilhados e únicos entre as amostras. Já o de abundância, contempla a semelhança pela quantidade, tratando os indivíduos e não as espécies igualmente.

O uso de índices de diversidade é a melhor abordagem para quantificar e comparar a diversidade microbiana entre amostras (BONILLA-ROSSO et al., 2012). Quanto maior o conjunto de dados gerado, maiores recursos computacionais e análises mais complexas de bioinformática são necessárias. Além disso, é necessário um grande armazenamento de dados para arquivar e processar os dados (LOGARES et al., 2012).

A microbiota oral tem sido amplamente estudada com o objetivo de compreender a interação com o corpo humano e a associação ao desenvolvimento do câncer (HANNIGAN; GRICE., 2018). A cavidade oral humana é o hábitat de centenas de espécies bacterianas, sendo algumas delas a causa de doenças orais, como cáries dentárias, doenças periodontais e o desenvolvimento de tumores (MARSH, 2010). Segundo o estudo metagenômico oral de Mager e colaboradores (2003), sugeriu-se que os micro-organismos podem ser utilizados como marcadores de diagnóstico para os cânceres orais. As espécies *Prevotella melaninogenica*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Streptococcus sp.* e *Firmicutes sp.*

podem estar relacionados com o desenvolvimento de Carcinoma de Células Escamosas Bucais (OSCC).

Desta forma este trabalho realizou uma análise da microbiota oral de pacientes com tumor de cabeça e pescoço (CCP) na região meio oeste de Santa Catarina com o foco em observar a influência do tratamento quimioterápico de forma aguda sobre a microbiota oral destes pacientes, buscando observar bactérias que possam servir como biomonitores do acompanhamento do tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do tratamento quimioterápico com 5-Fluorouracil sobre a microbiota oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sequenciar o marcador 16S rRNA da microbiota oral dos pacientes com CCP e ao longo do tratamento quimioterápico, bem como de indivíduos saudáveis durante 45 dias;
- Verificar a diferença entre a composição microbiana de indivíduos com câncer de cabeça e pescoço (CCP) e indivíduos sem diagnóstico para CCP;
- Avaliar a possível relação entre o uso do quimioterápico 5-Fluorouracil sobre a composição da microbiota oral nos pacientes submetidos ao tratamento;
- Correlacionar a variação na abundância de OTUs ao longo do tratamento quimioterápico e entre os grupos pesquisados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Para este estudo, foram convidados a participar indivíduos do sexo feminino e masculino, acima de 18 anos de idade, com diagnóstico de câncer de células escamosas localizadas na orofaringe em estágio I, II e III, que foram submetidos a quimioterapia com 5-FU (5-Fluorouracil) no setor de Oncologia do Hospital Universitário Santa Terezinha ao longo de um único ciclo de tratamento, que compuseram o Grupo Quimioterapia (GQ). Como critérios de exclusão: pacientes que realizaram cirurgia de grande porte no ano anterior, implante odontológico no último ano, que fizeram uso de anti-inflamatório nas últimas 48 horas, diagnosticados com doença infectocontagiosa com sintomas (febre, sudorese, coriza), e que tenham utilizados antibióticos no período de 30 dias antes da primeira coleta.

Bem como foram selecionados indivíduos sem CCP e com os mesmos critérios de exclusão do Grupo Quimioterapia (CG) para comporem o Grupo Controle (GC). Com isso, foram selecionados 10 indivíduos para cada um dos grupos e coletadas quatro (4) amostras de acordo com a tabela 1. Também foram registrados metadados como idade, sexo, peso, se consomem bebida alcoólica e tabaco, infecções ou outras comorbidades (em cada tempo de coleta), infecções ou outras comorbidades que vieram a afetar o indivíduo ao longo do período, além do uso de antibiótico durante o tratamento e dose do quimioterápico 5-FU utilizado classe.

Tabela 1: Períodos das coletas por grupo.

	Período (Dia)			
	Pré-tratamento	0	1	2
Grupo C	Primeira coleta	3-5 dias após a primeira coleta	7-10 dias após a segunda coleta	15-20 dias após a terceira coleta
Grupo Q	Um dia antes do início da quimioterapia	3-5 dias após o início do tratamento	7-10 dias após o tratamento	15-20 dias após finalizar o primeiro ciclo de tratamento - 21 dias

3.2 COLETA E EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras de saliva dos pacientes foram coletadas por meio de *swab* e armazenadas em frascos estéreis com uma solução específica para armazenamento. As amostras coletadas foram submetidas diretamente à extração de DNA utilizando o kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total obtido foi então armazenado a -20°C para as análises moleculares futuras.

3.3 SEQUENCIAMENTO DO MARCADOR RIBOSSOMAL 16S

O sequenciamento foi realizado na empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Brasil). As bactérias presentes nas amostras foram identificadas com base no sequenciamento de DNA das regiões V3-V4 do gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA) conforme descrito por CHRISTOFF et al. (2017). Brevemente, foram geradas bibliotecas das amostras através da amplificação da região de interesse por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os iniciadores específicos 341F 5'-CCT ACG GGR SGC AGC AG-3' (WANG; QIAN, 2009) e 806R 5'-GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT-3' (CAPORASO et al. 2012).

As reações de PCR foram realizadas com Master Mix e a enzima Taq Platinum (Invitrogen, USA), em triplicata técnica nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 25 ciclos de 95°C por 45s, 55°C por 30s e 72°C por 45s, com extensão final de 72°C por 2 min. A reação final de PCR foi purificada utilizando-se um protocolo baseado em *beads* magnéticas (AMPureXP, Beckman Coulter, USA). A quantificação das bibliotecas foi realizada por qPCR (CHRISTOFF et al., 2017) e o mesma quantidade de amostra foi amplicons de cada amostra foram utilizados para a confecção das bibliotecas de sequenciamento. Reads *single-end* foram obtidos utilizando equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2-300 (Illumina Inc., USA) de acordo com as especificações do fabricante.

3.4 IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS OTUs

Para a identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) as sequências obtidas (*reads*) foram avaliados quanto a sua qualidade utilizando o *software* FastQC (versão 0.11.5). As sequências de baixa qualidade bem como os adaptadores foram removidos utilizando o programa Trimmomatic. As sequências com qualidade desejável (*phred* > 25) foram submetidas a uma abordagem *Denoising* para remoção de sequências de baixa qualidade, correção de erros do sequenciamento, remoção de quimeras e identificação das Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs, do inglês *Operational Taxonomic Unit*), utilizando a abordagem do *DADA2*, com os parâmetros --p-trim-left 20 e --p-trunc-len 260. E a taxonomia foi atribuída utilizando o banco de dados SILVA versão 132, com correspondência de 97%, utilizando o *software* Qiime 2 versão 2019.1 (BOLYEN et al., 2018).

Os gráficos de abundância relativa, análises de alfa rarefação, alfa e beta diversidade foram realizadas utilizando programa R, versão 3.6 (<https://www.R-project.org/>). O índice de alfa rarefação foi previsto utilizando os pacotes *plyr* (v. 1.8.4) e *reshape2* (v. 1.4.3). Os índices de diversidade alfa (Chao-1, Shannon e Simpson) foram calculados utilizando o pacote *phyloseq* (v. 1.14.0) (MCMURDIE et al., 2013). A diversidade beta foi estimada após a normalização do número de sequências, através da escolha randômica de sequências nas amostras de modo que cada amostra obtivesse o mesmo número de sequências. Após a normalização, foi realizado uma análise de coordenadas principais (PCoA) utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, com o pacote *vegan* (v. 2.4.1).

As análises estatísticas também foram realizadas utilizando o R e para testar a significância estatística da diversidade alfa entre os diferentes grupos (tratamentos e coletas), primeiramente foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk, para os dados que apresentaram distribuição normal foi aplicado o teste t de student e para os que não apresentaram distribuição normal aplicamos o teste não-paramétrico de Kruskal–Wallis. Para analisar a significância estatística da diversidade beta foi aplicado o teste de Adonis com 999 permutações. Para identificar as OTUs que são diferencialmente abundantes entre os grupos foi aplicado um teste de análise diferencial baseado na distribuição binomial negativa realizado utilizando o pacote *DESeq2* (LOVE et al., 2014) do R. OTUs com um valor de *p* inferior a 0,05 de acordo com o teste de significância binomial de Wald com correção de Benjamini-Hochberg foram considerados estatisticamente diferentes.

3.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Unoesc/HUST (CEP) EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS SALIVARES EM PACIENTES COM CÂNCER DE OROFARINGE” (CAAE: 75132117.9.0000.5367) (Anexo A). Cabe ressaltar que este estudo foi realizado de acordo com a Resolução CNS 466/12 que envolve pesquisas com seres humanos, seguindo os princípios da autonomia, não maleficência, beneficência e justiça. Para tal, os participantes que atenderam os critérios de inclusão na pesquisa foram devidamente informados quanto aos objetivos do trabalho, a forma de coleta do material e a relevância, então os indivíduos que optaram por participar foram solicitados a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado no projeto supracitado. Salienta-se que os dados obtidos durante a pesquisa foram utilizados apenas para os objetivos desta, mantendo-se o anonimato dos sujeitos da pesquisa.

4 RESULTADOS

Foram realizadas coletas de saliva de 20 indivíduos, destes, 10 não possuem histórico de câncer (Grupo Controle) e 10 indivíduos com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço que foram submetidos ao tratamento quimioterápico (Grupo Quimioterapia). As amostras foram coletadas entre janeiro de 2018 e janeiro de 2019, na qual 16 indivíduos eram homens e 4 mulheres. A idade média, no grupo controle, foi de 56,5 (\pm 18,7) anos, enquanto que, no grupo quimioterapia, a média foi de 59 (\pm 11,5) anos. O consumo de tabaco e bebida alcóolica no grupo controle foi de 40%, e o grupo submetido a quimioterapia apresentou 60% de consumo, conforme representado na Tabela 2.

Foram gerados aproximadamente 7 milhões de sequências com uma média de 95.497,29 \pm 33.148,02 por amostra. Após o processamento de remoção de sequências de baixa qualidade (filtradas), a correção de erros do sequenciamento (*denoised*) e a remoção de quimeras (não-quiméricas) restaram 7.639.783 sequências, correspondendo a 95% do total de sequencias iniciais (Anexo B).

As 7.639.783 sequências foram classificadas em 4.742 unidades taxonômicas operacionais (OTUs). Na análise de Alfa Rarefação (Figuras 4 e 5) é possível observar que a partir de uma cobertura de aproximadamente 5.000 mil sequências as curvas atingem um platô para todas as amostras. Estas curvas permitem avaliar a profundidade da amostragem realizada, quando há uma estabilização da curva (platô), indica que a amostragem e o sequenciamento foram suficientes para representar as principais OTUs do microbioma oral dos pacientes controle e submetidos a quimioterapia.

Tabela 2: Dados sociodemográficos e clínicos dos indivíduos do Grupo Controle e do Grupo de pacientes submetidos a quimioterapia.

	Controle (n=10)	Quimioterapia (n=10)	p - value
Média de Idade ¹ (anos)	56,5	59	0,8266
Média do Peso ¹	78,36 kg	62,25 kg	0.061
Sexo ²			
Feminino	3	1	0.0007
Masculino	7	9	
Consumo de bebida alcóolica ²			
Sim	4	6	0.0071*
Não	6	4	
Fumante ²			
Sim	4	6	0.0071*
Não	6	4	
Mucosite			
Presença	0	2	NC
Ausência	10	8	
Estadiamento			
II		8	NC
III		2	
Melhora clínica			
Sim		6	NC
Não		4	
Localização do tumor			
Laringe		1	NC
Epidermóide		1	
Pescoço		3	
Orofaringe		3	
Assoalho da boca		1	
Tireóide		1	
Média da dosagem do 5-FU (mg)		1800 (±1076)	
Óbitos	0	4	NC

1 - *Test t*,

2 - *Fisher's test* (qui-quadrado);

* Diferença estatística entre os grupos;

NC: estatística não calculada.

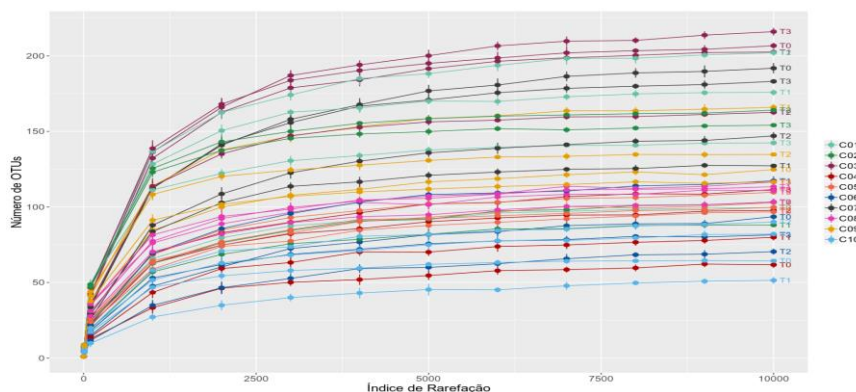


Figura 4: Curva de rarefação para cada amostra do Grupo Controle (GC) e por tempo de coleta. No eixo da abcissa está representado o número de sequências e no eixo da ordenada indica o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) observadas.

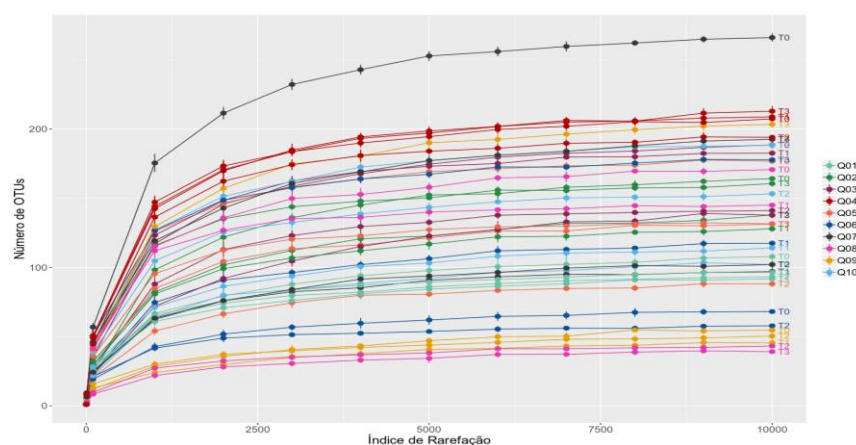


Figura 5: Curva de rarefação para cada amostra do Grupo Quimioterapia (GQ) e por tempo de coleta. No eixo da abcissa está representado o número de sequências e no eixo da ordenada indica o número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) observadas.

Para avaliar a riqueza, uniformidade e abundância de espécies nas em cada amostra, foram utilizados os índices de Chao-1, Shannon e Simpson. Chao-1 é um estimador de riqueza não paramétrico que tem como base a abundância de OTUs únicas (*singletons*) e raras (*doubletons*) para estimar a diversidade de uma população de tamanho desconhecido. O índice de Shannon é utilizado em situações que uma comunidade inteira não pode ser inventariada e seu cálculo é baseado na apresentação de abundâncias diferentes. Já o índice de Simpson mostra a concentração de dominância, este índice exprime a abundância das espécies mais comuns (RODRIGUES, 2011).

Nas figuras 6 a 10, estão apresentados a Diversidade Alfa com os índices Chao-1, Shannon e Simpson, respectivamente. Primeiramente, foi testado a alfa

diversidade na primeira coleta (T0) entre os grupos controle e antes do tratamento com quimioterapia, e não diferiram significativamente entre si para nenhum dos índices (Chao-1 $p = 0,1663$, Shannon $p = 0,6113$ e Simpson $p = 0,8798$) (Figura 6). Além disso sobre a alfa diversidade no grupo tratado com quimioterapia, comparamos cada coleta (T1, T2 e T3) com a que antecede a quimioterapia (T0), e também não houve diferença estatística entre as coletas (figura 7), no grupo de paciente submetidos a quimioterapia houve uma diferença estatística entre os pacientes o que indica a figura 8, apresentando uma diferença significativa no paciente Q4. Para o grupo controle não houve diferença estatística entre as coletas (figura 9). Já entre os pacientes controle houve uma diferença significativa entres os pacientes C2, C5, C8 e C9 conforme mostrado na figura 10.

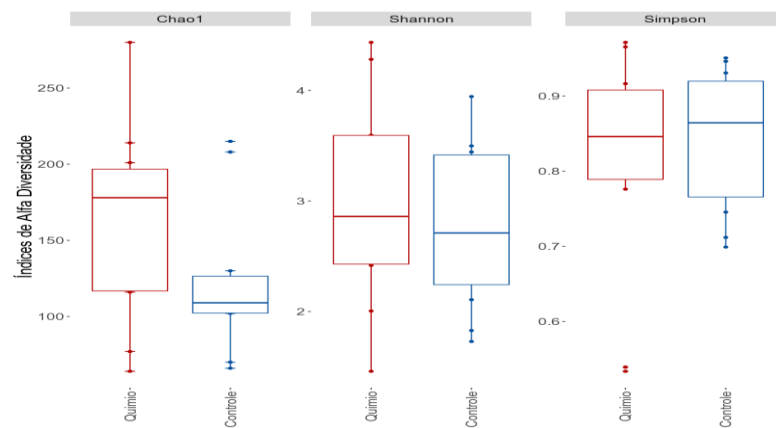


Figura 6: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson no tempo T0 dos Grupos Controle (GC) em vermelho e Quimioterapia (GQ) azul.

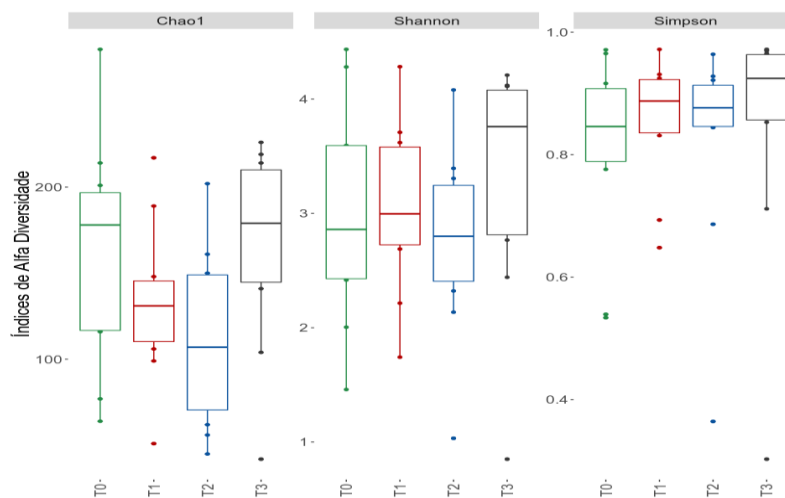


Figura 7: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com o tempo de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupo Quimioterapia (GQ).

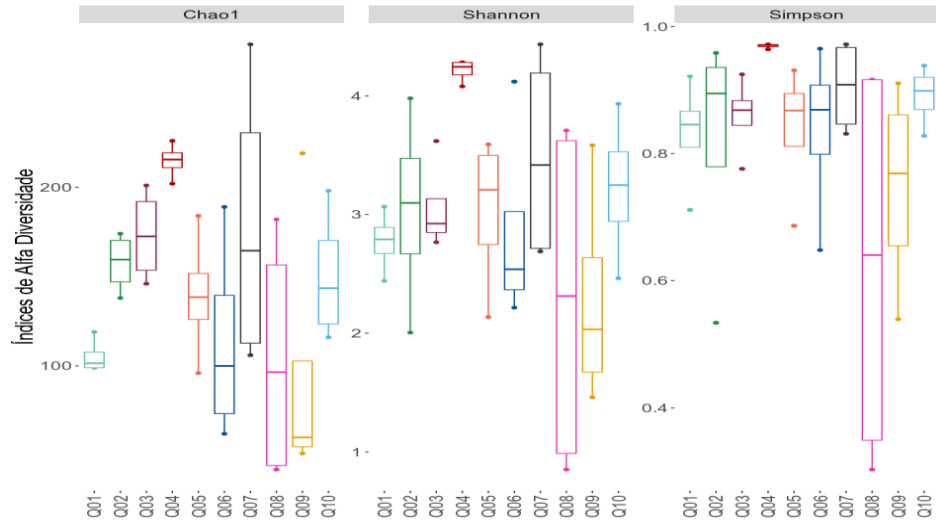


Figura 8: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com cada paciente considerando todos os tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupo Quimioterapia (GQ).

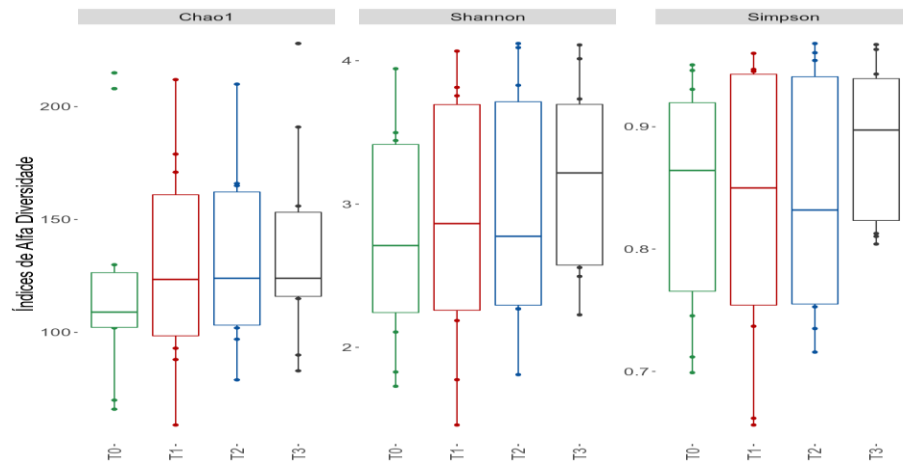


Figura 9: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com o tempo de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupo Controle (GC).

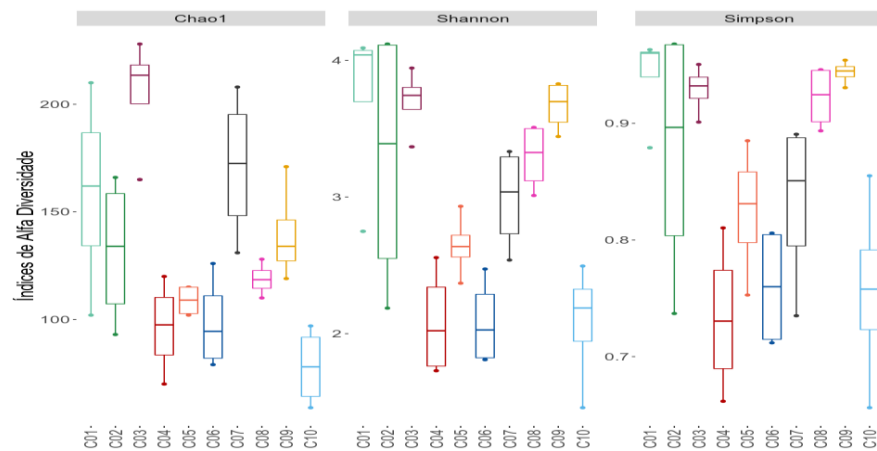


Figura 10: Bloxplot com os índices de Chao-1, Shannon e Simpson de acordo com cada paciente considerando todos os tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3) do Grupos Controle (GC).

Para analisar as diferenças interindividuais na microbiota oral (beta diversidade), utilizou-se o índice de dissimilaridade de Bray Curtis, resultados apresentados nas figuras 11 a 13. Na figura 11, foi realizado um PCoA no T0 do grupo controle e no grupo tratado com quimioterapia e não foi observado diferença estatística entre os dois (Adonis com 999 permutações, $p = 0,711$). Na figura 12 é apresentada a beta diversidade no grupo tratado com quimioterapia onde há diferença significativa entre os pacientes nos tempos T1 e T2 (Adonis com 999 permutações, $p = 0,001$), e não há entre as coletas (Adonis com 999 permutações, $p = 0,961$). No grupo controle demonstrado na figura 13 acontece o mesmo, onde há diferença entre os pacientes durante os tempos T0 e T3 (Adonis com 999 permutações, $p = 0,001$) e não há entre as coletas (Adonis com 999 permutações, $p = 0,788$).

Nas figuras 14 e 15 é apresentada a abundância relativa a nível de gênero, sendo que na primeira é apresentado o grupo tratado com quimioterapia e na segunda o grupo controle. Há uma predominância do gênero *Streptococcus* nos dois grupos e aparentemente não há grandes diferenças nas OTUs ao longo do tempo (coletas).

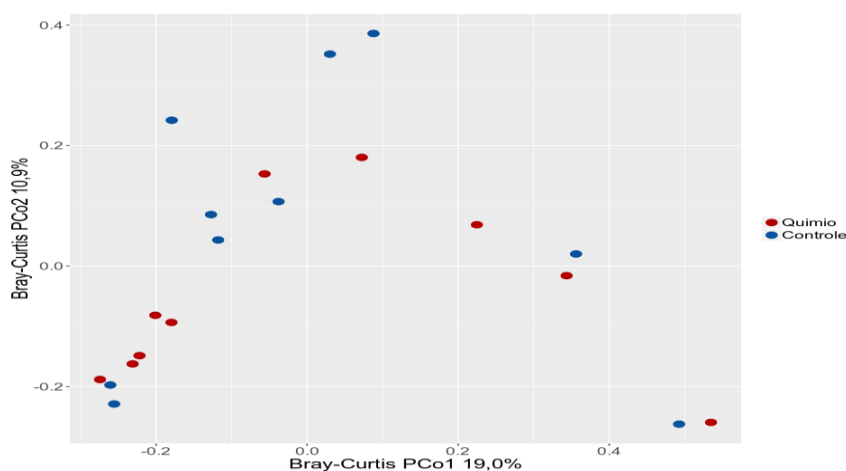


Figura 11: Análise de PCA do índice da beta-diversidade da microbiota oral de cada indivíduo pertencentes aos Grupo Quimioterapia (GQ) e controle (GC) no tempo 0 (T0).

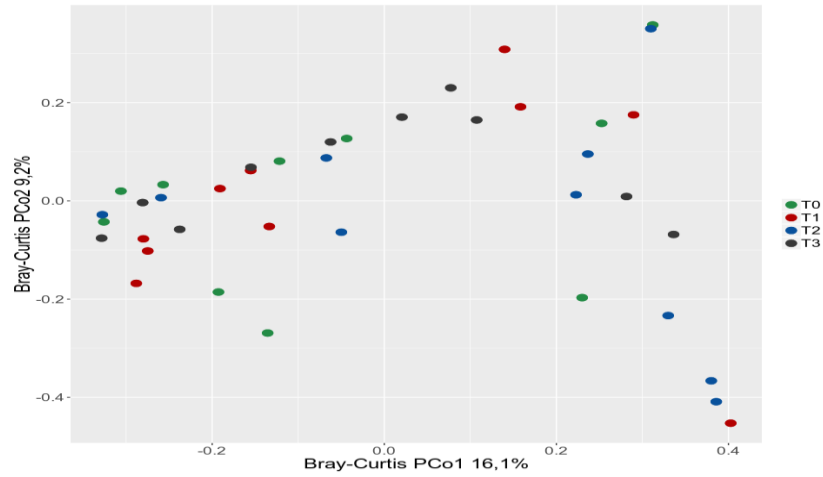


Figura 12: Análise de PCA do índice da beta-diversidade (dissimilaridade Bray-curtis) da microbiota oral de cada indivíduo pertencentes aos Grupo Quimioterapia (GQ) nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3).

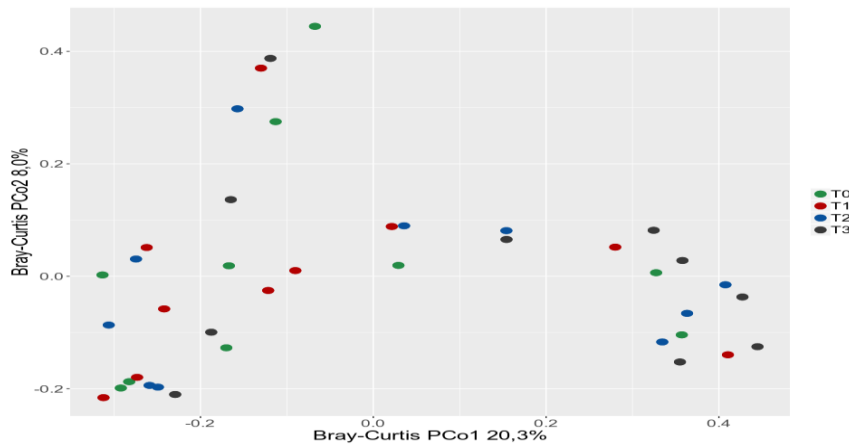


Figura 13: Análise de PCA do índice da beta-diversidade (dissimilaridade Bray-curtis) da microbiota oral de cada indivíduo pertencentes aos Grupo Controle (GC) nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2 e T3).

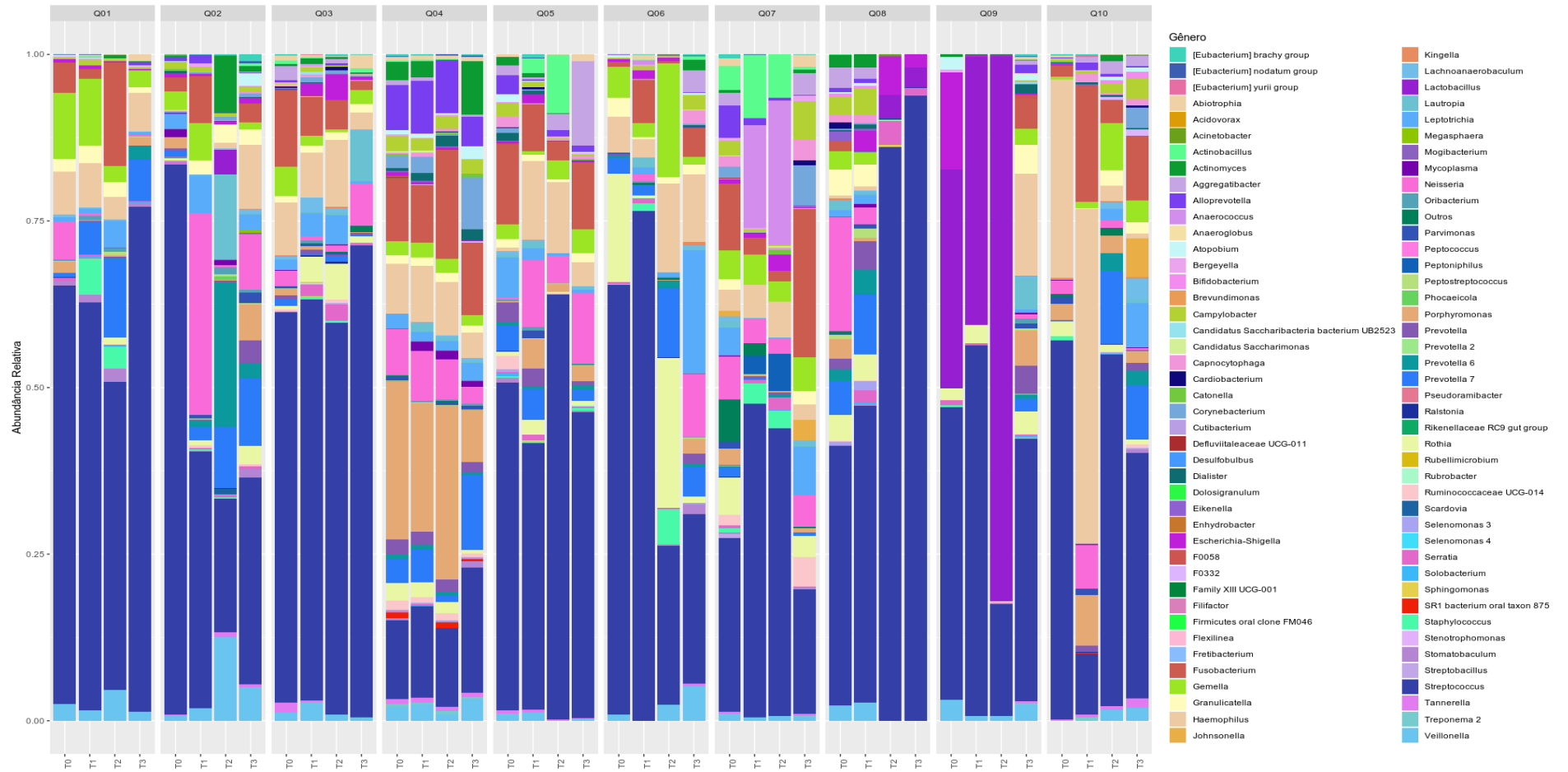


Figura 14: Abundância relativa a nível de gênero do Grupo Quimioterapia (GQ). Análise das comunidades bacterianas está apresentada para cada indivíduo (Q) (blocos) e por tempo da coleta (T0, T1, T2 e T3) (colunas).

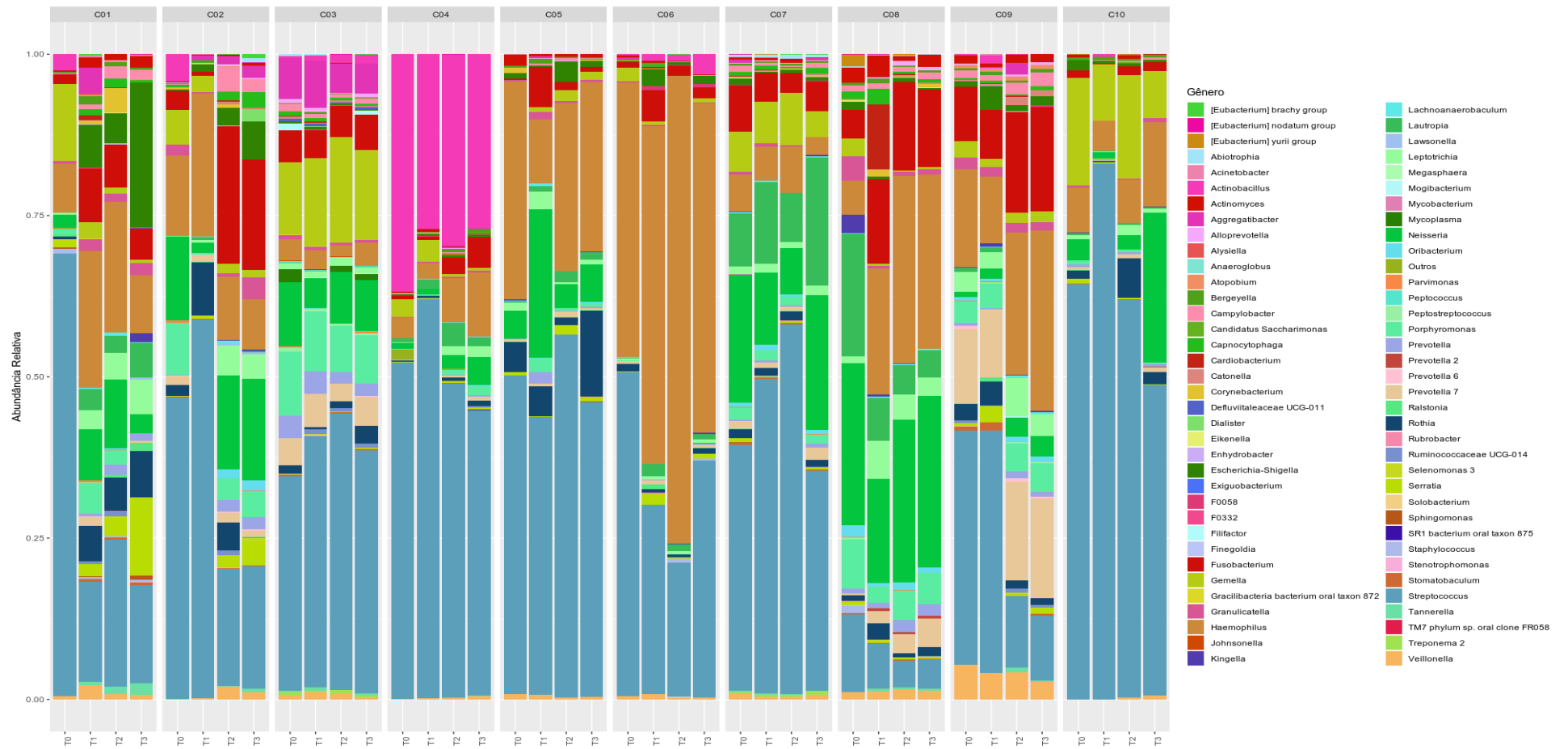


Figura 15: Abundância relativa a nível de gênero do Grupo Controle (GC). Análise das comunidades bacterianas está apresentada para cada indivíduo (Q) (blocos) e por tempo da coleta (T0, T1, T2 e T3) (colunas).

Nas figuras 16 e 17 é apresentada a abundância diferencial das OTUs, apresentados pelo maior nível taxonômico encontrado, cada ponto corresponde a uma OTU, sendo “f” = família, “g” = gênero e “e” = espécie. Entre o grupo tratado com quimioterapia no T0 em relação ao controle no T0 observamos 12 OTUs diferencialmente abundantes (figura 16). E duas OTUs diferencialmente abundantes foram encontradas no grupo tratado com quimioterapia na quarta coleta (T3) em relação a primeira (T0).

Foram encontradas diferenças na microbiota oral entre o grupo controle e o grupo de indivíduos submetidos ao tratamento quimioterápico. Os indivíduos do grupo controle apresentaram maior abundância dos gêneros *Ottowia* sp, *Actinobacillus* e *Lautropia*. Enquanto os pacientes tratados com quimioterapia tiveram maior abundância dos gêneros *Streptobacillus*, *Phylum* sp, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Rikenellaceae*. Foi observada na terceira coleta realizada nos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, uma maior abundância dos gêneros *Lautropia* e *Corynebacteriaceae*.

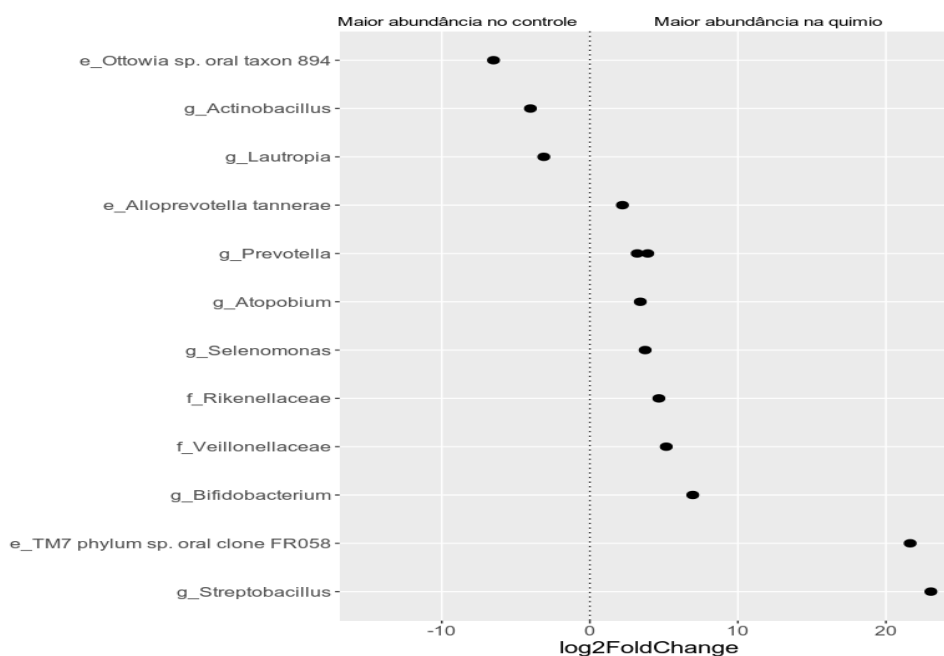


Figura 16: Variação da abundância de OTUs no tempo 0 (T0) entre os indivíduos dos Grupos Controle (GC) e Quimioterapia (GQ). No painel a esquerda são encontradas as OTUs com abundância maior no Grupos Controle (GC) e no painel a direita as OTUs com abundância maior no Grupos Quimioterapia (GQ). A variação está representada em escala Log2.

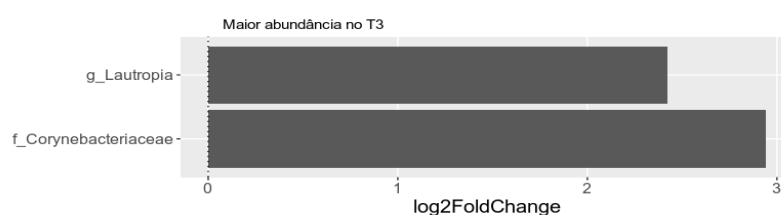


Figura 17: Variação da abundância de OTUs no Grupo Controle Quimioterapia (GQ) após o ciclo de tratamento com o quimioterápico 5-fluorouracil. Para esta análise foram considerados a variação observada das OTUs entre a coleta no tempo 0 (T0) e no tempo 3 (T3). A variação está representada em escala Log2.

Também foram avaliadas as correlações entre as OTUs identificadas neste trabalho com os dados de cada paciente do grupo quimioterapia, como presença ou não de mucosite, consumo de álcool, fumantes, idade, sexo, localização, estágio e tamanho dos tumores. Para tal, foi utilizado o teste estatístico de correlação de Spearman, sendo possível observar uma correlação entre o estágio do tumor, presença de mucosite e consumo de cigarro e algumas OTUs (Tabela 3). Observe-se que as OTUs, *Atopostipes*, *Exiguobacterium* e *Lactobacillus* apresentaram correlação positiva com as características analisadas, ou seja, no caso dos dois primeiros, há um aumento da abundância destas OTUs em pacientes com estágio de tumor III, já no caso de *Lactobacillus*, há um aumento deste grupo em indivíduos fumantes. Em contrapartida, o gênero *Stenotrophomonas* tende a diminuir sua abundância quando há mucosite nos pacientes analisados.

Tabela 3. Correlação entre a abundância de presentes nas amostras do Grupo Quimioterapia (GQ) no tempo 0 (T0) e metadados avaliados pelo teste de Spearman.

Gênero (OTU)	Metadados	Índice da correlação de Spearman	Valor de p
<i>Atopostipes</i>	Estágio	0,9938	2,53E-06
<i>Exiguobacterium</i>	Estágio	0,9938	2,53E-06
<i>Stenotrophomonas</i>	Mucosite	-0,9938	2,53E-06
<i>Lactobacillus</i>	Fumante	0,9285	3,33E-02

5 DISCUSSÃO

Os estudos que buscaram avaliar a composição da microbiota em pacientes com diagnóstico de CCP utilizaram estratégias de análise baseada em metodologias utilizando o cultivo (TAKAHASHI et al., 2019). Com a redução de custo e as tecnologias de sequenciamento de nova geração (NSG), que não requerem cultivo de microorganismos, o uso da metagenômica para o estudo da correlação da microbiota e câncer tem sido amplamente utilizado (BANERJEE et al., 2015). Mesmo assim, há poucos trabalhos que procuram entender melhor a interferência dos quimioterápicos utilizados para o tratamento de tumores sobre a microbiota humana (CARO, 2017). Diante desta lacuna, e em especial a falta de dados no Brasil, este trabalho se propôs a avaliar o efeito do quimioterápico 5-fluorouracil sobre a microbiota oral de pacientes acometidos por CCP utilizando abordagem de metagenômica a partir do sequenciamento de marcador 16S rRNA.

Para tal, foram analisadas amostras de dez indivíduos com diagnóstico de CCP e dez indivíduos sem diagnóstico ou histórico de CCP familiar, as coletas foram realizadas ao longo de 45 dias. Foram avaliados dados sociodemográficos e clínicos coletados a partir das entrevistas com os pacientes e dos prontuários dos mesmos disponíveis no HUST/Unoesc (Anexos C e D). Foi observado que a maioria 60% dos indivíduos do grupo quimioterapia (GQ) tem hábitos de consumo regulares de bebida alcoólica e tabaco (diariamente), em contrapartida no grupo controle (GC) 40% reportaram possuir estes hábitos. Segundo Cruz e Colaboradores (2003), o consumo rotineiro de bebidas alcólicas e tabaco tem efeito direto sobre a microbiota, reduzindo a abundância de micro-organismos, gerando um desequilíbrio na microbiota oral, este desequilíbrio pode estar associado a um maior risco do desenvolvimento de doenças como periodontite e algumas formas de carcinoma.

Apesar desta diferença, foi observado que há um número maior de indivíduos do sexo masculino no Grupo Quimioterapia (GQ) do que no Grupo Controle (GC). Considerando os principais fatores de risco, sabe-se que os estes tumores são mais frequentes entre homens, embora, nos últimos anos tem se observado um aumento em mulheres, isto deve-se a mudança de hábitos de consumo de tabaco e álcool. Estes hábitos são os principais fatores de risco para tumores malignos de cabeça e pescoço (ZYGOGIANNI et al., 2011). Contudo, fatores como média de idade, peso,

presença de comorbidades não foram estatisticamente distintas entre os grupos, indicando grupos similares nestes quesitos.

Ao longo do período do estudo foram coletadas 80 amostras dos 20 indivíduos da pesquisa. Considerando o total de sequências analisadas no presente trabalho obteve mais 7 milhões de sequências de boa qualidade, com uma média de 96.618 (\pm 33.148) sequências por amostra. Como amostras de metagenoma tendem a apresentar diversidades bastantes distintas entre indivíduos e ao longo do tempo, sendo necessário avaliar se o sequenciamento de cada amostra é representativo para cada metagenoma (RIBEIRO, 2017). Além disto, não há uma projeção muito clara da quantos *reads* são necessários para se obter espécies pouco abundantes em uma amostra biológica (HAMADY, et al., 2008; KUNIN et al., 2010). Alguns estudos para acessar a comunidade microbiana apontam para uma quantidade entre 2.000 a 4.000 sequências únicas por amostra para se obter em torno de 50% da riqueza de comunidade (LOGARES et al., 2013). Contudo, como não há um valor “fixo”, desta forma é necessário avaliar estimar a quantidade de sequências necessárias para se obter uma melhor representatividade de riqueza em cada amostra. Para tal, um dos métodos para se avaliar a riqueza de uma comunidade é a partir da curva de rarefação. No nosso estudo, as curvas de rarefação apresentadas nas figuras 4 e 5 demonstram que a riqueza de distintas OTUs é obtida a partir de 5.000 sequências na grande maioria das amostras analisadas. Estes dados indicam que com a cobertura que obtivemos neste estudo é possível afirmar que cada uma das amostras analisadas apresenta cobertura superior a esta, logo, a riqueza observada em cada amostra é próxima da riqueza biológica em cada amostra de saliva dos indivíduos analisados.

Ao analisar os índices de Chao-1, Shannon e Simpson pode-se observar que estes demonstram que não houve diferença na diversidade microbiana nas amostras dos grupos controle e quimioterapia, não havendo predominância de uma ou outra OTU nas amostras. Desta forma, nosso artigo corrobora com Takahashi e Colaboradores (2019), onde as amostras não demonstram uma diversidade significativa entre os índices de Shannon, Simpson e Chao-1, assim com Xiao-Hui Chen e Colaboradores (2019).

Contudo, nota-se que o paciente Q4 (Figura 8), apresenta índices de diversidade distintos em relação aos demais pacientes. O paciente Q4, faz parte dos

indivíduos que consomem bebida alcoólica e tabaco, além disso, o mesmo fez a utilização de 1900 mg de quimioterápico e também fez o uso de manitol (conforme anexo D) segundo uma análise qualitativa, o indivíduo fazia o consumo de uma dieta rica em carboidratos e fibras. Segundo Junior (2010), o manitol (polietilenoglicol) é um laxante osmótico, que pode interferir na microbiota dos indivíduos que realizaram administração do fármaco. Além disto, a mudança da microbiota, também pode estar relacionada com a dieta, conforme (SILVA; MARSI, 2016), a microbiota tem relação com a atividade metabólica e processos fermentativos que compõe a dieta do hospedeiro. Isto poderia explicar esta diferença qualitativa observada neste paciente.

Segundo Ward e Colaboradores (1999), a análise da beta-diversidade é possível observar se há diferença na composição da microbiota entre as amostras analisadas. No presente estudo não foi observada diferença nos índices de beta-diversidade: dissimilaridade Bray-curtis (figuras 12 e 13), Jaccard e UniFrac (dados não apresentados), quando comparados os grupos controle (GC) e quimioterapia (GQ), quanto ao longo do tempo do tratamento. Estes dados demonstram que na população analisada não há diferença entre a comunidade microbiana salivar de indivíduos acometidos por CCP daqueles sem CCP. Além disto, demonstram que o 5-fluorouracil não interferiu na composição da comunidade microbiana. Estes dados são distintos do observado por Gonzaga (2015), onde pacientes acometidos por câncer de colón retal apresentaram menor da diversidade da comunidade microbiana em relação aos indivíduos sem câncer.

Apesar de não ter sido observada uma diferença na composição da comunidade microbiana como um todo, há algumas OTUs que apresentaram abundância distinta entre as amostras analisadas. Foi observado maior abundância do gênero *Streptococcus* (figuras 14 e 15) em todas as amostras. Este grupo representa a maioria das bactérias que colonizam a cavidade oral nos primeiros meses de vida (SMITH; TAUBMAN., 1990). A ocorrência de infecções causadas por *Streptococcus* depende muito das características bacterianas, como por exemplo, a capacidade de produzir fatores de virulência e das condições do hospedeiro, a deficiência do sistema imune ou a falta de anticorpos contra a bactéria como resposta da imunidade adaptativa. A espécie *S. agalactiae* é extremamente hábil em colonizar e causar infecção em seus hospedeiros, isso ocorre devido a sua eficiência

em realizar os mecanismos essenciais da patogênese, adesão a superfícies teciduais e mucosas, competição com a microbiota, invasão principalmente no epitélio alveolar e endotelial e multiplicação do sítio de infecção (PALMEIRO, 2009). O gênero *Streptococcus*, também está relacionado ao desenvolvimento da cárie dentária, podendo ter relação com o alto consumo de sacarose, contato com indivíduos infectados e imaturidade do sistema imunológico (BERKOWITZ, 2003; MAKI et al., 2014). Desta forma, nosso artigo corrobora WANG; GANLY (2014) onde demonstra que o gênero *Streptococcus* é um dos micro-organismos mais predominantes na cavidade oral, desde os primeiros dias de vida.

Na figura 16, pode-se observar uma maior abundância de OTUs no grupo quimioterapia, onde observa-se o aumento dos gêneros *Bifidobacterium* e *Streptobacillus*. As bactérias do gênero *Bifidobacterium* fazem parte da microflora humana normal e exercem efeitos probióticos em humanos. Alguns estudos demonstram que esse gênero age como agente antitumoral no desenvolvimento do câncer (WEI et al., 2018). Já o gênero *Streptobacillus* não foram encontrados relatos do seu aumento em relação ao tratamento quimioterápico.

Durante a terceira coleta realizada nos pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, foram encontrados os gêneros *Lautropia* e *Corynebacteriaceae*, em maior abundância. O gênero *Corynebacteriaceae*, corresponde a micro-organismos gram-positivos e aeróbios. Sendo que algumas das bactérias pertencentes a esse gênero fazem parte da microbiota normal de humanos, entretanto há espécies causadoras de doenças em circunstâncias específicas, como em pacientes imunocomprometidos, podendo causar meningite, artrite séptica, difteria ou infecção urinária (FRASSETTO, 2019). Enquanto que o gênero *Lautropia* não apresentou relato sobre associações deste grupo com infecções hospitalares ou internados.

O quimioterápico 5-fluorouracil atua na inibição da síntese de DNA, é um anti-metabólito/antineoplástico que interfere no metabolismo de nucleotídeo da célula e pode ser incorporado no RNA ou DNA durante a fase S do ciclo celular, provocando toxicidade celular (ZHANG et al 2008), além disto, este composto já foi descrito com ação antimicrobiana em espécies como *Mycobacterium tuberculosis* (SINGH et al., 2016) bem como, acredita-se que determinadas bactérias podem interferir na ação desta classe de drogas (BROWNING et al., 2008).

Além deste possível efeito direto, Vanlancker e colaboradores (2017), demonstram que a mucosite é um efeito colateral do tratamento quimioterápico que pode gerar alterações na composição microbiana. Nos pacientes submetidos a tratamento quimioterápico observou-se que dois indivíduos apresentaram mucosite, e que a redução do gênero *Stenotrophomonas* foi associado a presença de mucosite nos pacientes. Segundo Pedroso (2014), a microbiota tem participação no desenvolvimento da mucosite quando induzida a tratamentos quimioterápicos. Além disto, Paez (2008), demonstra que a espécie *Stenotrophomonas maltophilia* tem abundância reduzida em crianças com mucosite, indicando que a redução deste grupo pode ser em decorrência desta condição.

Também foi observado o aumento do gênero *Lactobacillus* em indivíduos fumantes, desta forma, os dados encontrados no presente estudo corroboram com Börnigen e colaboradores (2017), onde relata que os carcinomas de células escamosas orais são as principais causas de morbidade e mortalidade e o uso do tabaco é o principal fator de risco estabelecido, levando ao aumento da infecção crônica e a inflamação, ambas reconhecidas na patogênese do câncer. Além disso, segundo Kumar e colaboradores (2010), demonstra que os estudos utilizando métodos de biologia molecular para identificação e caracterização bacteriana demonstram que o perfil microbiano associado a fumantes é diverso daquele em não fumantes, demonstrando o aumento do gênero *Lactobacillus* ao longo do tempo.

Além disso, foram encontradas bactérias do gênero *Exiguobacterium*, segundo Chocolatewala e colaboradores (2010), esse gênero de bactérias mostram a diversidade da taxa bacteriana isolada do tecido de câncer oral, desta forma podemos ter um possível biomarcador para acompanhamento de pacientes com CCP.

Segundo Machado e colaboradores (2002), a resposta imune é fundamental para a defesa contra a maioria dos agentes infectantes, nos últimos anos evidências demonstram que muitas doenças infecciosas hospitalares e os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim como uma resposta imune anormal. Desta forma, pode-se observar que a redução da imunidade pode influenciar no aparecimento de bactérias que causam infecção hospitalar, no presente trabalho foi observado aumento do gênero

Corynebacteriaceae, sendo este gênero relacionado com a diminuição da imunidade devido ao tratamento quimioterápico.

6 CONCLUSÃO

As análises dos metagenomas salivares destes pacientes permitiram concluir que os indivíduos submetidos ao tratamento quimioterápico (grupo quimioterapia) e os indivíduos do grupo controle não apresentaram diferenças significativas quando a diversidade e riqueza de OTUs entre elas e ao longo do tempo do estudo. Contudo, foi observado que o indivíduo Q4 apresentou uma diversidade distinta em relação aos demais pacientes podendo haver analogia com a dieta o uso de manitol entre outros fatores relacionados.

Foi possível observar que o gênero *Streptococcus* é o mais abundante em ambos os grupos avaliados. Além disto, após a terceira coleta (final do tratamento) observamos que os pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico tiveram um aumento de mais de três e oito vezes da abundância dos gêneros *Lautropia* e *Corynebacteriaceae*, respectivamente, sendo o segundo responsável por algumas doenças hospitalares, possivelmente em razão do detrimento imunológico dos pacientes ocasionados pelo tratamento com o quimioterápico em questão.

Também foi observado que fatores como mucosite, consumo de cigarros e estadiamento dos tumores tiveram relação direta na abundância de determinada OTUs, conforme já descrito na literatura.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Cabe ressaltar que houveram diversas limitações para a realização deste estudo, como a dificuldade no acompanhamento dos pacientes devido aos óbitos do paciente submetidos ao tratamento quimioterápico ou com diagnóstico tardio de carcinoma. Também devemos ressaltar que o estudo se limitou a análise da microbiota de pacientes após um único ciclo de tratamento quimioterápico (aguda), o que também pode ter acarretado a não observação de uma alteração da composição desta microbiota ao após este tratamento.

Em estudos futuros, sugestionamos o foco em um maior número de amostras e tempo de coleta, para analisar assim de forma crônica, a abundância, e os papéis patogênicos do micro-organismos do microbioma oral, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, diagnóstico e intervenção precoce do carcinoma oral e a relação destes com o microbioma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILLA, M. et al. (2009). Ojcius DM, Yilmaz O. **The oral microbiota: living with a permanent guest.** DNA Cell Biol.,28(8), pp. 405-411.

BANERJEE, A., E. DUFLO, N. GOLDBERG, D. KARLAN, R. OSEI, W. PARIENTE, J. SHAPIRO, B. THUYSBAERT. **“A Multifaceted Program Causes Lasting Progress for the Very Poor: Evidence from Six Countries.”** Science 348, no. 6236 (May 14, 2015): 1260799–1260799.

BERKOWITZ RJ. **Causes, treatment and prevention of early childhood caries: a microbiologic perspective.** J Can Dent Assoc. 2003;69(5):304-7.

BÖRNIGEN, D., REN, B., PICKARD, R., LI, J., OZER, E., HARTMANN, E. M., HUTTENHOWER, C. (2017). **Alterations in oral bacterial communities are associated with risk factors for oral and oropharyngeal cancer.** Scientific Reports, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-17795-z .

BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BROWNING GG, MERCHANT SN, KELLY G, SWAN IR, CANTER R, MCKERROW SW. **Chronic otitis media.Scott-Brown’s otorhinolaryngology head and neck,** vol. 19. Edward Arnold Ltd.; 2008. p. 3406-10.

CANDELA, M. et al. **Inflammation and colorectal cancer, when microbiota-host mutualism breaks.** World J Gastroenterol.2014; 20:908–922.

CARO, P.L. **Effect of physical training on the gut microbiota and the nutritional impacts of câncer cachexia.** 2017. 126p. Master’s thesis (Cellular and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

CHARDIN, H. et al. (2006). **Microbiologie en odonto-stomatologie.** Maloine, pp. 141-164.

CHEN, X.-H., WANG, A., CHU, A.-N., GONG, Y.-H., & YUAN, Y. (2019). **Mucosa-Associated Microbiota in Gastric Cancer Tissues Compared With Non-cancer Tissues**. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01261

CHOCOLATEWALA, N., CHATURVEDI, P., & DESALE, R. (2010). **The role of bacteria in oral cancer**. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 31(4),126. doi:10.4103/0971-5851.76195.

DA CRUZ, G.A.; MORAES, L.C.; MORAES, M. E. L.; CASTILHO, J.C.M. **Estudo clínico e radiográfico do nível da crista óssea alveolar em pacientes fumantes**. *Cienc. Odontol. Bras.* 2003 Out/Dez; 6(4):60-9.

DOBROSSY, L. **Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem**. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 24, n. 1, p. 9-17, jan. 2005.

FONG CT, et al. **Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification**. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(10):3753–7.

G. SINGH, et al. **Characterization of a novel esterase Rv1497 of Mycobacterium tuberculosis H37Rv demonstrating beta-lactamase activity** *Enzyme Microb. Technol.*, 82 (2016), pp. 180-190

GABRILOVICH, D.I.; NAGARAJ, S. **Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system**. *Nat Rev Immunol*. 9:162–174, 2009.

GAGLIANI, N. et al. **The Fire Within: Microbes Inflamm Tumors**. *Cell*. 2014; 157(4): 776-783.

GALBIATTI, A. L. S. et al. **Head and neck cancer: causes, prevention and treatment**. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 79, n. 2, p. 239-247, mar./abr. 2013.

GALVÃO-MOREIRA LV, DA CRUZ MCFN. **Oral microbiome, periodontitis and risk of head and neck cancer**. *Oral Oncol*. 2016;53:17–9.

GAO S, LI S, MA Z, LIANG S, SHAN T, ZHANG M, et al. **Presence of Porphyromonas gingivalis in esophagus and its association with the**

clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. Infect Agent Cancer. Infectious Agents and Cancer; 2016;11:3.

GIBSON RJ, KEEFE DM (2006). **Cancer chemotherapy-induced diarrhoea and constipation:** mechanisms of damage and prevention strategies. Support care cancer 14:890–900

GIMENEZ DL. Quimioterapia. In: Ikemori EHA, Oliveira T, Serralheiro IFD, Shibuya E, Cotrim TH, Trintin LA et al. **Nutrição em oncologia.** 1.ed. São Paulo: Lemar; 2003.

GONZAGA CMR, FREITAS-JUNIOR R, CURADO MP, SOUSA A-LL, SOUZA-NETO J-A, SOUZA MR. **Temporal trends in female breast cancer mortality in Brazil and correlations with social inequalities: ecological time-series study.** BMC Public Health 2015; 15: 96.

HAMADY M, WALKER JJ, HARRIS JK, GOLD NJ, KNIGHT R. **Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex.** Nat Methods 5:235–237, 2008.

HANDELSMAN, J. **Metagenomics:** application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and molecular biology reviews. v. 68, p.669-685, 2004.

HOFF, P. M. G. (Ed.). et al. **Tratado de oncologia.** São Paulo: Editora Atheneu, 2013. 2860 p.

HOOPER SJ, WILSON MJ, CREAN SJ. **Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature.** Head Neck 2009; 31(9):1228-1239.

INCA. Tipos de Câncer. Colorretal. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal>>. Acesso em: 15 de outubro. 2017.

JENKINSON, H. F. E LAMONT, R. J. (2005). **Oral microbial communities in sickness and in health.** Trends Microbiol., 13(12), pp. 589-595.

JULIO CÉSAR M SANTOS JR. **Bowel Preparation for Colonoscopy** – Myths and Misconceptions. Departamento de Cirurgia – seção de Coloproctologia – Hospital Frei Galvão Guaratinguetá, SP Rev bras Coloproct, 2010;30(3): 368-377.

KRUSER, T. J. et al. Hypopharynx. In: HALPERIN, E. C. et al. Perez & Brady's **Principles and practice of radiation oncology**. 6nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 46. p. 834-848.

KUMAR, S., MOLINA-CRUZ, A., GUPTA, L., RODRIGUES, J., BARILLAS-MURY, C., 2010. **A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in Anopheles gambiae**. Science 327, 1644-1648.

KUNIN V, ENGELBREKTSON A, OCHMAN H, HUGENHOLTZ P. **Wrinkles in the rare biosphere**: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. Environ Microbiol 12:118–123, 2010.

LAMONT, R. J. E JENKINSON, H. F. (2010). **Oral microbiology at a glance**. John Wiley & Sons, ISBN: 978-0-8138-2892-3.

LOGARES, R., LINDSTRÖM, E. S., LANGENHEDER, S., LOGUE, J. B., PATERSON, H., LAYBOURN-PARRY, J., BERTILSSON, S. (2012). **Biogeography of bacterial communities exposed to progressive long-term environmental change**. The ISME Journal, 7(5), 937–948.doi:10.1038/ismej.2012.168

LYNDA A FRASSETTO. **Corynebacterium Infections**. Drugs & Diseases. Jun 14, 2019.

MACHADO P, ARAUJO C, DA SILVA AT, ALMEIDA RP, D'OLIVEIRA JR A, BITTENCOURT A, et al. **Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer**. Clin Infect Dis. 2002;34:E69-73.

MAGER DL, HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. **The effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects**. J Clin Periodontol. 2003;30:1031–1037. doi: 10.1046/j.0303-6979.2003.00418.x.

MAKI Y, SAKAYORI T, HIRATA S, ISHII T, TACHINO A. **Monitoring caries risks before the window of infection and later caries increment: a caries prediction study on rapid detection of *Streptococcus mutans* using monoclonal antibodies.** Bull Tokyo Dent Coll. 2014;55(1):19-23.

MAÑÓN, R. R. et al. Oral Cavity. In: HALPERIN, E. C. et al. Perez & Brady's **Principles and practice of radiation oncology.** 6nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 44. p. 795-815.

MARQUES R, BUZAID AC. **Câncer de mama: tratamento adjuvante.** Manual de oncologia clínica. 5oed. Rio de Janeiro: Reichmann & Affonso Editores; 2006.

MARSH & MARTIN, **Microbiologia oral.** 6. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2018.

MENDENHALL, W. M. et al. **Laryngeal Cancer.** In: HALPERIN, E. C. et al. Perez & Brady's Principles and practice of radiation oncology. 6nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 47. p. 850-867.

MEURMAN JH, STAMATOVA IV. **Probiotics: Evidence of Oral Health Implications.** Folia Med (Plovdiv) 2018 Mar 1; 60(1): 21-29.

MEURMAN JH. **Oral microbiota and cancer.** J Oral Microbiol. 2010;2(2010):1–10.

Morgan, X. C., & Huttenhower, C. (2012). Chapter 12: **Human Microbiome Analysis.** PLoS Computational Biology, 8(12), e1002808.doi:10.1371/journal.pcbi.1002808

NESME, J.; ACHOUAK, W.; AGATHOS, S. N.; BAILEY, M.; BALDRIAN, P.; BRUNEL, D.; et al. **Back to the future of soil metagenomics.** Frontiers in microbiology, v. 7, 2016.

PAEZ, J. G. et al. **Trends in *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection in relation to usage density of cephalosporins and carbapenems during 7 years.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v. 29, p. 989-90, 2008.

PALMEIRO, J. K. **Caracterização Fenotípica e Genotípica de Isolados Clínicos de Streptococcus agalactiae**. 2009. 145 f. Dissertação (Pós graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2009.

RODRIGUES, W.C. **Ecologia Geral Riqueza e Diversidade de Espécies**. Disponível em< http://www.ebras.bio.br/autor/aulas/riqueza_diversidade_transp.pdf>. Acesso em: 01/04/2014.

RUBENSTEIN, E. B., et al. **Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis**. Cancer, v. 100, p. 2026-15 2046, 2004.

SALAMA, J. K.; GILLISON, M. L.; BRIZEL, D. M. Oropharynx. In: HALPERIN, E. C. et al. **Perez & Brady's Principles and practice of radiation oncology**. 6nd ed. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins, 2013. cap. 45. p. 817-832.

SARTOR, S. G. et al. **Riscos ocupacionais para o câncer de laringe: um estudo caso-controle**. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, p. 1473-1481, jun. 2007.

SILVA N.C, MARSI T.C.O. **Papel da alimentação na modulação da microbiota intestinal**. UNIVAP, PCS. São José dos Campos/SP. 2016.

SILVIA HELENA SOUSA PIETRA PEDROSO. **Papel da Microbiota Intestinal no Desenvolvimento e Gravidade de Mucosite Induzida por Irinotecano em Modelo Murino**. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Belo Horizonte 2014.

SIMON, C. & DANIEL, R. **Metagenomic analyses: past and future trends**. Applied and environmental microbiology, v. 77, n. 4, p. 1153-1161, 2011.

SMITH DJ, TAUBMAN MA. **Effect of local deposition of antigen on salivary immune responses and reaccumulation of mutans streptococci**. J Clin Immunol. 1990 Sep;10(5):273-81.

SOBHANI, I. et al. **Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients**. Plos One. 2011; 6(1):163-93

STADLER ME, PATEL MR, COUCH ME, HAYES DN. **Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways**. Hematol Oncol Clin North Am. 2008;22(6):1099-124, VII.

TAKAHASHI N, OGITA N, TAKAHASHI T, TANIGUCHI S, TANAKA M, SEKI M, UMEDA M. **A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in Arabidopsis**. Elife. 2019 Apr 9;8. pii: e43944. doi: 10.7554/eLife.43944.

The Human Microbiome Project. Disponivel em:

<https://www.hmpdacc.org/overview/>> Acesso em: 5 de maio de 2019.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. **Metagenomics - a guide from sampling to data analysis**. *Microbial Informatics and Experimentation*, v. 2, n. 1, p. 12. DOI: 10.1186/2042- 5783-2-3, 2012.

TORRES PJ, FLETCHER EM, GIBBONS SM, BOUVET M, DORAN KS, KELLEY ST. **Characterization of the salivary microbiome in patients with pancreatic cancer**. PeerJ [Internet]. 2015;3:e1373.

VANLANCKER, E et al. **5-Fluorouracil and irinotecan (SN-38) have limited impact on colon microbial functionality and composition in vitro**. Peer Journal, vol. 5, p. e4017, 2017.

WANG, L., & GANLY, I. (2014). **The Oral Microbiome and Oral Cancer**. *Clinics in Laboratory Medicine*, 34(4), 711–719. doi:10.1016/j.cll.2014.08.004

WARD, J.V., TOCKNER, K. & SCHIEMER, F. 1999. **Biodiversity of floodplain river ecosystems: ecotones and connectivity**. *Regulation River: Reservoir & Management* 11: 105-119.

WEI, Y., YANG, F., WU, Q., GAO, J., LIU, W., LIU, C., TANG, R. (2018). **Protective Effects of Bifidobacterial Strains Against Toxigenic Clostridium difficile**. *Frontiers in Microbiology*, 9.doi:10.3389/fmicb.2018.00888

YUMOTO, H., YAMADA, M., SHINOHARA, C., NAKAE, H., TAKAHASHI, K., AZAKAMI, H., MATSUO, T. (2007). **Soluble products from Eikenella corrodens induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways.** Oral Microbiology and Immunology, 22(1), 36–45.doi:10.1111/j.1399-302x.2007.00320.x


ZAINAL-ABIDIN, Z. et al. (2012).**Differential proteomic analysis of a polymicrobial biofilm.** J Proteom Res., 11(9), pp. 4449-4464.

ZHANG, W. et al. **Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions** . J Neurosurg, v.98, n.4, p.846-53, Apr 2003.

ZYGOGIANNI, A. G. et al. Oral squamous cell cancer: **early detection and the role of alcohol and smoking.** Head Neck Oncol, v. 3, p. 1-12, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unoesc.

- DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
<p>Título Público: EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS SALIVARES EM PACIENTES COM CÂNCER DE OROFARINGE Pesquisador Responsável: Antuani Rafael Baptistella Contato Público: Antuani Rafael Baptistella Condições de saúde ou problemas estudados: Câncer de Orofaringe Descritores CID - Gerais: Neoplasia maligna da orofaringe Descritores CID - Específicos: Neoplasia maligna da orofaringe Descritores CID - da Intervenção: Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 14/03/2019</p>	
- DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE	
<p>Nome da Instituição: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA Cidade: VIDEIRA</p>	
- DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	
<p>Comitê de Ética Responsável: 5367 - UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA - UNOESC Endereço: Rua Getúlio Vargas, nº 2125, Campus I, Bloco I Telefone: (49)3551-2062 E-mail: cep@unoesc.edu.br</p>	

ANEXO B – Número total de *reads* por amostra, após procedimento de limpeza, *denoising* e remoção de quimeras.

Código	Amostra	Entrada	Filtradas	<i>Denoised</i>	Não-quiméricas
180814254634-1-1-1	C1-T0	44535	42741	42741	41694
180814254656-2-1-1	C1-T1	96260	90998	90998	90796
180814254666-2-1-1	C1-T2	141523	133641	133641	132888
180814254654-2-1-1	C1-T3	57205	53564	53564	52484
180814254665-1-1-1	C2-T0	106550	102248	102248	99684
180814254662-1-1-1	C2-T1	71742	68854	68854	68854
181217202647-1-1-1	C2-T2	54705	52327	52327	52129
181217202649-2-1-1	C2-T3	63797	60484	60484	59990
180814254678-1-1-1	C3-T0	91421	87696	87696	86712
180814254645-1-1-1	C3-T1	100669	96625	96625	95774
180814254683-1-1-1	C3-T2	53422	51146	51146	50533
180814254655-1-1-1	C3-T3	144341	138788	138788	135459
180814254669-1-1-1	C4-T0	96983	92917	92917	92773
180814254668-1-1-1	C4-T1	96735	92775	92775	92435
180814254652-1-1-1	C4-T2	123080	117744	117744	117470
180814254667-1-1-1	C4-T3	108046	103608	103608	103442
180814254672-1-1-1	C5-T0	66929	64266	64266	64129
180814254685-1-1-1	C5-T1	110768	106565	106565	105517
180814254688-2-1-1	C5-T2	48905	46108	46108	46108
180814254684-1-1-1	C5-T3	69570	66701	66701	66701
180814254660-1-1-1	C6-T0	138345	133084	133084	130333
180814254687-2-1-1	C6-T1	189865	179360	179360	178871
180814254679-1-1-1	C6-T2	90109	86713	86713	86436
180814254661-1-1-1	C6-T3	47872	46015	46015	46015
180814254653-1-1-1	C7-T0	76547	73218	73218	73197
180814254680-2-1-1	C7-T1	48067	45104	45104	44705
180814254681-1-1-1	C7-T2	73516	70511	70511	70293
180814254630-1-1-1	C7-T3	79278	75685	75685	75332
180814254686-1-1-1	C8-T0	61746	59132	59132	59132
181217202642-1-1-1	C8-T1	108382	103925	103925	102042
181217202645-1-1-1	C8-T2	98969	95298	95298	92830

181217202653-1-1-1	C8-T3	140432	134965	134965	131038
180814254650-1-1-1	C9-T0	80338	76897	76897	72958
180814254674-2-1-1	C9-T1	119034	112249	112249	111465
181217202655-1-1-1	C9-T2	71480	68690	68690	64979
181217202656-1-1-1	C9-T3	41409	39712	39712	39415
181217202648-1-1-1	C10-T0	48282	46202	46202	46202
181217202650-1-1-1	C10-T1	105218	100568	100568	100414
181217202654-1-1-1	C10-T2	102824	98257	98257	98063
181217202643-1-1-1	C10-T3	116307	111821	111821	111057
180312685509-1-1-1	Q1-T0	110052	105457	105457	105080
180814254635-1-1-1	Q1-T1	86417	82810	82810	82810
180814254632-1-1-1	Q1-T2	141018	135336	135336	133196
180814254633-1-1-1	Q1-T3	137481	131518	131518	128242
180312685501-1-1-1	Q2-T0	87164	83358	83358	83120
180312685528-1-1-1	Q2-T1	109183	104941	104941	104688
180312685498-1-1-1	Q2-T2	108126	102018	102018	99842
180814254640-1-1-1	Q2-T3	98385	94388	94388	90229
180312685496-1-1-1	Q3-T0	110233	105842	105842	103014
180312685524-2-1-1	Q3-T1	67522	63756	63756	63349
180312685497-1-1-1	Q3-T2	52992	50702	50702	50358
180312685519-1-1-1	Q3-T3	106426	101684	101684	100245
180814254651-1-1-1	Q4-T0	110181	105730	105730	104432
180814254663-1-1-1	Q4-T1	140748	135275	135275	132813
180814254682-1-1-1	Q4-T2	126369	121422	121422	119711
180814254643-1-1-1	Q4-T3	173021	165348	165348	160322
180312685513-1-1-1	Q5-T0	103776	99444	99444	98224
180312685525-1-1-1	Q5-T1	57266	54842	54842	54498
180312685502-1-1-1	Q5-T2	144612	138821	138821	130165
180312685499-1-1-1	Q5-T3	145213	139514	139514	137432
180312685512-1-1-1	Q6-T0	114734	109661	109661	107108
180312685500-1-1-1	Q6-T1	61123	58477	58477	58477
180312685530-1-1-1	Q6-T2	91777	87919	87919	87644
180814254646-1-1-1	Q6-T3	164686	157788	157788	146151

180814254664-1-1-1	Q7-T0	93124	89222	89222	87671
180814254631-1-1-1	Q7-T1	83851	80496	80496	79734
180814254677-2-1-1	Q7-T2	171922	162614	162614	162411
180814254644-1-1-1	Q7-T3	158643	152328	152328	143348
180814254649-1-1-1	Q8-T0	155827	149262	149262	142260
180814254659-1-1-1	Q8-T1	62883	59879	59879	58643
180814254657-2-1-1	Q8-T2	80899	73853	73853	73853
180814254658-2-1-1	Q8-T3	67366	60866	60866	60866
180312685533-1-1-1	Q9-T0	116945	109149	109149	102954
180814254641-1-1-1	Q9-T1	105181	95457	95457	81505
180814254647-1-1-1	Q9-T2	149120	123517	123517	106788
180814254648-1-1-1	Q9-T3	154461	148371	148371	143458
180312685535-1-1-1	Q10-T0	121772	116962	116962	115209
180814254639-1-1-1	Q10-T1	167869	162173	162173	150066
180814254636-1-1-1	Q10-T2	113723	109180	109180	104652
180814254642-1-1-1	Q10-T3	175228	167957	167957	154866
Total		8.212.525	7.824.539	7.824.539	7.639.783
Média		103.300	97.441	97.441	96.918
Desvio padrão		36.621	34.894	34.894	33.148

ANEXO C – Metadados por indivíduo do Grupo Controle (GC).

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
Idade (anos)	64	58	55	34	62	24	24	70	54	77
Sexo*	M	M	M	M	F	F	M	M	F	M
Peso (kg)	55	109	75	79,6	85	81	100	71	62	66
Consumo de bebida alcoólica	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim
Fumante	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não
Comorbidades	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

* F = Feminino; M = Masculino

Anexo D – Metadados por indivíduo do Grupo Quimioterapia (GQ).

	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10
Idade (anos)	55	61	30	62	45	60	68	58	60	42
Sexo*	F	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Peso (Kg)	67	54	67	70	81	60	42	71	65,5	45
Consumo de bebida alcoólica	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Fumante	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não
Mucosite	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
Dose do tratamento (mg)	1730	1630	5088	1900	1960	1800	1430	1800	1830	1470
Tamanho do tumor (cm)	2,1x1,8	2,3x1,9	4,5x2,5	3,0x2,0	0,5x0,3	2,5x2,0	3	3,17x1,5	16x10	0,4x0,2
Localização do tumor	Laringe	Epidermóide	Pescoço	Orofaringe	Orofaringe	Assoalho da boca	Pescoço	Orofaringe	Pescoço	Tireóide
Estágio	III	II	III	II	II	II	II	II	II	II
Melhora do quadro clínico	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
Óbito	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não
Comorbidade	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

* F = Feminino; M = Masculino