



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL

LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NÓBREGA

**PERFIL METABONÔMICO DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER  
DE MAMA E PERIODONTITE**

RECIFE  
2025

LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NÓBREGA

**PERFIL METABONÔMICO DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER  
DE MAMA E PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Saúde Translacional. Área de concentração: Saúde Humana e Tecnologias Integrativas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

RECIFE  
2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Nóbrega, Larissa Giovanna Viana Trindade Zimmerle da.  
Perfil metabonômico de pacientes diagnosticadas com câncer de mama e periodontite / Larissa Giovanna Viana Trindade Zimmerle da Nóbrega. - Recife, 2025.  
131f.: il.

Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Programa de Pós-graduação em Saúde Translacional, 2025.

Orientação: Ricardo Oliveira da Silva.

1. Periodontite; 2. Câncer de mama; 3. Metabonômica. I. Silva, Ricardo Oliveira da. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NÓBREGA

**PERFIL METABONÔMICO DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER  
DE MAMA E PERIODONTITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Saúde Translacional. Área de concentração: Saúde Humana e Tecnologias Integrativas.

Aprovada em: 25/07/2025

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Niedje Siqueira de Lima (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Ronaldo Dionisio da Silva (Examinador Externo)  
Instituto Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à comunidade científica e a todas as mulheres que enfrentam a difícil jornada contra o câncer.

Em especial, dedico à paciente que, com generosidade, contribuiu para esta pesquisa, mas infelizmente não pôde testemunhar os frutos de sua participação.

## AGRADECIMENTOS

Como na vida, a pesquisa é feita por várias pessoas, que muitas vezes não são lembradas, mas sem as quais não poderíamos chegar aonde estamos. Nesta sessão, todos que estiveram nos bastidores deste trabalho podem ser reconhecidos. Dessa forma, gostaria de citar todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste estudo. Desde o início, encontrei vários desafios na minha pesquisa, mas as pessoas dispostas a ajudar superaram esses obstáculos, e aqui estamos.

Gostaria de iniciar agradecendo a todas as participantes da pesquisa! Obrigada por confiarem em mim. Oro todos os dias pela cura de cada uma de vocês.

À minha família, especialmente à minha avó Albani, que é a pessoa central na nossa família e sempre orientou nossos passos. Aos meus pais, Sérgio e Carmem, por sempre me apoarem e me lembrarem da importância do estudo na vida das pessoas. Sem vocês, eu não seria quem sou, nem estaria aqui hoje. À minha irmã Natália, que sempre acredita em mim e que, hoje, também segue seus próprios passos na pesquisa científica.

Ao meu marido, Ricardo, a quem devo muito mais do que eu possa imaginar. Obrigada por me apoiar em todos os momentos, por me dar a oportunidade de me dedicar ao mestrado e por acreditar em mim quando eu mesma já não consigo.

À minha querida amiga e maior facilitadora, Luana. O que seria desta pesquisa sem você? Você foi meu caminho, minha guia e meu anjo da guarda. Que Deus te ilumine assim como você ilumina a vida das pessoas.

Ao meu amigo, Leonardo, por todas as palavras de carinho, pelo apoio constante e por ajudar a cuidar da minha avó. Você é uma das pessoas mais incríveis que já conheci.

Agradeço, de forma especial, aos chefes do serviço de Oncologia do HC, Dr. Luiz José Batista e Dra. Inacelli Queiroz, pela gentileza em conceder o acesso aos serviços necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço, também, ao Prof. Dr. Luiz Alcino Gueiros, chefe do serviço de Cabeça e Pescoço do HC, pela disponibilidade em ceder o espaço utilizado durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À equipe do laboratório do HC, que não mediu esforços para me ajudar. Vocês são uma equipe ímpar! Obrigada por me acolherem com tanto carinho.

As secretárias do PPGST, Rosane e Jullyanna, por sempre fazerem o possível e o impossível por mim.

À Antônia, Estefane e Chaianne, obrigada por me apoiarem, por estarem ao meu lado nessa empreitada e por me ajudarem a navegar pelos mares da química analítica.

À Prof. Dr. Mariana Fogacci, por me ajudar com meu projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo, por me apoiar na pesquisa, por me ensinar pacientemente sobre química e por sempre ser tão cuidadoso com seus orientandos.

O mestrado foi um desafio, e tudo parecia conspirar para que a pesquisa não avançasse. Mas no caminho eu tinha vocês ao meu lado. Ninguém chega a lugar algum sozinho.

Obrigada, Deus, por colocar pessoas incríveis na minha vida. Só me resta agradecer.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

## RESUMO

A metabonômica é a área do conhecimento que busca identificar padrões no perfil de metabólitos endógenos de um dado biofluído e associar com o status bioquímico da amostra. É uma abordagem empregada para auxiliar o diagnóstico e/ou prognóstico em diferentes quadros clínicos. Embora diversos estudos sugiram uma associação entre a periodontite e o câncer de mama, os mecanismos biológicos que sustentam essa relação ainda não estão plenamente elucidados. O presente estudo teve como objetivo discriminar, por meio de abordagem metabonômica, os perfis metabólicos de pacientes com câncer de mama e periodontite daquelas com câncer de mama sem periodontite. Realizou-se um estudo observacional, descritivo e transversal, com amostra de conveniência não probabilística. O estudo foi conduzido no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE, entre julho e dezembro de 2024. Foram incluídas mulheres diagnosticadas com câncer de mama, distribuídas em dois grupos: com periodontite e sem periodontite. No total, 27 pacientes foram inicialmente convidadas a participar da pesquisa. Contudo, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, além de recusas espontâneas, apenas 12 pacientes foram consideradas elegíveis e aceitaram participar do estudo, compondo a amostra final, que foram submetidas ao exame clínico periodontal completo bem como forneceram amostra de sangue venoso periférico para análise por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ . Os dados espectrais foram utilizados como entrada dos estudos metabonômicos. A análise exploratória contemplou análise de componentes principais (PCA) e *heatmap* – mapa de calor com agrupamento hierárquico. O *heatmap* apontou um aumento nas concentrações de metabólitos como 4-hidroxiprolina, 2'-desoxiguanosina, L-isoleucina, L-lisina, L-tirosina e L-valina nas pacientes com periodontite associada ao câncer de mama. Os resultados observados indicam que foi possível discriminar as amostras em função do diagnóstico de periodontite e que as alterações observadas nos perfis metabólicos do soro dessas voluntárias estão associadas à modulação de múltiplas vias biológicas, com destaque para o metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada, metabolismo do colágeno e estresse oxidativo. Este estudo é pioneiro ao aplicar a estratégia metabonômica para investigar as interações metabólicas entre periodontite e câncer de mama.

**Palavras-chave:** Metabolômica, Rotas metabólicas, Espectroscopia de RMN; PCA; Heatmap.

## ABSTRACT

Metabolomics is the field of study that aims to identify patterns in the profile of endogenous metabolites in a given biofluid and associate them with the biochemical status of the sample. It is an approach used to support diagnosis and/or prognosis in various clinical conditions. Although several studies suggest an association between periodontitis and breast cancer, the biological mechanisms underlying this relationship are not yet fully understood. The present study aimed to discriminate, through a metabolomics approach, the metabolic profiles of patients with breast cancer and periodontitis from those with breast cancer without periodontitis. An observational, descriptive, cross-sectional study was conducted using a non-probabilistic convenience sample. The study was carried out at the Oncology Service of HC/EBSERH/UFPE between July and December 2024. Women diagnosed with breast cancer were included and distributed into two groups: with periodontitis and without periodontitis. A total of 27 patients were initially invited to participate. However, after applying inclusion and exclusion criteria, as well as accounting for spontaneous refusals, only 12 patients were considered eligible and consented to participate, forming the final sample. These participants underwent a full periodontal clinical examination and provided peripheral venous blood samples for analysis by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. Spectral data were used as input for the metabolomics studies. Exploratory analysis included principal component analysis (PCA) and a heatmap with hierarchical clustering. The heatmap indicated increased concentrations of metabolites such as 4-hydroxyproline, 2'-deoxyguanosine, L-isoleucine, L-lysine, L-tyrosine, and L-valine in patients with periodontitis associated with breast cancer. The observed results indicate that it was possible to discriminate samples based on periodontitis diagnosis, and that the alterations observed in the serum metabolic profiles of these volunteers are associated with modulation of multiple biological pathways, notably branched-chain amino acid metabolism, collagen metabolism, and oxidative stress. This study is pioneering in applying a metabolomics strategy to investigate metabolic interactions between periodontitis and breast cancer.

**Keywords:** Metabolomics; Metabolic pathways; NMR spectroscopy; Principal Component Analysis; Heatmap.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Processo de formação do biofilme dentário .....	17
Figura 2 –	Transição do periodonto saudável para a periodontite .....	18
Figura 3 –	Disseminação hematogênica das bactérias para a corrente sanguínea através do epitélio ulcerado da bolsa periodontal .....	21
Figura 4 –	Microambiente tumoral .....	23
Figura 5 –	Anatomia mamária .....	24
Figura 6 –	Representação da diferença entre a impressão digital metabólica e da pegada metabólica .....	28
Figura 7 –	Esquema de um espectrômetro de RMN .....	31
Figura 8 –	Dendrograma que ilustra a organização hierárquica dos agrupamentos gerados pela análise de cluster .....	34
Figura 9 –	Gráfico de escores da Análise de Componentes Principais, usando duas PCs .....	35
Figura 10 –	Dendrograma representando a similaridade entre os elementos da amostra .....	36
Figura 11 –	Dendrograma associado ao mapa de calor, ilustrando a comparação entre controles saudáveis e pacientes com câncer de mama com base nas intensidades normalizadas de sete metabólitos .....	37
Figura 12 –	Principais etapas do desenvolvimento de um estudo metabonômico .....	38
Figura 13 –	Espectros típicos de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) de amostras de soro obtidas de indivíduos com periodontite e sem periodontite .....	56
Figura 14 –	Gráficos de escores da PCA usando dados espectrais de RMN de $^1\text{H}$ do soro das voluntárias .....	57
Figura 15 –	Gráfico de escores da PCA – PC1 <i>versus</i> PC2 .....	58
Figura 16 –	Gráficos de escores e de pesos (loadings) - Biplot da PCA .....	59
Figura 17 –	<i>Heatmap</i> com os dados espectrais deste estudo .....	62

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 –	Classificação da periodontite em função da severidade, complexidade e extensão da condição periodontal .....	19
Quadro 2 –	Grau de periodontite em função da progressão da condição periodontal ..	20
Quadro 3 –	Estadiamento pelo sistema TNM .....	25

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 –	Dados clínicos e sociodemográficos das voluntárias .....	54
Tabela 2 –	Diagnóstico do câncer de mama .....	55
Tabela 3 –	Diagnóstico da periodontite .....	55
Tabela 4 –	Identificação dos principais metabólitos discriminantes entre os grupos estudados, com seus respectivos deslocamentos químicos .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<sup>1</sup> H	Hidrogênio-1
ATP	Adenosina trifosfato
BCAAs	Aminoácidos de cadeia ramificada
BRCA1	Gene do câncer de mama 1
BRCA2	Gene do câncer de mama 2
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DQF	Departamento de Química Fundamental
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
EM ou MS	Espectrometria de massas
ER	Receptor de estrogênio
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Fap2	<i>Fusobacterium</i> adhesin protein 2
Gal-GalNAc	Galactose-N-acetylgalactosamina
GC	Cromatografia em fase gasosa
GUS	β-glucuronidase
HC	Hospital das Clínicas
HCA	Análise hierárquica de cluster
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-17	Interleucina-17

IL-6	Interleucina-6
JCE	Junção cemento-esmalte
LC	Cromatografia em fase líquida
L-DOPA	3,4-dihydroxy-L-fenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase da matriz
MyD88	Resposta Primária de Diferenciação Mieloide 88
NDC	Núcleo da Documentação
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NIC	Nível de inserção clínica
OMS	Organização Mundial de Saúde
Ppm	Parte por milhão
PR	Receptor de progesterona
Presat	Pré-saturação
RF	Radiofrequência
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reativas de oxigênio
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR4	Receptor toll-like 4
TME	Microambiente tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TPS	Ácido timetilsilano propanóico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	16
2.1	Objetivo geral .....	16
2.2	Objetivos específicos .....	16
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	17
3.1	PERIODONTITE .....	17
3.1.1	Definição e epidemiologia.....	17
3.1.2	Fatores de Risco.....	17
3.1.3	Patogênese e progressão .....	17
3.1.4	Diagnóstico.....	20
3.1.5	Tratamento e gerenciamento.....	21
3.1.6	Prognóstico e impacto na saúde geral.....	22
3.2	CÂNCER DE MAMA.....	23
3.2.1	Definição e epidemiologia.....	23
3.2.2	Fatores de risco .....	23
3.2.3	Patogênese – o microambiente tumoral .....	24
3.2.4	Classificação histológica, molecular e estadiamento .....	25
3.2.5	Diagnóstico .....	27
3.2.6	Tratamento .....	27
3.3	METABONÔMICA .....	28
3.3.1	Definição .....	28
3.3.2	Principais aplicações.....	29
3.3.3	Principais plataformas analíticas .....	32
3.3.4	Principais formalismos de estatística multivariada .....	34
3.3.4.1	Métodos Não Supervisionados .....	34
3.3.4.1.1	Análise Hierárquica de Clusters .....	34
3.3.4.1.2	Análise de Componentes Principais .....	35
3.3.5	Visualização dos Dados .....	36
3.3.5.1	Dendrograma .....	37
3.3.5.2	Mapa de Calor .....	38
3.3.6	Abordagem Estruturada para Interpretação de Dados Metabonômicos .....	39
3.4	ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E CÂNCER DE MAMA .....	40
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	45
4.1	DESENHO DA PESQUISA.....	45
4.2	LOCAL DA PESQUISA .....	45

4.3	AMOSTRA DE PARTICIPANTES .....	45
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	46
4.4.1	Critérios de inclusão .....	46
4.4.2	Critérios de exclusão .....	46
4.5	RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES .....	46
4.6	INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS .....	46
4.7	PROCEDIMENTO PARA A COLETA DE DADOS .....	47
4.7.1	Exame periodontal .....	47
4.7.2	Coleta sanguínea para análise por RMN de <sup>1</sup> H .....	48
4.7.3	Separação do soro para análise por RMN de <sup>1</sup> H .....	49
4.7.4	Preparação das amostras de soro sanguíneo e análise por RMN de <sup>1</sup> H.....	49
4.7.5	Tratamento estatístico para análises multivariadas.....	50
4.7.6	Métodos Estatísticos para Controle de Variáveis de Confusão .....	51
<b>5</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
6.1	PERFIL CLÍNICO E SOCIODEMOGRÁFICO DAS PARTICIPANTES .....	53
6.2	Análise Quimiométrica.....	55
6.3	Identificação e Caracterização dos Metabólitos Diferenciais.....	63
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>		<b>70</b>
<b>ANEXO A .....</b>		<b>88</b>
<b>ANEXO B .....</b>		<b>90</b>
<b>ANEXO C .....</b>		<b>91</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>		<b>100</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>		<b>102</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>		<b>105</b>
<b>APÊNDICE D .....</b>		<b>106</b>
<b>APÊNDICE E .....</b>		<b>108</b>
<b>APÊNDICE F .....</b>		<b>109</b>
<b>APÊNDICE G .....</b>		<b>110</b>
<b>APÊNDICE H .....</b>		<b>112</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer representa um desafio global, não apenas por sua elevada mortalidade, mas também pelos impactos sociais, emocionais e econômicos que impõe a indivíduos, famílias e sistemas de saúde. Estima-se que aproximadamente uma em cada quatro mortes por doenças não transmissíveis no mundo esteja associada a algum tipo de câncer (BRAY *et al.*, 2024). Em 2022, o câncer de mama feminino foi o segundo tipo de câncer com mais mortes no mundo, ficando atrás apenas do câncer de pulmão (BRAY *et al.*, 2024). Apesar dos avanços nas pesquisas sobre o câncer de mama, ainda há lacunas importantes no entendimento dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença, uma vez que os riscos já identificados não explicam completamente sua ocorrência (ÁLVAREZ-MERCADO *et al.*, 2023).

Neste cenário, tornou-se relevante explorar hipóteses que conectam o câncer de mama a outros fatores biológicos menos evidentes. Um dos focos emergentes é a possível relação entre a saúde bucal e o câncer, especialmente no que diz respeito à periodontite, uma doença inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte dos dentes (FENG *et al.*, 2022; HAJISHENGALLIS, 2015; PAPAPANOU *et al.*, 2018). Essa condição tem sido apontada como potencial fator de risco para diferentes tipos de câncer (BAIMA *et al.*, 2023), e sua relevância para o câncer de mama tem ganhado destaque à medida que novas evidências apontam conexões biológicas entre a disbiose microbiana oral e o desenvolvimento tumoral (HIEKEN *et al.*, 2016; NEJMAN *et al.*, 2020; PARHI *et al.*, 2020).

Estudos mais recentes sugerem que certos patógenos orais, como *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), podem atuar diretamente sobre o microambiente tumoral ao promover inflamação crônica, estresse oxidativo e danos ao DNA, favorecendo o crescimento e a disseminação das células cancerígenas (FUJIWARA *et al.*, 2020; HOARE *et al.*, 2019). Corroborando com essa hipótese, Gaba, González e Martínez (2022) demonstraram um aumento de 78% no risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama em pacientes com altos níveis de *F. nucleatum* associados à periodontite.

Além disso, dados experimentais mostram que a colonização de tumores mamários por *F. nucleatum* pode acelerar a progressão tumoral e facilitar a metástase, possivelmente por inibir a resposta imune mediada por células T no microambiente do câncer (PARHI *et al.*, 2020). De maneira semelhante, LI *et al.* (2023) identificaram uma associação estatisticamente significativa entre os níveis dessa bactéria, o tamanho do tumor e a presença de metástases. Essa relação é particularmente preocupante, considerando que a metástase é responsável por

mais de 90% das mortes associadas ao câncer de mama (ALON-MAIMON; MANDELBOIM; BACHRACH, 2022).

Apesar das diversas hipóteses levantadas sobre vias de interação entre a periodontite e o câncer de mama, muitos dos caminhos moleculares propostos ainda não foram confirmados (CHENG *et al.*, 2020; GUO; YU; HUANG, 2024; SHI *et al.*, 2018; VAN DER MERWE *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2023). Isso se deve, em parte, à complexidade das duas condições e à influência de fatores genéticos, ambientais e imunológicos que modulam essa relação (AZEVEDO; PINA-VAZ; BALTAZAR, 2020). Diante dessa dificuldade, torna-se necessário recorrer a abordagens capazes de capturar alterações bioquímicas sistêmicas e fornecer uma visão integrada dos processos fisiopatológicos envolvidos.

A análise do metaboloma permite a caracterização abrangente e dinâmica dos metabólitos presentes em sistemas biológicos, refletindo diretamente o estado metabólico atual do organismo (WISHART, 2019). Essa abordagem tem se mostrado essencial para identificar alterações bioquímicas associadas a processos patológicos, contribuindo para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia de diversas doenças (JAYARAMAN *et al.*, 2014).

A partir disso, surge o interesse em utilizar a abordagem metabonômica, uma vertente da química analítica voltada para a identificação de metabólitos, como ferramenta para investigar essa interface entre a periodontite e o câncer de mama. Essa estratégia tem se mostrado eficaz na diferenciação entre populações com distintos perfis metabólicos (CASTELLI *et al.*, 2022; MAMAS *et al.*, 2011) e permite rastrear as interações entre o organismo e seu ambiente, oferecendo um olhar mais integrativo sobre processos de adoecimento (CASTELLI *et al.*, 2022).

Com isso, torna-se possível não apenas aprofundar o entendimento dos mecanismos biológicos subjacentes à relação entre essas doenças, mas também abrir caminho para o desenvolvimento de estratégias de prevenção do câncer de mama que considerem a saúde bucal como componente relevante da saúde sistêmica (ISSRANI *et al.*, 2021; NWIZU; WACTAWSKI-WENDE; GENCO, 2020). Nesse contexto, a manutenção da integridade dos tecidos periodontais poderia atuar como uma medida complementar na melhoria dos desfechos clínicos e na formulação de estratégias preventivas (GABA; GONZÁLEZ; MARTÍNEZ, 2022; SHAO *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2018).

Até o momento, não foram encontrados estudos que investiguem a relação entre o câncer de mama e a periodontite sob a perspectiva metabonômica. Assim, a realização desse estudo poderá ajudar a entender se existe um perfil de metabólitos endógenos que possa ser atribuído à presença simultânea de periodontite e câncer de mama em mulheres. Para tanto, este estudo

visa discriminar amostras de pacientes com periodontite e câncer de mama daquelas com câncer de mama isoladamente, por meio de uma abordagem metabonômica.

## **2     OBJETIVOS**

### **2.1   Objetivo geral**

Discriminar amostras de pacientes acometidas por periodontite e câncer de mama daquelas acometidas por câncer de mama sem periodontite, através de uma abordagem metabonômica.

### **2.2   Objetivos específicos**

- ✓ Identificar a prevalência da periodontite nas pacientes com câncer de mama atendidas no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE;
- ✓ Descrever os diagnósticos periodontais apresentados e correlacionar com a classificação do câncer de mama (tipo histológico, grau, tipo molecular e estadiamento);
- ✓ Identificar os metabólitos endógenos responsáveis pela discriminação dos grupos estudados.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PERIODONTITE

##### 3.1.1 Definição e epidemiologia

A periodontite é uma condição crônica, inflamatória, multifatorial, associada ao biofilme disbiótico e mediada pela resposta imune do hospedeiro, que compromete a integridade dos tecidos de suporte dos dentes (FENG *et al.*, 2022; HAJISHENGALLIS, 2015; PAPAPANOU *et al.*, 2018). Sua prevalência global varia entre 45% e 50%, com a forma mais grave afetando aproximadamente 11,2% da população, o que a torna a sexta doença mais comum no mundo (GENCO; SANZ, 2020; KASSEBAUM *et al.*, 2014). No Brasil, a situação é ainda mais preocupante, pois o país está entre os seis com as maiores taxas de periodontite grave, apresentando uma prevalência que varia entre 18,5% e 19,4% em adultos e idosos, significativamente superior à média mundial (BRASIL, 2018; KASSEBAUM *et al.*, 2014; NASCIMENTO; ALVES-COSTA; ROMANDINI, 2024). Esse cenário pode estar relacionado a fatores socioeconômicos e demográficos, como desigualdade de renda e baixa cobertura da Estratégia Saúde da Família (VETTORE; MARQUES; PERES, 2013). Além disso, fatores individuais como tabagismo e baixa escolaridade também estão associados à maior prevalência da doença periodontal na sua forma mais grave (VETTORE; MARQUES; PERES, 2013).

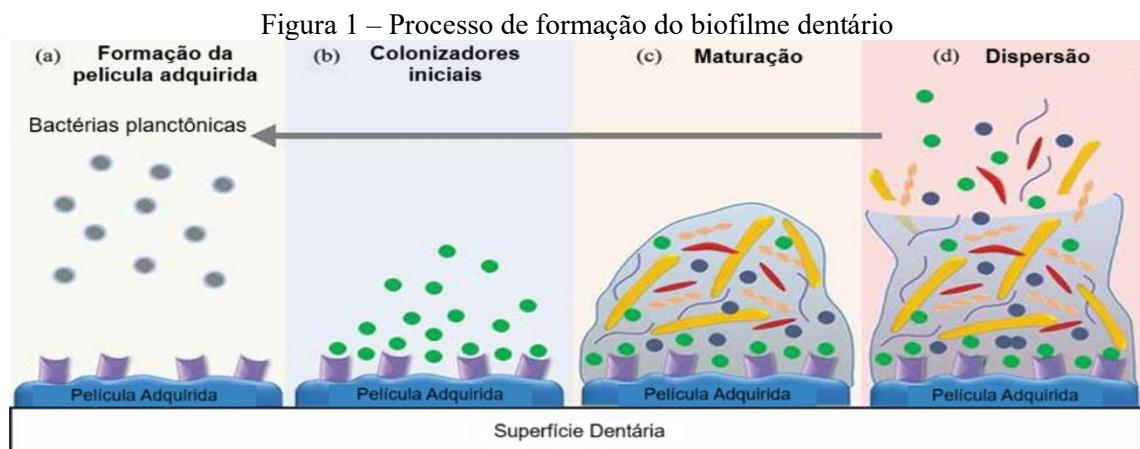
##### 3.1.2 Fatores de Risco

A suscetibilidade à doença periodontal, como condição multicausal, também estará associada a fatores de risco ambientais e comportamentais, como hábito de fumar, má higiene oral, estresse e deficiências nutricionais de cálcio e vitamina D (GENCO; BORGNAKKE, 2013; LOOS; VAN DYKE, 2020). Além disso, comorbidades como diabetes – fora da meta glicêmica – e obesidade também são fatores de risco associados a doença (GENCO; BORGNAKKE, 2013; LOOS; VAN DYKE, 2020). Fatores locais, como apinhamentos dentários, aparelhos ortodônticos e restaurações com sobrecontorno, dificultam a higienização e favorecem o acúmulo de biofilme (GENCO; BORGNAKKE, 2013; LOOS; VAN DYKE, 2020).

##### 3.1.3 Patogênese e progressão

O biofilme disbiótico, agente precursor da periodontite, é composto por microrganismos agrupados em uma matriz complexa (ABDULKAREEM *et al.*, 2023). O processo de formação

do biofilme inicia com a deposição da película adquirida, uma camada de macromoléculas que se adere à superfície dentária, criando uma base para a colonização bacteriana (ABDULKAREEM *et al.*, 2023). Em seguida, começa a colonização por bactérias livres na cavidade oral, como *Streptococcus spp* e *Actinomyces spp*, espécies-chave em biofilmes orais, que, por meio de suas adesinas, se ligam aos receptores da película adquirida, facilitando a colonização inicial (JAKUBOVICS *et al.*, 2021). A maturação do biofilme da placa dentária começa com a proliferação dos colonizadores iniciais, produção de matriz extracelular e agregação de colonizadores intermediários e tardios, como a *F. nucleatum* e a *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), bactérias anaeróbias gram-negativas que residem na cavidade oral e estão associadas ao desenvolvimento da doença periodontal (ABDULKAREEM *et al.*, 2023). O estágio final do desenvolvimento do biofilme envolve o desprendimento das células da colônia e sua dispersão, o que é importante para a propagação e sobrevivência das bactérias (KAPLAN, 2010). (Figura 1)

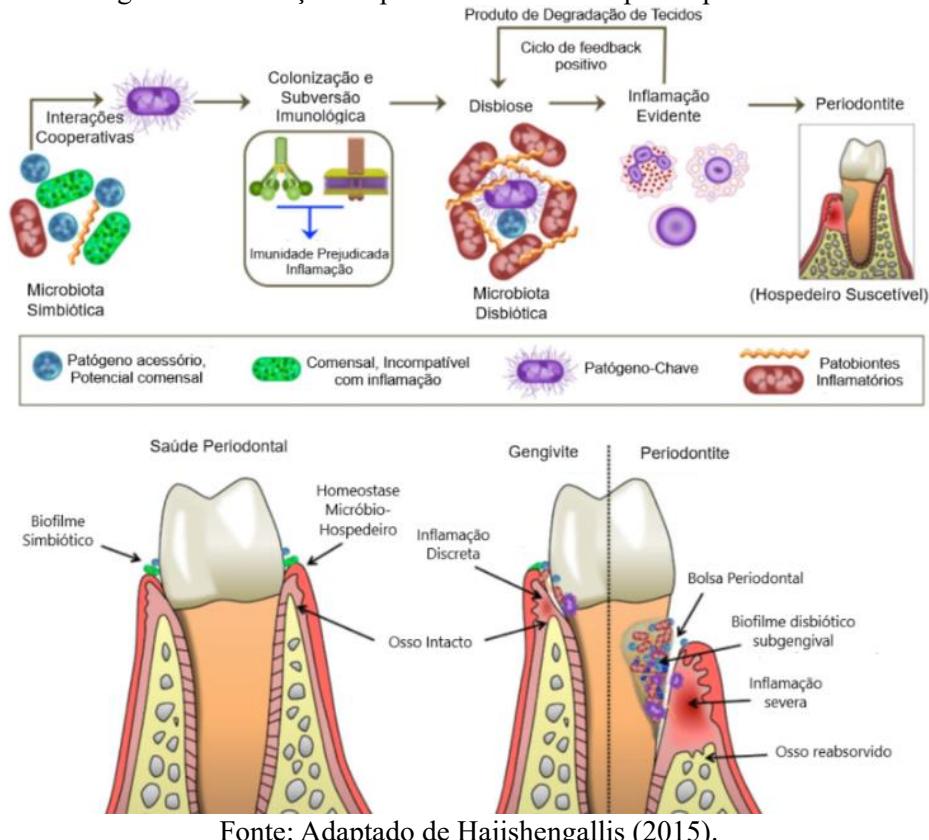


Fonte: Adaptado de Abdulkareem *et al.* (2023).

Embora o crescimento de biofilme, especialmente na região subgengival, seja essencial para o desenvolvimento da periodontite, ele não é suficiente, por si só, para a ocorrência da doença (GENCO; BORGNAKKE, 2013; HAJISHENGALLIS, 2015). A transição do periodonto saudável para a periodontite envolve uma mudança no microbioma, na qual bactérias simbióticas são substituídas por patobiontes (bactérias gram-negativas, com parede celular composta principalmente por lipopolissacarídeo [LPS], uma endotoxina que desempenha um importante papel na inflamação local e sistêmica, ativando a imunidade inata e adaptativa) (PUSSINEN *et al.*, 2022), promovendo a disbiose associada à periodontite (ABDULKAREEM *et al.*, 2023; CURTIS; DIAZ; VAN DYKE, 2020). No entanto, para que a doença se desenvolva, é necessária a interação entre o biofilme disbiótico e uma resposta inflamatória desregulada, que resultará na degradação do periodonto e na manifestação da

periodontite (BALTA; LOOS; NICU, 2017; LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018). (Figura 2)

Figura 2 – Transição do periodonto saudável para a periodontite



Fonte: Adaptado de Hajishengallis (2015).

Em um periodonto saudável, há equilíbrio entre a resposta imunológica leve e os desafios locais, como a microbiota comensal, e isso está associado a presença de um número adequado de neutrófilos e células imunes residentes no sulco gengival, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (HAJISHENGALLIS.; KOROSTOFF, 2017; PAN; WANG; CHEN, 2019). A colonização por bactérias patogênicas pode perturbar esse equilíbrio, desencadeando uma resposta inflamatória exacerbada, que acarreta a amplificação da cascata de citocinas pró inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$  (PAN; WANG; CHEN, 2019). Células T auxiliares 17 (TH17), conhecidas por sua contribuição para a inflamação crônica em várias doenças autoimunes, produzirão a IL-17, que estimulará a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear- $\kappa$ B (RANKL), induzindo a formação de osteoclastos e promovendo a reabsorção óssea (COCHRAN, 2008; TSUKASAKI; TAKAYANAGI, 2019). Além disso, neutrófilos recrutados também induzem a degradação do tecido por meio da expressão de enzimas proteolíticas, como a metaloproteinases de matriz (MMPs), e espécies reativas de oxigênio (ROS), aumentando a inflamação e a destruição do tecido periodontal (ABDULKAREEM *et al.*, 2023).

### 3.1.4 Diagnóstico

A periodontite se caracteriza pela perda de suporte do tecido periodontal, evidenciada através da perda do nível de inserção clínica (NIC), perda óssea alveolar avaliada radiograficamente, presença de bolsas periodontais e sangramento gengival (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Clinicamente, a doença pode ser detectada com o auxílio de uma sonda periodontal, que mede a distância entre a junção cemento-esmalte (JCE) e o fundo da bolsa periodontal, o que define o NIC (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018). O diagnóstico da doença é estabelecido quando o NIC é  $\geq 3$  mm em dois ou mais dentes não adjacentes, ou quando o NIC  $\geq 3$  mm está associado a bolsas periodontais superiores a 3 mm em pelo menos dois dentes, sejam adjacentes ou não (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

Segundo a classificação de doenças e condições periodontais e peri-implantares apresentada no Workshop Mundial de 2017, a periodontite pode ser classificada com base em estágios e graus (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Os estágios avaliam a gravidade da doença, considerando a perda do NIC, perda óssea radiográfica e perda dentária, além da complexidade, extensão e distribuição da condição (Quadro 1) (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Por outro lado, os graus vão refletir as características biológicas da doença, como evidência ou risco de progressão rápida, resposta ao tratamento e impactos na saúde sistêmica (Quadro 2) (PAPAPANOU *et al.*, 2018).

Quadro 1 – Classificação da periodontite em função da severidade, complexidade e extensão da condição periodontal

Critérios		Estágio I	Estágio II	Estágio III	Estágio IV	
A	Perda de inserção no sítio interdental mais grave	1-2 mm	3-4 mm	$\geq 5$ mm	$\geq 5$ mm	
	Perda óssea radiográfica	Terço coronário da raiz (<15%)	Terço coronário da raiz (15%-33%)	Terço médio /apical da raiz Perda por periodontite $\leq 4$ dentes	Terço médio /apical da raiz Perda por periodontite $\geq 5$ dentes	
	Perda dental	Nenhuma perda por periodontite				
	Local	Profundidade de sondagem $\leq 4$ mm Maioria dos defeitos horizontais	Profundidade de sondagem $\leq 5$ mm Maioria dos defeitos horizontais	Profundidade de sondagem $\geq 6$ mm Perda óssea vertical $\geq 3$ mm Lesão de furca classe II / III Defeito de rebordo moderado	Disfunção mastigatória Trauma oclusal secundário Defeito de rebordo severo Colapso oclusal $< 20$ dentes	
B						
C			Localizado: <30% dos dentes Generalizado: $\geq 30\%$ dos dentes			
			Perfil incisivo/molar: apenas incisivos e primeiros molares			

Em A, B e C são avaliadas a severidade, a complexidade e extensão da condição periodontal, respectivamente.

Os critérios de complexidade dos estágios III e IV se somam aos observados no estágio anterior.

Fonte: Adaptado de Papapanou *et al.* (2018).

Quadro 2 – Grau de periodontite em função da progressão da condição periodontal

			Grau A: Progressão lenta	Grau B: Progressão moderada	Grau C: Progressão rápida
Critério primário	Evidencia direta de progressão	Perda óssea radiográfica ou perda de inserção	Sem evidência de perda de inserção	<2 mm em 5 anos	$\geq 2$ mm em 5 anos
		% perda óssea/idade	< 0,25	0,25 a 1,0	> 1,0
	Evidencia indireta de progressão	Fenótipo	Muito biofilme para pequena destruição	Destrução compatível com o biofilme	Destrução excessiva para o biofilme, sugere progressão rápida
Modificadores	Fatores de risco	Tabagismo	Não-fumante	Fumante < 10 cigarros/dia	Fumante $\geq 10$ cigarros/dia
		Diabetes	Normoglicêmico / sem diagnóstico de diabetes	HbA1c < 7,0% em paciente com diabetes	HbA1c $\geq 7,0\%$ em paciente com diabetes
Risco de impacto Sistêmico	Inflamação	Alta sensibilidade da PCR	<1 mg/L	1 a 3 mg/L	> 3 mg/L

Fonte: Adaptado de Papapanou *et al.* (2018).

### 3.1.5 Tratamento e gerenciamento

À luz da vigente classificação de doenças e condições periodontais e peri-implantares (PAPAPANOU *et al.*, 2018; TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018), Sanz *et al.* (2020) publicaram novas diretrizes de prática clínica para o tratamento da periodontite nos estágios I a III. A diretriz estabelece que o tratamento da periodontite adota uma abordagem terapêutica dividida em etapas. Além disso, os autores reiteram a necessidade da criação de um plano de cuidados personalizado, que pode ser ajustado conforme necessário, durante a intervenção (SANZ *et al.*, 2020).

Ficou convencionado, assim, que a primeira etapa do tratamento consiste em oferecer ao paciente informações sobre a doença, com o objetivo de incentivar mudanças comportamentais para a melhora da higiene oral, controle dos fatores de risco, realização da raspagem de placa supragengival e remoção de fatores de retenção (SANZ *et al.*, 2020). A segunda etapa visa a eliminação do biofilme e do cálculo subgengival, para que a superfície radicular fique lisa e sem cemento amolecido, e a implementação de agentes antimicrobianos adjuvantes sistemicamente, como a amoxicilina combinada ao metronidazol (TEUGHELS *et al.*, 2020), ou localmente, como produtos à base de doxiciclina, tetraciclina e clorexidina (HERRERA *et al.*, 2020; SANZ *et al.*, 2020). Caso a segunda etapa não seja suficiente, uma terceira etapa envolverá procedimentos cirúrgicos e instrumentação subgengival adicional para tratar áreas

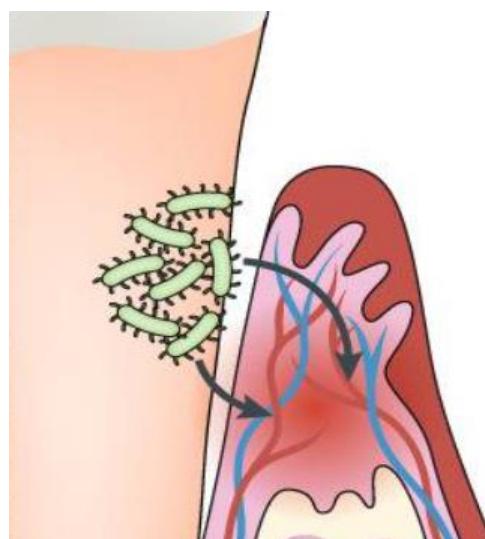
que não responderam inicialmente (SANZ *et al.*, 2020). Superadas as etapas anteriores, o tratamento periodontal de suporte será necessário para que se mantenha a saúde a longo prazo.

### 3.1.6 Prognóstico e impacto na saúde geral

Caso a periodontite não seja tratada, levará à destruição progressiva do periodonto e eventual perda dentária, comprometendo a mastigação, nutrição, fala e estética, afetando, assim, a qualidade de vida (HAJISHENGALLIS, 2022). Ademais, desde a década de 1990, diversos estudos epidemiológicos, experimentais e intervencionistas, têm demonstrado o impacto da periodontite na saúde sistêmica (GENCO; SANZ, 2020; OFFENBACHER *et al.*, 1996). A literatura aponta que a disbiose microbiana, presente nos casos de periodontite, aumenta o risco do desenvolvimento de condições como diabetes (SANZ *et al.*, 2018; BAEZA *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020), doenças cardiovasculares (HOPKINS *et al.*, 2024; ORLANDI; GRAZIANI; D'AIUTO, 2020; SANZ *et al.*, 2020), câncer oral e colorretal, infecção do trato respiratório, Alzheimer e outras (BAIMA *et al.*, 2023; BUI *et al.*, 2019; CORBELLÀ *et al.*, 2018).

A interação entre periodontite e doenças sistêmicas acontece principalmente através do epitélio ulcerado da bolsa periodontal, que apresenta uma superfície média de 8 a 20 cm<sup>2</sup> (HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS, 2021) e permite que bactérias orais e seus metabólitos tóxicos, como LPS, entrem na corrente sanguínea e afetem locais distantes do corpo, causando bacteremia, inflamação e estresse oxidativo (BECK *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2022; HAJISHENGALLIS, 2022; SFREDDO *et al.*, 2017). (Figura 3)

Figura 3 – Disseminação hematogênica das bactérias para a corrente sanguínea através do epitélio ulcerado da bolsa periodontal



Fonte: Adaptado de Hajishengallis; Chavakis (2021).

## 3.2 CÂNCER DE MAMA

### 3.2.1 Definição e epidemiologia

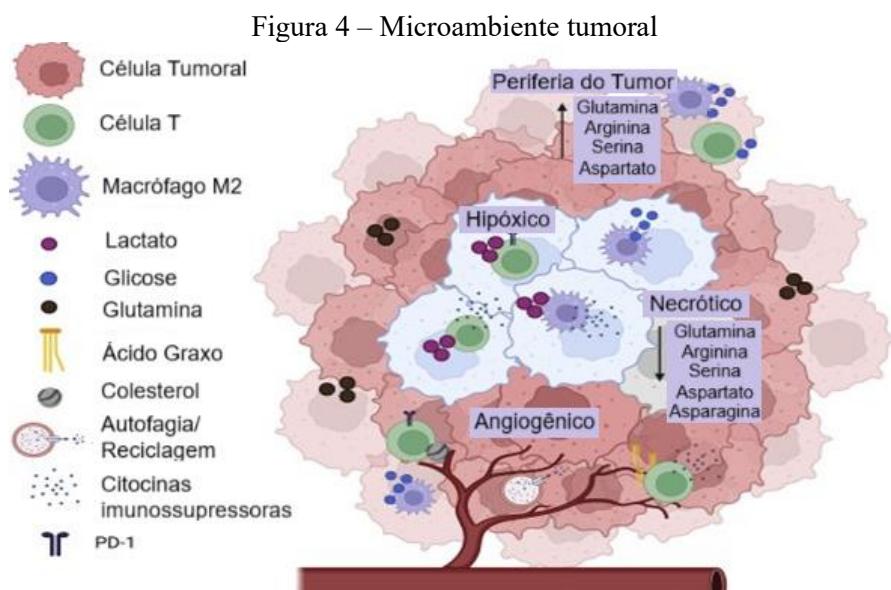
O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação descontrolada de células transformadas, cujo crescimento é excessivo e desorganizado, sem coordenação com os tecidos normais, e que persiste mesmo após a remoção da causa que o originou (BROWN *et al.*, 2023; KUMAR; ABBAS; ASTER, 2023). Além disso, o câncer pode invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres brasileiras, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste (INCA, 2022). No estado de Pernambuco, foram estimados 2.880 casos novos de câncer de mama feminino para o triênio 2023-2025 (INCA, 2022). Apesar da melhora das taxas de sobrevivência, a prevalência do câncer de mama continua crescendo globalmente (NOLAN; LINDEMAN; VISVADER, 2023). Mulheres sobreviventes de câncer de mama frequentemente enfrentam dificuldades para retomar atividades devido a uma combinação de desafios físicos, emocionais e sociais, impactando negativamente seus relacionamentos, carreira e bem-estar geral (KEESING; ROSENWAX; MCNAMARA, 2018).

### 3.2.2 Fatores de risco

Fatores de risco não modificáveis associados ao aumento do risco de câncer de mama incluem o sexo feminino, devido à maior exposição hormonal, especialmente aos estrogênios, que são conhecidos por estimular as células mamárias (KEY *et al.* 2013), e a idade avançada, com a maioria dos casos ocorrendo em mulheres com mais de 50 anos (MCGUIRE *et al.*, 2015). Além desses, podemos destacar que a história familiar de câncer de mama, mutação nos genes BRCA1 e BRCA2, história reprodutiva – menarca precoce, antes dos 12 anos; menopausa tardia, após os 55 anos; e nuliparidade estão associados a um risco aumentado para o câncer de mama –, densidade do tecido mamário e tratamento prévio com radioterapia na região torácica também podem ser determinantes não modificáveis significativos (ŁUKASIEWICZ *et al.*, 2021). No que diz respeito aos fatores modificáveis, destacam-se o uso de terapia de reposição hormonal por longos períodos, dieta rica em alimentos processados e gorduras saturadas, consumo excessivo de álcool e outros (ŁUKASIEWICZ *et al.*, 2021).

### 3.2.3 Patogênese – o microambiente tumoral

A evolução do tumor é moldada pelo ambiente à sua volta, que, no caso dos tumores sólidos, é composto por células malignas, células não cancerosas – como fibroblastos e células endoteliais –, células imunes, componentes da matriz extracelular e vasos sanguíneos (HIRATA; SAHAI, 2017; CIERNIKOVA *et al.*, 2022). Esse conjunto de elementos, conhecido como microambiente tumoral (TME, do inglês *Tumor MicroEnvironment*), desempenha um papel relevante na tumorigênese e na progressão do câncer (HANAHAN, 2022). Além disso, o TME sofre influência direta da baixa disponibilidade de oxigênio, que resulta em hipoxia, favorecendo modificações na vasculatura, alterações no metabolismo e um perfil imunossupressor (ANDERSON; SIMON, 2020; LIAO *et al.*, 2023). (Figura 4)



Trabalhos mais recentes revelam que o TME é composto, ainda, pela microbiota tumoral (CIERNIKOVA *et al.*, 2022), uma população de bactérias presente no tumor que cumpre uma função determinante na regulação do microambiente (LITTLE *et al.*, 2023). Quando essa comunidade microbiana sofre alterações ocorre uma disbiose, que pode causar efeitos prejudiciais ao corpo (HANAHAN, 2022), como a ocorrência aleatória de erros na replicação do DNA, resultando em diversos tipos de mutações (ÁLVAREZ-MERCADO *et al.*, 2023). A microbiota exercerá influência sobre a atividade das células tumorais através da regulação de vias oncogênicas, modulação da resposta imune e interação com metabólitos derivados da microbiota (CIERNIKOVA *et al.*, 2022).

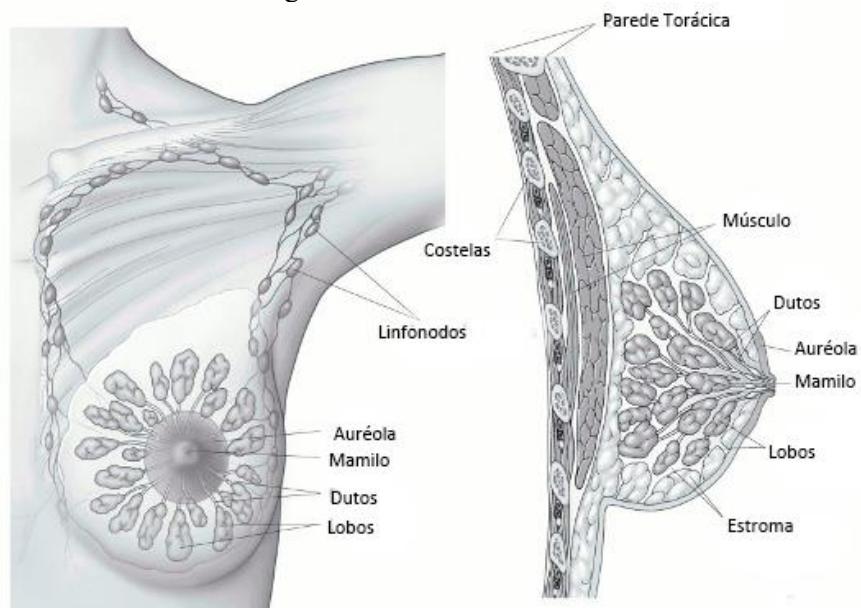
Nejman *et al.* (2020) relataram que a diversidade bacteriana encontrada nas amostras de tumores de mama foi maior do que a encontrada em amostras do tecido mamário de mulheres

saudáveis. Ademais, o estudo afirma que componentes bacterianos, como DNA, RNA e LPS, foram detectados nos tumores de mama (NEJMAN *et al.*, 2020; ÁLVAREZ-MERCADO *et al.*, 2023). Foi observado, ainda, que a *F. nucleatum* (bactéria proveniente da cavidade oral), detectada anteriormente nos tumores colorretais, também foi encontrada nos tumores de mama (NEJMAN *et al.*, 2020), sendo essa responsável pela liberação de espécies reativas de oxigênio e sulfeto de hidrogênio no ambiente extracelular (ÁLVAREZ-MERCADO *et al.*, 2023). Esses compostos podem penetrar nas células humanas, aumentando o ambiente oxidativo e contribuindo para a indução de mutações no DNA (ÁLVAREZ-MERCADO *et al.*, 2023). Além disso, um estudo realizado por Parhi *et al.* (2020) demonstrou que *F. nucleatum* coloniza preferencialmente a microbiota da mama.

### 3.2.4 Classificação histológica, molecular e estadiamento

O câncer de mama pode se originar em diferentes áreas da mama (Figura 5), incluindo ductos, lóbulos ou tecido intersticial entre eles (FENG *et al.*, 2018). Histologicamente, é classificado em duas categorias principais: carcinoma *in situ*, onde as células permanecem confinadas ao sistema ductal-lobular, e carcinoma invasivo, no qual as células se disseminam para além dessa estrutura (ARAÚJO *et al.*, 2017). A forma mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) (NOLAN; LINDEMAN; VISVADER, 2023).

Figura 5 – Anatomia mamária



Fonte: Oncoguia (2024).

Além disso, o câncer de mama pode ser classificado de acordo com o subtipo molecular, que analisa amostras de tecido para identificar marcadores específicos, como receptor de

estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) e o marcador de proliferação Ki67 (AL-THOUBAITY, 2020; NOLAN; LINDEMAN; VISVADER, 2023). Com base nesses marcadores, os tumores são classificados em subtipos moleculares, incluindo Luminal A (ER+, PR+, HER2–, baixo Ki67), Luminal B (ER+, PR±, HER2±, alto Ki67), HER2 superexpresso (ER–, PR–, HER2+), e triplo-negativo (ER–, PR–, HER2–) (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011; AL-THOUBAITY, 2020).

Além dos critérios mencionados, o câncer também pode ser classificado com base em sua extensão anatômica (T), comprometimento dos linfonodos regionais (N) e presença de metástases à distância (M), conforme o sistema de estadiamento TNM (AMIN *et al.*, 2017) (Tabela 3). A classificação do câncer em diferentes estágios baseia-se na constatação de que as taxas de sobrevida variam significativamente de acordo com a extensão da doença (HARBECK *et al.*, 2019). Pacientes com cânceres restritos ao órgão de origem apresentam taxas de sobrevivência mais favoráveis em comparação com aqueles nos quais a doença se dissemina para órgãos adjacentes ou regiões distantes (HARBECK *et al.*, 2019).

Quadro 3 – Estadiamento pelo sistema TNM

Estadiamento	T	N	M
Estágio 0	Tis*	N0	M0
Estágio IA	T1**	N0	M0
Estágio IB	T0	N1mi	M0
	T1**	N1mi	M0
Estágio IIA	T0	N1	M0
	T1**	N1	M0
	T2	N0	M0
Estágio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
Estágio IIIA	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
Estágio IIIB	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
Estágio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estágio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

\* Tumor *in situ*

\*\* T1 incluindo T1mi (microscópico)

Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual, 8 th edition, 2017.

### 3.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico do câncer de mama é fundamentado em uma abordagem tripartite que compreende a avaliação clínica, exames de imagem e biópsia (HARBECK *et al.*, 2019). A mamografia é um exame radiográfico amplamente empregado na triagem e no diagnóstico precoce, permitindo a identificação de anomalias mamárias em mulheres com 50 anos ou mais (NELSON *et al.*, 2016; BHUSHAN; GONSALVES; MENON, 2021). A ultrassonografia se destaca na avaliação de alterações mamárias, especialmente em mulheres com tecidos mamários densos, sendo amplamente utilizado como modalidade inicial em mulheres jovens, e para áreas suspeitas não visualizadas na mamografia (HARBECK *et al.*, 2019; BHUSHAN; GONSALVES; MENON, 2021). Além disso, é preferencialmente empregada para a biópsia percutânea guiada por imagem (HARBECK *et al.*, 2019).

Caso uma alteração com suspeita de malignidade seja identificada, a realização de uma biópsia é necessária para a obtenção de amostras de tecido, permitindo a confirmação histopatológica do diagnóstico e a caracterização do tipo de câncer (OBEAGU; OBEAGU, 2024). Com o câncer confirmado, as amostras patológicas devem ser submetidas a testes adicionais para a avaliação dos receptores hormonais, a fim de guiar o planejamento do tratamento (TRAYES; COKENAKES, 2021).

### 3.2.6 Tratamento

O tratamento do câncer de mama é baseado em duas abordagens principais: a terapia locoregional e a terapia sistêmica (HARBECK *et al.*, 2019). Essas abordagens são ajustadas de acordo com o estágio da doença e o subtipo molecular do tumor, o que orienta a escolha do tratamento (HARBECK *et al.*, 2019; TRAYES; COKENAKES, 2021). No estágio 0, caracterizado como carcinoma *in situ*, o tratamento geralmente envolve tumorectomia ou mastectomia com biópsia do linfonodo sentinel, sendo a radioterapia indicada apenas para casos de tumorectomia, com terapia endócrina prescrita por cinco anos, utilizando tamoxifeno para pacientes pré-menopausais e tamoxifeno ou inibidor de aromatase para pós-menopausais, enquanto imunoterapia e quimioterapia não são frequentemente empregadas (TRAYES; COKENAKES, 2021).

Em casos de câncer de mama precoce (estágio I, IIA e IIB [T2N1]), mulheres com tumores operáveis geralmente se submetem à cirurgia, e a maioria também requer terapia sistêmica, que pode ser administrada de forma neoadjuvante para tumores grandes ou adjuvante para diminuir o risco de recorrência, conforme indicado pelo resultado cirúrgico ou biomarcadores (HARBECK *et al.*, 2019). A terapia endócrina pode durar até 10 anos, variando conforme o

status hormonal, e a quimioterapia é considerada para câncer HER2-positivo, triplo-negativo ou positivo para receptor hormonal, com orientação de testes moleculares (TRAYES; COKENAKES, 2021).

O manejo do câncer de mama localmente avançado (estágios IIB [T3N0], IIIA, IIIB e IIIC) geralmente envolve uma abordagem combinada de cirurgia de tumorectomia ou mastectomia e dissecção dos linfonodos axilares, terapias sistêmicas e radioterapia seguem as diretrizes dos estágios anteriores (TRAYES; COKENAKES, 2021). Para o câncer de mama metastático (estágios IV), o tratamento visa principalmente a redução dos sintomas, aumento da sobrevida e manutenção da qualidade de vida (TRAYES; COKENAKES, 2021).

### 3.3 METABONÔMICA

#### 3.3.1 Definição

Metabólitos são espécies químicas que são produtos intermediários ou finais de processos celulares, resultantes da atividade de enzimas e proteínas (WORLEY; POWERS, 2013), e o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da) presentes em um sistema biológico é denominado metaboloma (CANUTO *et al.*, 2017). Alterações patológicas e fisiológicas associadas a doenças podem provocar variações nas concentrações de metabólitos e proteínas em fluidos e tecidos biológicos (EMWAS *et al.*, 2013). Nesse contexto, a metabonômica se define como uma abordagem que quantifica a resposta metabólica dinâmica e multiparamétrica dos sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999). Essa estratégia possibilita a análise de mudanças nos perfis de metabólitos nos biofluidos em resposta a diferentes tipos de agressão, facilitando a compreensão das interações metabólicas em condições de doença (ROBERTSON, 2005).

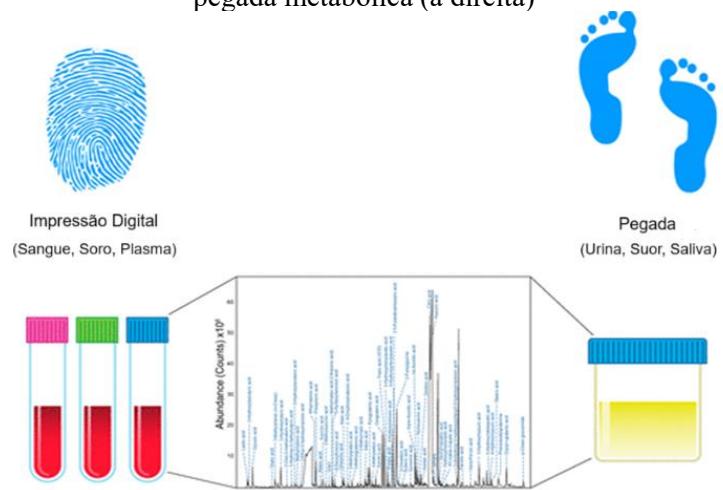
Embora os termos metabolômica e metabonômica sejam frequentemente utilizados como sinônimos, eles apresentam distinções conceituais importantes. De acordo com Dunn e Ellis (2005), a metabolômica visa à identificação e quantificação absoluta de todos os metabólitos presentes em uma amostra biológica. Em contraste, a metabonômica concentra-se na obtenção de uma “impressão digital metabólica” que reflita um determinado estado fisiológico ou patológico, sem requerer necessariamente a identificação ou quantificação individual dos metabólitos envolvidos (DUNN; ELLIS, 2005). Essa abordagem, portanto, adota uma perspectiva mais exploratória e comparativa, voltada à discriminação entre grupos experimentais com base em padrões metabólicos globais (DUNN; ELLIS, 2005).

### 3.3.2 Principais aplicações

Métodos que promovem uma análise abrangente de dados biológicos de alta dimensão são especialmente valiosos na identificação de padrões moleculares associados a estados fisiológicos complexos e inter-relacionados (ARAÚJO *et al.*, 2022). Quando o objetivo da pesquisa é identificar perfis metabólicos gerais e descobrir novos metabólitos relacionados a condições biológicas ou doenças, realiza-se uma análise qualitativa do metaboloma (CANUTO *et al.*, 2017). Esse modelo examina uma ampla variedade de metabólitos de diferentes classes químicas, caracterizando a metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*) (CANUTO *et al.*, 2017). Devido à sua sensibilidade, alto rendimento e requisitos mínimos de amostra, a metabolômica não direcionada é amplamente aplicável a diversos problemas biológicos (PATTI; YANES; SIUZDAK, 2012). Por sua vez, a metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*) concentra-se na análise quantitativa de metabólitos específicos, selecionados com base em suas classes químicas ou relevância em rotas metabólicas (CANUTO *et al.*, 2017).

Além disso, uma classificação rápida das amostras de acordo com sua origem ou importância biológica facilita a triagem de amostras e a identificação de padrões (FIEHN, 2001). O termo “impressão digital” metabólica (do inglês, *fingerprinting*) refere-se a um método de análise que permite examinar amostras de forma global e rápida (ELLIS *et al.*, 2007). Esse tipo de análise é projetado para classificar as amostras – focando em biofluidos essenciais para a função celular – e ajuda a identificar diferenças entre elas (ELLIS *et al.*, 2007; WISHART, 2019). Já o termo “pegada” metabólica (do inglês, *footprinting*) é uma análise dos (exo)metabólitos secretados ou excretados por um organismo, como ilustrado na Figura 6 (ELLIS *et al.*, 2007).

Figura 6 – Uma representação da diferença entre a impressão digital metabólica (à esquerda) e a pegada metabólica (à direita)



Fonte: Wishart (2019).

Dessa forma, metabonômica se destaca como uma das tecnologias ômicas mais poderosas, capaz de detectar mudanças complexas e essenciais para o organismo (PUTRI *et al.*, 2013). Tal abordagem permite identificar características que métodos tradicionais podem não captar, facilitando a descoberta de biomarcadores eficazes para diagnóstico e monitoramento de doenças (ARAÚJO *et al.*, 2022; PUTRI *et al.*, 2013). As alterações nos perfis metabólicos em fluidos e tecidos biológicos podem ocorrer antes do aparecimento de sintomas clínicos, tornando a metabonômica uma ferramenta útil para prognósticos e predição de resultados na área da saúde (AL-SULAITI *et al.*, 2023). A metabonômica clínica tem como objetivo avaliar e prever condições de saúde e doença por meio da análise de “assinaturas metabólicas” em amostras de soro, plasma, urina, saliva, líquido cefalorraquidiano e outros (CEGLAREK *et al.*, 2009; DALAMAGA, 2024). Essas assinaturas são moldadas não apenas pelo genoma do indivíduo, mas também por fatores epigenéticos resultantes de exposições ambientais, além de influências relacionadas à dieta e ao estilo de vida (CEGLAREK *et al.*, 2009).

A sensibilidade dos metabólitos a estímulos ambientais e a sinalização interna torna o metaboloma uma fonte relevante para avaliar o fenótipo de uma pessoa (WISHART, 2019). Essa abordagem, denominada “metabótipo”, permite uma leitura detalhada do estado metabólico (HOLMES; WILSON; NICHOLSON, 2008; WISHART, 2019). A capacidade de “ler” quimicamente as condições fisiológicas têm levado à crescente aplicação da metabonômica em pesquisas biomédicas, análises nutricionais e análises exploratórias do metaboloma (WISHART, 2019). A identificação de metabólitos em células tumorais e tecidos foi uma das primeiras aplicações da metabonômica, destacando-se na análise de vias metabólicas essenciais, como o efeito Warburg, e impulsionando seu uso em pesquisas clínicas (EMWAS *et al.*, 2013).

O estudo de Hadi *et al.* (2017), por exemplo, investigou a identificação de metabólitos relevantes para o diagnóstico, classificação e estadiamento do câncer de mama. A análise de 307 amostras de soro, incluindo 152 de pacientes com câncer e 155 de controles saudáveis, revelou diferenças significativas nos níveis de metabólitos entre os grupos (HADI *et al.*, 2017). Sete metabólitos se mostraram particularmente relevantes para o diagnóstico, 18 para a classificação e 23 para o estadiamento, todos apresentando valores estatisticamente significativos (HADI *et al.*, 2017). As alterações metabólicas observadas incluíram níveis alterados de ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, alcanos, hidrocarbonetos aromáticos, aminas, amidas, compostos carbonílicos e açúcares no soro de pacientes com câncer de mama (HADI *et al.*, 2017). A análise metabólica revelou distúrbios em algumas vias, incluindo o metabolismo da galactose, amido, sacarose, açúcares amino e nucleotídicos, frutose, manose,

biossíntese de ácidos graxos e metabolismo das purinas (HADI *et al.*, 2017). Em contraste, o estudo demonstrou níveis mais elevados de glicopiranósideo no grupo saudável (HADI *et al.*, 2017).

O estudo realizado por Chen *et al.* (2018) revelou diferenças significativas nos perfis metabólicos do soro entre pacientes com periodontite agressiva generalizada (GAgP, do inglês *generalized aggressive periodontitis*) e indivíduos saudáveis, evidenciando as alterações bioquímicas associadas à doença. Os pacientes com GAgP apresentaram aumentos significativos em metabólitos como ureia e alo-inositol, e reduções significativas em metabólitos essenciais, como glutatona, 2,5-dihidroxibenzaldeído, ácido adípico e 2-desoxiguanosina (CHEN *et al.*, 2018). Essas diminuições sugerem um comprometimento na capacidade antioxidante e na regulação metabólica, refletindo a desregulação do metabolismo em resposta à inflamação periodontal (CHEN *et al.*, 2018). Essas alterações não apenas ressaltam a complexidade da resposta metabólica à periodontite, mas também abrem possibilidades para a identificação de biomarcadores que podem facilitar o diagnóstico precoce e a compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes à GAgP (CHEN *et al.*, 2018).

Foram identificados apenas dois estudos que investigaram o metabolismo do soro de pacientes com periodontite (CHEN *et al.*, 2018; ELABDEEN *et al.*, 2013). Esse número limitado de pesquisas pode ser atribuído ao fato de que a coleta de saliva, em comparação com o soro, apresenta vantagens como a aquisição por indivíduos não treinados, além de ser um método não invasivo e indolor (BRITO; CURCIO; DA SILVA FIDALGO, 2022). Por outro lado, o uso da saliva para estudos metabolômicos apresenta algumas limitações importantes. Embora esse biofluído compartilhe muitos dos componentes encontrados no soro, os metabólitos de interesse tendem a estar em concentrações muito mais baixas, o que exige a aplicação de técnicas analíticas mais sensíveis para sua detecção (HYVÄRINEN *et al.*, 2021). Além disso, a redução do fluxo salivar pode influenciar o metaboloma, alterando a composição da saliva de forma expressiva (HYVÄRINEN *et al.*, 2021). Outra dificuldade é que distúrbios comuns, como língua fissurada, língua geográfica, língua pilosa e atrofia filiforme, também podem modificar o perfil metabólico salivar, tornando os resultados ainda mais suscetíveis a variações (HYVÄRINEN *et al.*, 2021).

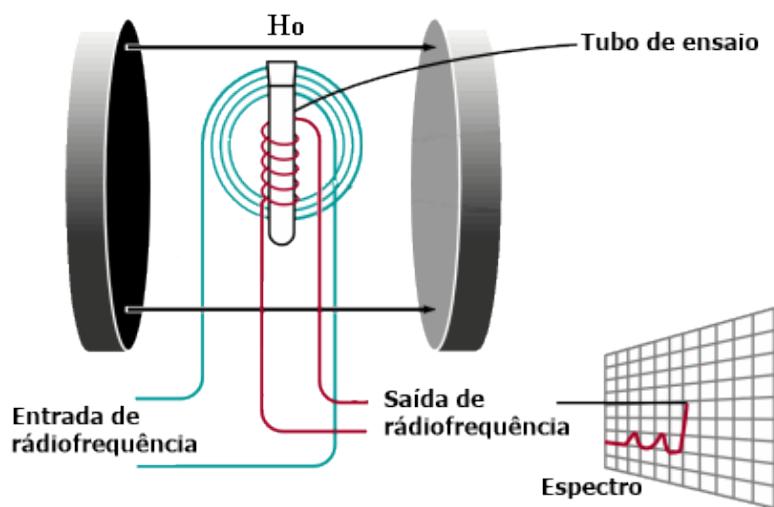
As descobertas sobre os perfis metabólicos em doenças crônicas como a periodontite e o câncer de mama não apenas elucidam as alterações bioquímicas associadas à doença, mas também sublinham a relevância da metabolômica como uma técnica capaz de identificar essas mudanças de forma precisa e eficaz.

### 3.3.3 Principais plataformas analíticas

A metabonômica emergiu a partir do progresso em métodos analíticos e bioinformática (DALAMAGA, 2024). Essa abordagem utiliza ferramentas sofisticadas de química analítica, como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM), combinada com técnicas cromatográficas, como cromatografia em fase gasosa (GC-MS) e cromatografia em fase líquida (LC-MS) (CASTELLI *et al.*, 2022; DALAMAGA, 2024).

A espectroscopia de RMN é uma técnica analítica que utiliza campos magnéticos e pulsos de radiofrequência (RF) para investigar núcleos atômicos com spin nuclear diferente de zero, como hidrogênio-1 e carbono-13, permitindo a determinação da estrutura e da quantidade de metabólitos em um espécime biológico a partir do espectro gerado, conforme ilustrado na Figura 7 (DUNN; ELLIS, 2005; RHEE; GERSZTEN, 2012). Na presença de um campo magnético, os estados de spin apresentam energia diferente (DUNN; ELLIS, 2005). A aplicação do pulso de RF permite que os spins possam absorver energia, saindo do estado de menor energia (estado fundamental) para o de maior energia (estado excitado) (HAGE; IWASAKI, 2009). Quando o pulso de RF é cessado, os spins voltam ao estado fundamental, liberando a energia absorvida, que é detectada pelo espetrômetro (SOUSA; DARTORA, 2021). A frequência de ressonância (da energia absorvida/emitida) é dependente do ambiente químico daquele spin, enquanto a intensidade do sinal é proporcional a quantidade do analito (MAYR, 2008). Assim, é possível identificar o composto (no caso, o metabólito), bem como estimar sua concentração relativa no meio.

Figura 7 – Esquema de um espetrômetro de RMN



Fonte: Nanobusiness (2024)

Essa técnica é considerada uma forma de impressão digital de alto rendimento, pois permite a análise simultânea de múltiplos compostos (DUNN; ELLIS, 2005). Para isso, amostras de

biofluidos são misturadas com um composto de referência, como o ácido timetilsilano propanóico (TPS), e inseridas na sonda do instrumento, possibilitando a identificação e quantificação de diferentes metabólitos (DUNN; ELLIS, 2005; EMWAS *et al.*, 2013).

A RMN é uma técnica que oferece alta reprodutibilidade e a capacidade de analisar amostras sem destruí-las, permitindo múltiplas análises na mesma amostra ao longo do tempo, o que dá a esse método uma série de vantagens sobre outras técnicas analíticas (BHARTI; ROY, 2012). Embora a sensibilidade da RMN seja baixa em comparação com a espectrometria de massa, ela pode ser melhorada por técnicas como a polarização nuclear dinâmica (BIEDENBÄNDER *et al.*, 2022). Outra vantagem da RMN é a simplicidade na preparação das amostras e o curto tempo experimental necessário para algumas análises, como na RMN de hidrogênio-1 ( $^1\text{H}$ ) (EMWAS *et al.*, 2013), na qual a obtenção do dado espectral consome de 10 a 15 minutos por amostra (BECKONERT *et al.*, 2007). No entanto, essa técnica é limitada no número de metabólitos detectáveis e é considerada inferior em análises direcionadas (EMWAS *et al.*, 2013).

Por outro lado, a Espectrometria de Massas (EM ou MS, do inglês *Mass Spectrometry*) oferece uma sensibilidade muito maior, capaz de detectar uma vasta gama de metabólitos com mais de 500 alvos detectáveis em amostras de urina, por exemplo (EMWAS *et al.*, 2013). Contudo, a técnica é destrutiva, o que significa que a amostra não pode ser reutilizada, e exige uma preparação mais laborosa das amostras, como a necessidade de cromatografia líquida para separar diferentes classes de compostos antes da detecção (NICHOLSON; LINDON, 2008). Em termos de tempo experimental, a EM pode ser mais rápida que a RMN em certas análises, especialmente quando se utiliza inserção direta (JUNOT *et al.*, 2014). Todavia, essa abordagem é pouco utilizada, pois exige uma manutenção preventiva do espectrômetro em menores intervalos de tempo. Em geral, a EM é empregada após uma corrida cromatográfica, demandando um tempo de análise da ordem de 30-40 minutos por amostra além do tempo necessário para elaboração da amostra. Por fim, a EM se destaca em análises direcionadas e é amplamente utilizada para identificar e quantificar metabólitos em tecidos (EMWAS *et al.*, 2013).

O potencial da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  de alta resolução para detectar uma ampla gama de metabólitos, oferecendo um 'instantâneo' metabólico (BECKONERT *et al.*, 2007) aliado à sua eficácia na análise de biofluidos com mínimo tratamento das amostras (WORLEY; POWERS, 2013) qualifica essa técnica como a solução mais apropriada para o presente estudo. No entanto, as assinaturas metabonômicas, frequentemente definidas em contextos de pesquisa clínica, apresentam desafios significativos para sua implementação na prática clínica rotineira,

devido à sua natureza multiparamétrica que envolve dezenas de metabólitos e pequenas variações de concentração entre os grupos (CASTELLI *et al.*, 2022). Para que essas assinaturas se tornem mais utilizáveis na prática clínica, é fundamental simplificar os resultados e adotar uma abordagem quantitativa, utilizando ferramentas estatísticas e de aprendizado de máquina que ajudem a identificar e destacar os componentes-chave (CASTELLI *et al.*, 2022). Quando se trata da aplicação em problemas químicos, esses métodos estatísticos são chamados de métodos quimiométricos (LYRA *et al.*, 2010).

### 3.3.4 Principais formalismos de estatística multivariada

A análise multivariada refere-se ao conjunto de técnicas estatísticas que lidam com múltiplas variáveis simultaneamente, com o objetivo de compreender melhor as relações e os padrões existentes entre elas em um determinado contexto de estudo (HAZRA; GOVTAY, 2017). Esses métodos são essenciais para distinguir classes em conjuntos de dados complexos, mesmo na presença de variabilidade interna (WORLEY; POWERS, 2013).

De modo geral, a análise multivariada é comumente estruturada em duas grandes categorias: aprendizagem supervisionada e aprendizagem não supervisionada (DONA *et al.*, 2016; MILLER; NAGY; SCHLUETER, 2018). Modelos de aprendizagem supervisionada utilizam dados rotulados – com características e variável de resposta conhecidas – para treinar algoritmos capazes de classificar novas instâncias com base em padrões previamente aprendidos (CHOUDHURY *et al.*, 2024). Em contraste, técnicas não supervisionadas operam sobre dados não rotulados, buscando identificar estruturas ou agrupamentos ocultos sem orientação externa (CHOUDHURY *et al.*, 2024). No estudo aqui apresentado, utilizamos apenas métodos não supervisionados, visando identificar agrupamentos naturais das amostras nas classes de interesse.

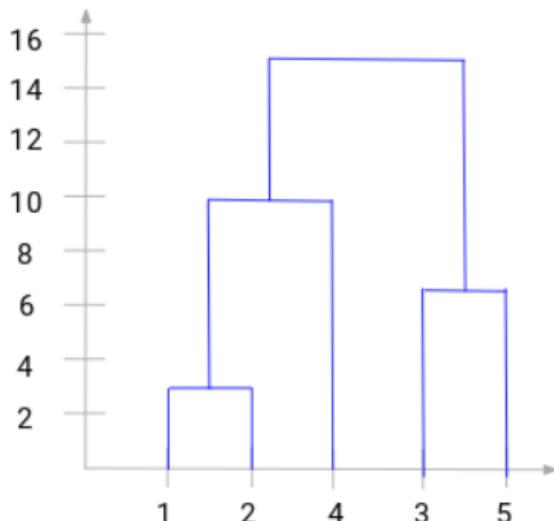
#### 3.3.4.1 Métodos Não Supervisionados

##### 3.3.4.1.1 Análise Hierárquica de Clusters

A análise hierárquica de cluster (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) é uma técnica estatística utilizada para agrupar objetos ou variáveis com base em suas semelhanças ou diferenças, com o objetivo de construir uma hierarquia de agrupamentos representada por um dendrograma, como apresentado na Figura 8 (CAESAR; KVALHEIM; CECH, 2018; MIRZAEI *et al.*, 2022). Essa representação visual permite identificar como os grupos se organizam progressivamente em diferentes níveis de similaridade, facilitando a interpretação

de padrões ou estruturas latentes nos dados (CAESAR; KVALHEIM; CECH, 2018; XU; WUNSCH, 2005).

Figura 8 – O dendrograma ilustra a organização hierárquica dos agrupamentos gerados pela análise de cluster. O eixo x representa as amostras, e o eixo y indica a distância ou dissimilaridade entre elas. A estrutura em árvore mostra como os grupos se formam progressivamente com base em suas similaridades



Fonte: AnalyticsVidhya (2019)

A HCA é particularmente eficaz na análise exploratória de perfis químicos e em contextos em que não há rótulos predefinidos (CAESAR; KVALHEIM; CECH, 2018). Além disso, tem se consolidado como uma ferramenta importante na análise de dados biológicos de alto rendimento, como na identificação de padrões metabólicos associados a diferentes condições biológicas (HEINZMANN *et al.*, 2022). Como uma subcategoria da análise de cluster, a HCA compartilha a premissa de agrupar objetos com base em características comuns, utilizando métricas de proximidade, como distâncias ou similaridades, para guiar a formação dos agrupamentos (GAO *et al.*, 2023; MIRZAEI *et al.*, 2022).

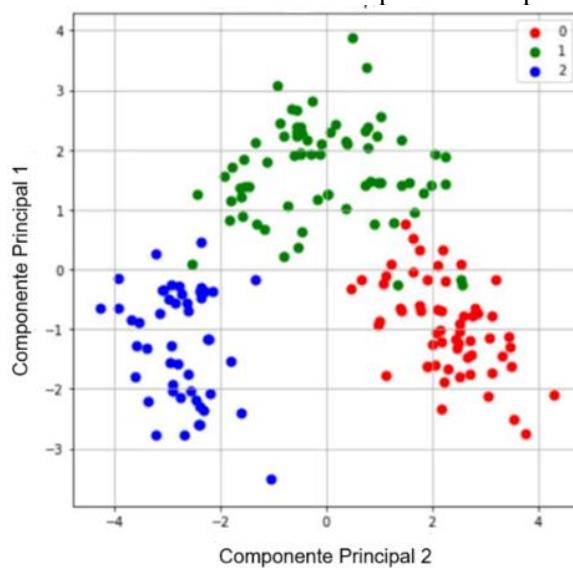
No exemplo apresentado na Figura 8, se considerarmos uma distância 12, temos dois grupos, sendo o primeiro formado pelas amostras 1, 2 e 4; o segundo grupo é formado pelas amostras 3 e 5.

### 3.3.4.1.2 Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é uma técnica estatística não supervisionada que se concentra na redução da dimensionalidade e na captura da variância máxima dos dados, independentemente de classes ou rótulos a que a amostra pertença (GREENACRE *et al.*, 2022). Seu objetivo é transformar dados complexos em uma versão simplificada por meio da redução da dimensionalidade, permitindo uma análise

mais eficiente enquanto preserva as características essenciais dos dados (RINGNÉR, 2008). Para isso, a PCA extrai informações relevantes da tabela de dados e as representa por meio de novas variáveis ortogonais, conhecidas como componentes principais, obtidas a partir de combinações lineares das variáveis originais (ABDI; WILLIAMS, 2010). Dessa forma, a PCA revela o padrão de similaridade entre observações e variáveis, representando-as como pontos em um novo sistema de coordenadas definido pelas Componentes Principais (PC) (ABDI; WILLIAMS, 2010), conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 9 – Gráfico de escores da Análise de Componentes Principais, usando duas componentes principais. As diferentes classes estão apresentadas por cores distintas



Fonte: Adaptado de Towardsdatascience (2020).

É importante destacar que, em geral, a matriz de dados contém características de variáveis com significados e unidades distintas, o que exige um pré-processamento adequado para permitir combinações apropriadas (LYRA *et al.*, 2010). Esse pré-processamento é normalmente realizado por meio do autoescalamento, que centraliza os dados pela média e os normaliza pelo desvio padrão, garantindo que todas as variáveis influenciem os resultados de maneira equitativa e se tornem adimensionais (LYRA *et al.*, 2010).

### 3.3.5 Visualização dos Dados

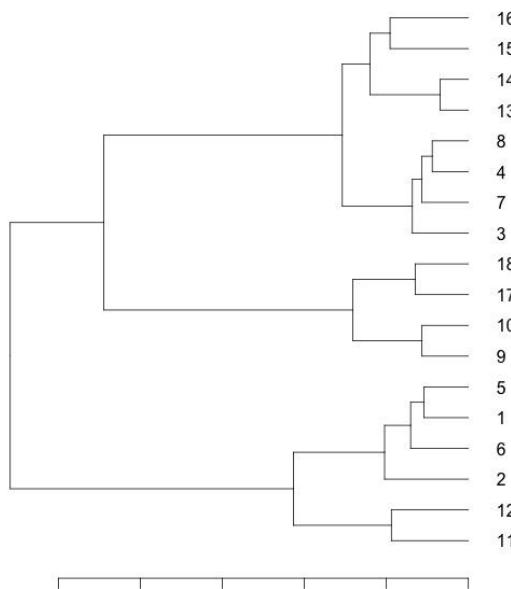
As ferramentas para a visualização de dados geram representações gráficas empregadas na análise multivariada para facilitar a identificação de padrões, agrupamentos e relações entre variáveis e amostras (MILDAU *et al.*, 2024).

### 3.3.5.1 Dendrograma

Como visto anteriormente, o dendrograma é resultado de um agrupamento hierárquico em forma de árvore, que ilustra as relações entre os objetos com base em seus graus de similaridade (LABBÉ; LANDETE; LEAL, 2023). Nesse tipo de representação, elementos com maior similaridade são agrupados nos níveis mais baixos da árvore, sendo conectados antes daqueles que apresentam menor proximidade (LABBÉ; LANDETE; LEAL, 2023).

Em um dendrograma, os nós correspondem aos pontos de junção entre elementos ou grupos de elementos, compondo a estrutura da árvore (XU; WUNSCH, 2005). Existem três tipos principais de nós: os nós folha representam objetos individuais do conjunto de dados, como amostras ou variáveis específicas; os nós intermediários indicam a fusão entre dois objetos ou agrupamentos com base em sua similaridade; e o nó raiz, localizado no topo da estrutura, representa a união de todos os elementos em um único grupo, simbolizando o conjunto completo de dados analisados (XU; WUNSCH, 2005). A altura em que essas uniões ocorrem ao longo da árvore reflete a distância entre os elementos agrupados (XU; WUNSCH, 2005) (Figura 10).

Figura 10 – Dendrograma representando a similaridade entre os elementos da amostra. O gráfico está disposto horizontalmente, com os objetos numerados de 1 a 17 no eixo vertical. As junções (clusteres) indicam a formação de grupos conforme o grau de semelhança. A escala na parte inferior representa a distância entre os componentes, permitindo a visualização do nível de proximidade entre os agrupamentos. Quanto mais próximo do 0 menor a distância entre os elementos.



Fonte: Stackoverflow (2013).

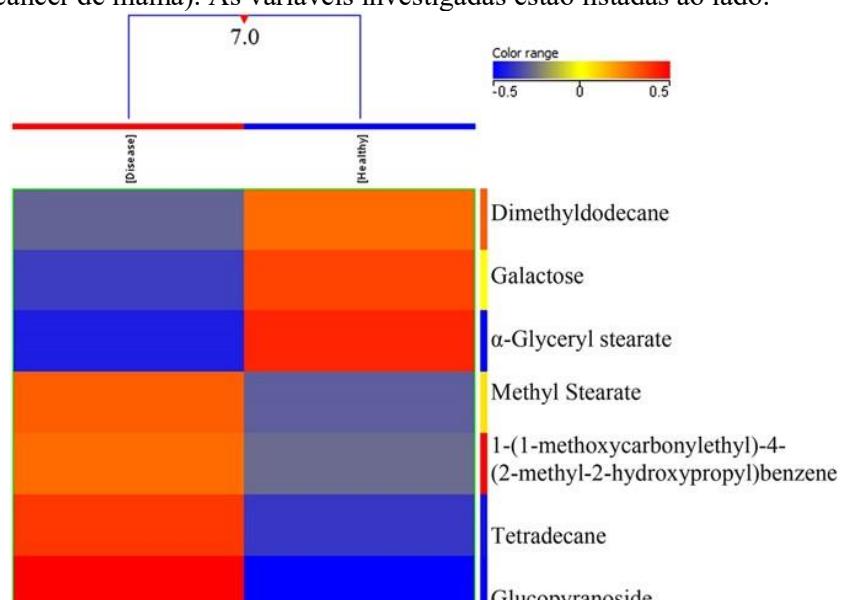
### 3.3.5.2 Mapa de Calor

O mapa de calor (do inglês, *heatmap*) é uma ferramenta estatística amplamente empregada na visualização de dados matriciais, representando a magnitude das variáveis por meio de variações cromáticas, em que cada célula é colorida proporcionalmente ao seu valor numérico (BABICKI *et al.*, 2016; GU, 2022). Essa codificação visual estabelece uma correspondência direta entre cor e intensidade, facilitando a identificação de padrões, correlações e outliers, especialmente em conjuntos de dados de alta dimensionalidade (BABICKI *et al.*, 2016; BOJKO, 2009).

Combinados a métodos de agrupamento baseados em similaridade ou dissimilaridade, os mapas de calor têm sido amplamente empregados na análise exploratória de dados, notadamente na investigação de perfis de expressão gênica, proteica e metabólica (BABICKI *et al.*, 2016). Quando integrados ao agrupamento hierárquico, esses gráficos permitem a reordenação de linhas e colunas na matriz de dados, agrupando elementos com padrões semelhantes (GU, 2022; GU; HÜBSCHMANN, 2022).

A inclusão de dendrogramas nas margens do mapa sintetiza as relações hierárquicas entre os agrupamentos, proporcionando uma representação compacta e informativa da organização interna dos dados (Figura 11) (WILKINSON; FRIENDLY, 2009). A capacidade de revelar agrupamentos naturais torna o mapa de calor com cluster uma das ferramentas mais eficazes e difundidas na análise de dados de alta dimensionalidade nas ciências biológicas (GU; HÜBSCHMANN, 2022).

Figura 11 – Exemplo de Dendrograma do heatmap – Grupo Controle *versus* Grupo Doença (câncer de mama). As variáveis investigadas estão listadas ao lado.

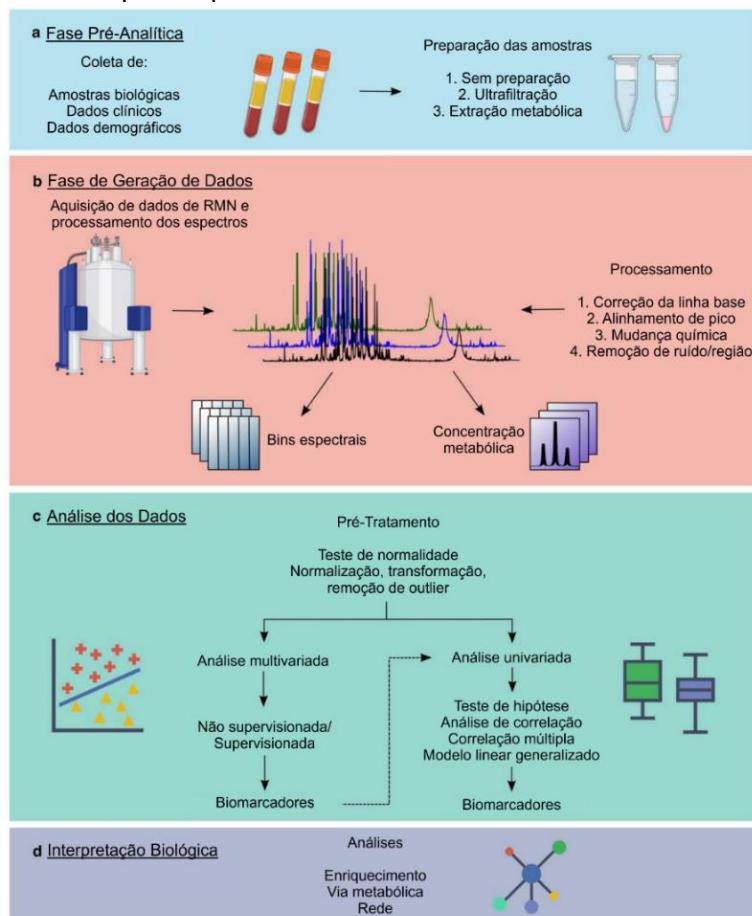


Fonte: Fonte: Hadi *et al.* (2017).

### 3.3.6 Abordagem Estruturada para Interpretação de Dados Metabonômicos

É possível observar, assim, que a análise de dados metabonômicos é desafiadora devido à variabilidade intrínseca de cada amostra (WORLEY; POWERS, 2013) e à complexidade dos conjuntos de dados, que dificulta a representação gráfica e torna a exploração – como identificação de tendências, comparação de grupos e visualização de distribuições – mais trabalhosa (RINGNÉR, 2008). Para mitigar esses problemas, a análise de dados metabonômicos segue etapas que incluem a fase pré-analítica, que é essencial na análise de metabólitos, abrangendo a coleta e a preparação de amostras, que podem incluir a extração de metabólitos e a remoção de macromoléculas (HUANG *et al.*, 2022). Após essa etapa, a geração de dados ocorre através da aquisição com parâmetros experimentais adequados e do processamento espectral, apresentando os resultados como comportamentos discretos que refletem a área sob o espectro ou as concentrações individuais de metabólitos (HUANG *et al.*, 2022). A análise dos dados envolve o pré-tratamento, a identificação de metabólitos relevantes e a interpretação biológica, que contextualiza esses metabólitos significativos (HUANG *et al.*, 2022). (Figura 12)

Figura 12 – Principais etapas do desenvolvimento de um estudo metabonômico



Fonte: Adaptado de Huang *et al.* (2022).

### 3.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE PERIODONTITE E CÂNCER DE MAMA

A literatura científica tem trazido cada vez mais evidências sobre a associação entre a periodontite e o câncer de mama (ABOLHASANI-ZADEH *et al.*, 2025; CORBELLÀ, 2018; GABA; GONZÁLEZ; MARTÍNEZ, 2022; PARHI *et al.*, 2020; SFREDDO *et al.*, 2017; SHAO *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2018). Essa relação foi inicialmente observada em estudos de coorte que investigavam a conexão entre a periodontite e diversos tipos de câncer, os quais revelaram uma associação estatisticamente significativa entre a periodontite e o desenvolvimento do câncer de mama (ARORA *et al.*, 2010; HUJOEL *et al.*, 2003). No entanto, ainda há escassez de literatura sobre essa relação, e os resultados têm se mostrado conflitantes (NWIZU; WACTAWSKI-WENDE; GENCO, 2020).

O primeiro estudo a estabelecer a conexão entre periodontite e câncer foi realizado por Hujoel *et al.* (2003) na coorte do NHANES I (*National Health and Nutrition Examination Survey*), evidenciando que pessoas com periodontite apresentavam um risco elevado de mortalidade por câncer. Embora o estudo tenha enfatizado especialmente a relação com o câncer de pulmão, também sugeriu que a presença de periodontite poderia aumentar em 32% o risco de morte por câncer de mama (HUJOEL *et al.*, 2003). Além disso, Arora *et al.* (2010) analisaram uma coorte de gêmeos suecos e encontraram um aumento de 15% no risco total de câncer entre os participantes com periodontite, além de um aumento de 12% no risco de câncer de mama.

Söder *et al.* (2011) realizaram um estudo que investigou especificamente a relação entre periodontite e câncer de mama, identificando uma associação estatisticamente significativa entre periodontite, diagnosticada por exame clínico periodontal, e a incidência de câncer de mama. Os resultados revelaram que participantes com periodontite e ausência de molares apresentaram um aumento de 5,5% na taxa de incidência de câncer de mama, em contraste com apenas 0,5% entre aqueles com periodontite sem perda dentária (SÖDER *et al.*, 2011). O estudo destacou a ausência de molares como um preditor independente para o câncer de mama, evidenciando um aumento de 136% no risco de desenvolvimento desse tipo de câncer (SÖDER *et al.*, 2011).

Posteriormente, uma coorte retrospectiva realizada por Chung *et al.* (2016) com dados do "Longitudinal Health Insurance Database 2000" de Taiwan encontrou um risco aumentado de câncer em indivíduos com periodontite, revelando um aumento de 23% no risco de câncer de mama após cinco anos de acompanhamento. No entanto, os autores reconheceram a falta de ajuste para fatores de confusão, como histórico familiar e tabagismo (CHUNG *et al.*, 2016). Além disso, a periodontite se mostrou associada a uma maior probabilidade de câncer de mama

invasivo em mulheres na pós-menopausa, principalmente entre aquelas com histórico de tabagismo, apresentando um risco 14% maior em comparação com as mulheres sem a doença (FREUDENHEIM *et al.*, 2016).

Em seguida, Nwizu *et al.* (2017) conduziram um estudo prospectivo no “*Women's Health Initiative Observational Study*”, com 65.869 mulheres, e constataram que a periodontite aumentou em 14% o risco total de câncer e em 13% o risco de câncer de mama, em comparação com as mulheres sem a condição periodontal. Entretanto, vale ressaltar que a avaliação da história da doença periodontal por meio de questionários de autorrelato pode ter levado à subnotificação da condição, o que pode ter impactado a associação observada, reforçando a necessidade de atenção a esses possíveis vieses em estudos semelhantes (NWIZU *et al.*, 2017).

Um estudo de caso-controle realizado no Hospital Universitário de Santa Maria (UHSM), Brasil, revelou que mulheres com câncer de mama apresentaram perda do NIC significativamente maior do que aquelas no grupo controle, sem câncer, com um valor *p* de 0,04 (SFREDDO *et al.*, 2017). Além disso, as mulheres diagnosticadas com periodontite tinham de duas a três vezes mais chances de desenvolver câncer de mama em comparação com aquelas sem a doença periodontal (SFREDDO *et al.*, 2017). Os resultados mostraram que a “periodontite severa generalizada”, aumentou em 161% o risco de desenvolver câncer de mama, e que, considerando o NIC médio, o aumento foi ainda mais acentuado, chegando a 244% (SFREDDO *et al.*, 2017).

Os resultados de uma coorte realizada por Dizdar *et al.* (2017) sustentam a associação entre periodontite e o aumento do risco de câncer de mama, mostrando que pacientes com periodontite, acompanhados por 12 anos em hospitais da Universidade Hacettepe, apresentaram um risco 77% maior de desenvolver câncer, com as mulheres tendo um risco 140% superior em relação à população geral. De maneira semelhante, a pesquisa de Güven *et al.* (2019) analisou dados do Registro Nacional de Câncer da Turquia, em 5.199 pacientes, por um período médio de 7,2 anos, revelando que indivíduos com periodontite tinham um risco 17% maior de câncer, e que as mulheres diagnosticadas com a condição apresentaram um risco 119% maior de desenvolver câncer de mama.

Dessa forma, os estudos publicados enfatizaram a necessidade de novas pesquisas para explorar os mecanismos subjacentes que ligam a periodontite ao câncer de mama (DIZDAR *et al.*, 2017). A partir disso, ensaios em modelos murinos, bem como revisões e meta-análises, foram realizados para compreender a relação entre essas doenças (ISSRANI, R. *et al.*, 2021; LITTLE *et al.*, 2023; PARHI *et al.*, 2020; SHAO *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2018). Os trabalhos sugerem que patógenos associados à periodontite, como a *P. gingivalis* e a *F. nucleatum*, podem

atuar como modificadores de risco no desenvolvimento do câncer, através de propriedades oncogênicas, como a indução da expressão de genes relacionados à proliferação celular, promoção local de disbiose, inflamação crônica (com a liberação de radicais livres, citocinas e degradação da matriz extracelular), evasão imunológica e dano epigenético (BAIMA *et al.*, 2023; HOARE *et al.*, 2019; FUJIWARA *et al.*, 2020).

A presença da *F. nucleatum* no microbioma do câncer de mama (HIEKEN *et al.*, 2016; NEJMAN *et al.*, 2020) corrobora a hipótese de que fusobactérias podem alcançar tumores por meio da circulação sanguínea (ALON-MAIMON; MANDELBOIM; BACHRACH, 2022). A *F. nucleatum* promove a colonização de células cancerígenas por meio do reconhecimento da galactose-N-acetylgalactosamina (Gal-GalNAc) (PARHI *et al.*, 2020), um oncoantígeno superexpresso no câncer de mama, que é fundamental para a especificidade da colonização tumoral por fusobactérias (ALON-MAIMON; MANDELBOIM; BACHRACH, 2022). Essa interação ocorre por meio da proteína autotransportadora Fap2, localizada na superfície da *F. nucleatum*, e tem um papel central na adesão bacteriana às células hospedeiras (ABED *et al.*, 2016; PARHI *et al.*, 2020).

Além disso, Van der Merwe *et al.* (2021) afirmaram que a *F. nucleatum* pode contribuir para a progressão do câncer de mama de maneira dependente do receptor toll-like 4 (TLR4) e por meio de mecanismos de imunomodulação. O LPS da parede celular desse microrganismo gera um estímulo inflamatório que ativa a resposta imune inata (CHENG *et al.*, 2020). Nesse contexto, o TLR4 desempenha um papel chave ao reconhecer o LPS e amplificar a cascata de sinalização do inflamossomo, por meio da ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) pela rota TLR4/MyD88, promovendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHENG *et al.*, 2020). Posteriormente, o NF-κB ingressa no núcleo celular, resultando no aumento da expressão do gene BIRC3, impedindo a apoptose ao inibir a ativação da Caspase-8 (ZHANG *et al.*, 2023; GUO; YU; HUANG, 2024).

Ainda assim, apesar dos estudos sugerirem possíveis hipóteses para justificar uma conexão entre a periodontite e o câncer de mama, estamos nos estágios iniciais da compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos (SHI *et al.*, 2018). Diferenças no desenho dos estudos, a forma de avaliação da condição periodontal e a falta de ajuste para fatores de confusão podem gerar resultados contraditórios (ISSRANI *et al.*, 2021).

É possível observar que alguns estudos (ARORA *et al.*, 2010; FARHAT *et al.*, 2021; FREUDENHEIM *et al.*, 2016; JIA *et al.*, 2020; NWIZU *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2023) utilizaram métodos alternativos para determinar a periodontite, como a autorreferência da condição e perda dentária, o que resulta em falta de uniformidade na definição de casos de periodontite

nesses estudos (NWIZU; WACTAWSKI-WENDE; GENCO, 2020). Isso pode levar a um erro no diagnóstico da doença e a uma classificação equivocada da exposição à periodontite, afetando a força dessa associação (ISSRANI *et al.*, 2021).

Em 2012, durante o *Workshop* Conjunto da Federação Europeia de Periodontologia e da Academia Americana de Periodontologia sobre "Periodontite e Doenças Sistêmicas", os organizadores sugeriram que, para validar a existência de uma possível associação causal entre periodontite e câncer, os estudos deveriam utilizar definições precisas e consensuais de doenças periodontais, estabelecidas pela comunidade científica, evitando o uso de marcadores substitutos (NWIZU; WACTAWSKI-WENDE; GENCO, 2020).

O desenvolvimento de estudos de coorte, com exame periodontal padronizado e diagnóstico de periodontite de acordo com a nova classificação de doenças e condições periodontais e peri-implantares (PAPAPANOU *et al.*, 2018), poderia fornecer informações sobre como a periodontite se relaciona com o câncer de mama (NWIZU; WACTAWSKI-WENDE; GENCO, 2020). Contudo, esse tipo de estudo pode ser dispendioso e trabalhoso, especialmente em grandes estudos de vigilância (NWIZU; WACTAWSKI-WENDE; GENCO, 2020).

Por outro lado, estudos de caso-controle seriam uma opção menos dispendiosa e poderiam ser realizados em menor tempo. No entanto, esse tipo de desenho é utilizado para estabelecer correlações entre exposições e resultados, e não para estabelecer causalidade (VARGAS-VILLAFUERTE *et al.*, 2016). Além disso, devido à sua natureza retrospectiva, pode incorrer em erros devido ao risco de causalidade reversa (SHI *et al.*, 2018).

Uma estratégia interessante para investigar alterações associadas a diferentes condições clínicas é a construção de modelos metabolômicos, visto que a identificação de mudanças no metaboloma, causadas por determinadas patologias, permite tanto o estudo de mecanismos fisiopatológicos quanto a identificação de biomarcadores associados a fenótipos específicos (JAYARAMAN *et al.*, 2014). Essa abordagem, ao unir potencial exploratório e aplicação translacional, mostra-se especialmente promissora em estudos clínicos (SCHMIDT *et al.*, 2021).

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa tem utilizado a espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H aplicada à metabonômica como ferramenta para investigar distintas condições clínicas, consolidando experiência na área. Em um estudo sobre infertilidade masculina associada à varicocele, a técnica permitiu discriminar homens férteis e inférteis, além de identificar metabólitos relevantes envolvidos no estresse oxidativo característico da condição (NETO *et al.*, 2020). Da mesma forma, a abordagem foi aplicada em mulheres pós-menopáusicas,

distinguindo casos de osteopenia e osteoporose a partir de perfis metabólicos séricos, com destaque para metabólitos relacionados à homeostase do sistema esquelético (PONTES *et al.*, 2019). Além disso, em pacientes com hepatite C crônica, modelos metabonômicos derivados de RMN de  $^1\text{H}$  apresentaram excelente desempenho na predição de fibrose hepática significativa, avançada e cirrose, superando índices clínicos tradicionais, o que poderia contribuir para a redução da necessidade de biópsia hepática (BATISTA *et al.*, 2018). Oliveira *et al* (2024) investigaram a performance de diferentes formalismos quimiométricos aplicados a dados espectrais de RMN obtidos de soro de pacientes com câncer de próstata. Esses trabalhos exemplificam a expertise consolidada do grupo de pesquisa na aplicação da estratégia metabonômica por RMN de  $^1\text{H}$  em diferentes contextos clínicos.

De modo complementar, outros autores também têm explorado o potencial da metabolômica para compreender a interface entre processos metabólicos e condições inflamatórias. Ma *et al.* (2021), por exemplo, utilizaram essa abordagem para analisar diferenças inflamatórias e metabólicas associadas à saúde periodontal em pacientes com doença renal em estágio terminal, em comparação com controles saudáveis. Essa pesquisa reforça como a análise do metaboloma pode auxiliar na identificação de biomarcadores séricos e na elucidação de padrões fisiopatológicos complexos, ampliando o entendimento de doenças crônicas multifatoriais.

Esses tipos de estudos demonstram que diferenças importantes nos perfis inflamatórios e metabólicos podem refletir condições de saúde específicas. A identificação de metabólitos-alvo pode oferecer um melhor entendimento dessas diferenças e servir como base para investigações maiores e prospectivas, como sugerido por Mamas *et al.* (2011), permitindo um entendimento mais profundo das interações entre periodontite e câncer de mama, além de contribuir para futuras abordagens diagnósticas e terapêuticas.

Nesse contexto, a hipótese do presente estudo é que a periodontite associada ao câncer de mama acarreta uma mudança no perfil de metabólitos endógenos das pacientes, o que pode ser identificado por metabonômica baseada em RMN. Essa abordagem poderá auxiliar na compreensão de como as alterações metabólicas associadas à periodontite influenciam ou interagem com os processos metabólicos envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de mama.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DESENHO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e transversal, com amostra de conveniência, não probabilística, composto por pacientes diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Serviço de Oncologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/EBSERH/UFPE). O estudo foi realizado no período de julho a dezembro de 2024. Após a seleção da amostra, as participantes foram alocadas em dois grupos, conforme a presença ou ausência de periodontite: Grupo 1 – pacientes com câncer de mama e diagnóstico clínico de periodontite ( $n = 6$ ); Grupo 2 – pacientes com câncer de mama sem periodontite ( $n = 6$ ).

### 4.2 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada em três locais distintos:

- i) A consulta aos prontuários aconteceu na sala do Núcleo da Documentação Clínica (NDC) do HC/EBSERH/UFPE;
- ii) O recrutamento das pacientes, avaliação periodontal e coleta sanguínea foram realizados no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE;
- iii) A análise do metaboloma foi realizada no Departamento de Química Fundamental (DQF), Laboratório da Central Analítica e Laboratório de Metabonômica e Quimiometria, onde os dados espectrais foram obtidos e os modelos metabonômicos construídos.

### 4.3 AMOSTRA DE PARTICIPANTES

A amostra foi composta por mulheres com diagnóstico de câncer de mama em acompanhamento no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE. No total, 27 pacientes foram inicialmente convidadas a participar da pesquisa. No entanto, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, além de recusas espontâneas, apenas 12 pacientes foram consideradas elegíveis e aceitaram participar do estudo, compondo a amostra final. O número de participantes foi determinado de forma dinâmica, condicionado à disponibilidade das pacientes no período de coleta e à demanda espontânea do ambulatório. As principais causas para a não inclusão foram o não atendimento aos critérios de elegibilidade e a recusa em participar da pesquisa.

## 4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

### 4.4.1 Critérios de inclusão

Mulheres com câncer de mama confirmados por ultrassonografia/mamografia seguida de biópsia, diagnosticadas ou acolhidas no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE. Pacientes com 18 anos ou mais foram elegíveis para participar. Não houve restrições quanto ao estadiamento do câncer e ao tratamento.

### 4.4.2 Critérios de exclusão

Mulheres que já tivessem completado o tratamento contra o câncer ou consideradas em remissão foram excluídas. Pacientes com menos de dez dentes também não fizeram parte do estudo.

## 4.5 RECRUTAMENTO DOS PARTICIPANTES

O recrutamento ocorreu após a avaliação dos prontuários das pacientes acompanhadas no serviço de Oncologia HC/EBSERH/UFPE. Os dados foram coletados e planilhados pela pesquisadora em um espaço reservado, sem a presença de outras pessoas. As pacientes foram recrutadas continuamente até a data final (dezembro de 2024) ser alcançada. As voluntárias foram instruídas, pelo médico assistente ou pela pesquisadora, acerca do objeto da pesquisa, sendo expostos os benefícios e riscos associados. As participantes que aceitaram participar foram convidadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Apêndice A**), tendo o estudo sido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFPE/EBSERH, sob o Número do Parecer: 6.806.140 (**Apêndice C**).

## 4.6 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

Os prontuários selecionados foram separados para leitura e análise minuciosa, buscando as informações pertinentes de acordo com os objetivos da pesquisa. Inicialmente, foram consultados os dados demográficos (**Apêndice B**), seguido de informações sobre o câncer de mama (**Apêndice C**).

Foram aplicados um questionário de saúde (**Apêndice B**) e um questionário para obter informações sobre exposição a fatores de risco para periodontite e/ou câncer de mama (**Apêndice D**) para todas as participantes da pesquisa. O tempo para aplicação dos questionários foi de, em média, 20 minutos. Posteriormente, dados relacionados ao diagnóstico clínico periodontal (**Apêndice E**) e foram coletados através da realização de um exame clínico periodontal, a fim de estabelecer o diagnóstico da condição periodontal de acordo com a vigente

classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares (PAPAPANOU *et al.*, 2018), incluindo o estágio, extensão e grau da periodontite. Os instrumentais odontológicos utilizados para realização do exame periodontal estão descritos a seguir, no item 4.7.1. Além disso, foi realizada a coleta de amostra sanguínea, de todas as participantes da pesquisa, por meio de punção venosa periférica para análise por RMN de  $^1\text{H}$ . O material utilizado para esse procedimento está descrito no item 4.7.2.

#### 4.7 PROCEDIMENTO PARA A COLETA DE DADOS

Inicialmente, os prontuários das voluntárias foram submetidos a leitura e análise minuciosa, de modo a identificar as informações pertinentes aos objetivos da pesquisa. Na sequência, os dados extraídos foram organizados em planilhas do Microsoft<sup>TM</sup> Excel (Microsoft<sup>TM</sup> Corporation, Redmond, Washington, USA), em um notebook com acesso restrito à pesquisadora e protegido por senha. Aos dados dos prontuários foram acrescidos aqueles obtidos no exame periodontal e nos espectros de RMN, todos mantidos em sigilo pela equipe de pesquisa, conforme previsto pelo CEP/CONEP e detalhado no item 5 (Aspectos Éticos). Por fim, os registros foram duplamente checados, visando reduzir o risco de erro sistemático associado à falha na entrada de informações.

##### 4.7.1 Exame periodontal

Todas as voluntárias foram submetidas ao exame periodontal completo, realizado por uma única examinadora treinada e previamente calibrada. Foi utilizada uma sonda milimetrada tipo Carolina do Norte (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago/IL – USA). O exame periodontal consistiu na avaliação de: i) Profundidade de Sondagem (PS) e Nível de Inserção Clínica (NIC), que foram avaliados em seis pontos por dente (distovestibular, vestibular, mesiovestibular, distolingual, lingual e mesiolingual), utilizando a sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte, Hu-Friedy®. Para esses, a sonda foi inserida paralelamente à superfície radicular com uma força de 25N (BARENDRUGT *et al.*, 2006), para medir a distância da margem gengival ao fundo do sulco ou bolsa periodontal (PS) e da junção cimento-esmalte ao fundo da bolsa periodontal (NIC). ii) Sangramento à Sondagem (SS) (análise da presença de sangramento em até 15 segundos após o procedimento de sondagem [mensurado em seis sítios por dente - distovestibular, vestibular e mesiovestibular, distolingual, lingual e mesiolingual -]. A avaliação da presença/ausência de Sangramento à sondagem num padrão binomial [0 - ausência de sangramento; 1 - presença de sangramento]. O número de sítios com presença de sangramento é dividido por 6 x o número total de dentes, multiplicado por cem)

(MÜHLEMANN; SON, 1971); iv) Lesão de furca (LF) (análise da presença de lesão na região de furca - região anatômica entre as raízes dos dentes multirradiculares - por meio da utilização da sonda Nabers, Hu-Friedy®. Projeta-se a sonda delicadamente para região de furca, obedecendo a anatomia radicular dos dentes posteriores. A classificação da extensão da lesão é dada em diferentes graus [a) grau 1: perda óssea horizontal de até 3 mm; b) grau 2: perda óssea horizontal maior que 3 mm, sem atingir o lado oposto; c) grau 3: perda óssea horizontal que se estende de um lado a outro) (HAMP; NYMAN; LINDHE, 1975) e v) Mobilidade dentária (foi avaliada a presença da mobilidade bem como o grau da mesma [após estabilizar a cabeça do paciente para minimizar o movimento, foram exercidas forças leves sobre o dente com o auxílio do cabo do espelho e cabo da sonda periodontal. A partir da observação do movimento horizontal do dente, no sentido vestíbulo-lingual ou palatino, em relação aos dentes adjacentes foi diagnosticada mobilidade grau 0 - Nenhum movimento observado; grau 1, mobilidade  $\leq$  1mm no sentido horizontal; grau 2, mobilidade  $>$  1mm no sentido horizontal ou; grau 3, mobilidade no sentido vertical (intrusão apical) e horizontal]) (CLEREHUGH; TUGNAIT, 2001). Para isso, foram utilizados *espelho bucal plano nº5*, Golgran®, sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte, Hu-Friedy® e sonda periodontal milimetrada Nabers, Hu-Friedy®. Os achados foram transcritos em uma ficha periodontal (**Apêndice F**). Posteriormente, os dados relacionados ao periograma e diagnóstico clínico periodontal foram consultados a fim de estabelecer o diagnóstico clínico periodontal de acordo com a atual classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares, incluindo o estágio, extensão e grau da periodontite (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

Para auxiliar o diagnóstico periodontal foi considerado tabagismo (“tabagista?” se sim, quantos cigarros fuma por dia + resultado do questionário Fagerstrom) (**Anexo B**) e perfil glicêmico (glicemia plasmática de jejum [ $>126$  mg/dl em 2 momentos diferentes] e hemoglobina glicada (HbA1c) [ $\geq 6,5\%$ ]) (TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

#### 4.7.2 Coleta sanguínea para análise por RMN de $^1\text{H}$

Foi realizada a coleta de amostra sanguínea de todas as participantes da pesquisa, por meio de punção venosa periférica. A coleta foi realizada da seguinte forma: 1) higienização das mãos e coleção da luva de procedimento; 2) explicação ao paciente sobre como seria feita a coleta; 3) confirmação dos dados da etiqueta no tubo [Tubo à vácuo sem aditivos, BD Vacu-tainer®]; 4) mostrar agulha [Agulha De Coleta Multipla Vácuo 25x8mm 21g - Vacuplast®] nas embalagens antes de abrir; 5) localização da região onde seria realizada a punção venosa [veia cefálica mediana ou veia basílica mediana]; 6) assepsia do local com álcool 70% e colocação

do garrote no braço da participante pedindo para a mesma feche e abra a mão repetidamente; 7) remoção da capa da agulha seguida de punção; 8) coleta da amostra; 9) remoção do garrote; 10) remoção da agulha, limpeza da região e colocação de curativo; 11) instrução para realização de pressão local por 3 minutos; 12) homogenização do sangue coletado no tubo). Para cada participante foram extraídos 5ml de sangue, coletado em tubo à vácuo sem aditivos, de 10ml, BD Vacutainer®, que foi transportado imediatamente após a coleta, em isopor com bateria de gelo, para o DQF/UFPE, onde a amostra foi armazenada e processada.

#### 4.7.3 Separação do soro para análise por RMN de $^1\text{H}$

A amostra de sangue foi centrifugada (3000 RPM por 15 minutos), visando obter o soro (sobrenadante). Uma fração de 2,0 mL de soro foi transferida para um eppendorf e mantido em ultrafreezer a -40°C até o momento da análise por RMN.

#### 4.7.4 Preparação das amostras de soro sanguíneo e análise por RMN de $^1\text{H}$

Para a realização da análise, as amostras foram descongeladas e uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  da amostra de soro foi transferida para um tubo de RMN, com 5 mm de diâmetro interno. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) e o conteúdo foi homogeneizado manualmente. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos usando a sequência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill), com pré-saturação (presat) do sinal da água, no espetrômetro modelo Ascend (Bruker®) operando a 400 MHz. Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: i) tempo de pré-saturação igual a 3 s, ii) janela espectral de 5,88 kHz, iii) número de ciclos de 126, iv) tau igual a 0,0003 s, v) bigtau igual a 0,076 s e vi) 128 transientes. Os espectros foram processados usando line broadening de 0,3 Hz. Após análise por RMN, o material biológico foi devolvido ao Hospital das Clínicas para descarte adequado.

Uma nova etapa de processamento dos dados espetrais foi conduzida utilizando o software MestReNova 12.0.0. Os espectros foram reavaliados com correção automática da linha de base e ajuste manual de fase. Em seguida, o sinal correspondente ao grupo metil do lactato foi utilizado como referência, sendo alinhado em  $\delta$  1,33 ppm. Todos os espectros foram sobrepostos graficamente para verificação da qualidade dos ajustes realizados. A seguir, realizou-se cortes da região espectral de interesse, considerando a faixa entre  $\delta$  0 e 5,41 ppm, eliminando a região do sinal da água entre  $\delta$  4.67 ~ 4.82 ppm, a região  $\delta$  0.11 ~ 0.64 ppm, que não apresentou nenhum sinal, e a região entre  $\delta$  1.75 ~ 1.86, que apresentou picos anômalos presentes em um número reduzido de amostras e poderia prejudicar as análises. A região então definida, foi dividida em intervalos (bins) de 0,004 ppm para a construção da matriz de dados.

As linhas correspondentes a cada amostra foram então consolidadas em uma matriz única, contendo as amostras (casos) nas linhas e os bins nas colunas (variáveis), com a adição de uma coluna classificatória correspondente à categoria de cada amostra. O resultado foi uma matriz final composta por 12 amostras e 1151 variáveis, a qual foi posteriormente submetida às análises quimiométricas.

#### 4.7.5 Tratamento estatístico para análises multivariadas

Os dados espectrais foram organizados em uma matriz, na qual cada linha correspondia a uma voluntária e as variáveis espectrais estavam dispostas nas colunas. Com a matriz adquirida, foi realizado o tratamento quimiométrico dos dados espectrais utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 6.0. Os dados foram normalizados pela soma nas amostras, transformados por logaritmo (base 10) e autoescalados nas variáveis.

As análises estatísticas exploratórias foram realizadas utilizando o módulo Statistical Analysis da plataforma MetaboAnalyst 6.0. Inicialmente, foi aplicada a PCA, uma técnica não supervisionada, para investigar padrões gerais nos dados e explorar possíveis agrupamentos naturais entre as amostras. Além disso, foi utilizada a visualização por mapas de calor com agrupamento hierárquico, gerado a partir das 25 regiões com maior variação entre as amostras. O agrupamento hierárquico permitiu identificar grupos semelhantes com base nas características de abundância dos metabólitos, sem a necessidade de rótulos prévios.

Embora métodos supervisionados possam contribuir para a identificação de padrões discriminativos, sua utilização neste estudo foi inviável devido ao número limitado de amostras ( $n = 12$ , sendo 6 por grupo). A decisão de não utilizar essas abordagens foi fundamentada em considerações metodológicas reconhecidas na literatura (FIGUEROA *et al.*, 2019). Dados de alta dimensão com um número reduzido de amostras apresentam desafios para a generalização de modelos preditivos e podem levar a estimativas de desempenho enviesadas (VABALAS *et al.*, 2019).

Além disso, o poder do aprendizado de máquina em identificar padrões é diretamente proporcional ao tamanho do conjunto de dados, o que torna esses modelos menos robustos e confiáveis em cenários com amostras muito pequenas (KOKOL; KOKOL; ZAGORANSKI, 2022). O risco de *overfitting* também é elevado em conjuntos de dados pequenos, comprometendo a capacidade de generalização do modelo para novas amostras (RATHER; KUMAR; GANDOMI, 2024). Dessa forma, a decisão de não utilizar modelos supervisionados foi pautada pela preocupação metodológica de evitar interpretações equivocadas baseadas em resultados instáveis e pouco robustos.

A identificação dos metabólitos de interesse foi realizada através dos bancos de dados eletrônicos HMDB (do inglês, *Human Metabolome Database*) (WISHART *et al.*, 2022), BMRB (do inglês, *Biological Magnetic Resonance Bank*) (HOCH *et al.*, 2022) e artigos publicados.

#### 4.7.6 Métodos Estatísticos para Controle de Variáveis de Confusão

O cálculo do número adequado de participantes em estudos de aprendizado de máquina multivariado aplicados à metabolômica não segue um padrão, pois está intimamente ligado a diversos fatores interdependentes (BRITO; CURCIO; DA SILVA FIDALGO, 2022). A dimensionalidade dos dados, a magnitude dos efeitos a serem detectados, a estrutura de covariância (indicando a força das relações latentes), a heterogeneidade da população amostrada, a precisão e repetibilidade dos instrumentos de medição, assim como a complexidade do modelo de aprendizado, são variáveis que devem ser cuidadosamente consideradas (BRITO; CURCIO; DA SILVA FIDALGO, 2022).

Para garantir que as diferenças observadas nas mudanças metabólicas entre os grupos fossem atribuídas à presença de periodontite e não a outros fatores, foi realizada uma análise comparativa. A análise envolveu testes estatísticos para verificar se havia diferenças significativas entre os grupos em relação a potenciais fatores de confusão. As variáveis numéricas foram analisadas por meio do teste U de Mann-Whitney, considerando o tamanho reduzido das amostras, a independência das observações e a não normalidade dos dados (SULLIVAN; WEINBERG; KEANEY, 2016). O teste Exato de Fisher foi utilizado para as variáveis categóricas devido ao número reduzido de observações e à presença de frequências esperadas inferiores a cinco em algumas células das tabelas de contingência (SULLIVAN; WEINBERG; KEANEY, 2016). A partir disso, foi possível verificar se os grupos eram equivalentes, minimizando a possibilidade de que outras variáveis estivessem influenciando os resultados observados.

## **5 ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFPE/EBSERH, sob o Número do Parecer: 6.806.140 (**Anexo C**). Antes do início da pesquisa, todas as participantes foram informadas sobre o contexto do estudo, riscos e benefícios envolvidos, e convidadas a assinar voluntariamente o TCLE (**Apêndice A**).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 PERFIL CLÍNICO E SOCIODEMOGRÁFICO DAS PARTICIPANTES

A presente pesquisa foi composta por uma amostra total de 12 pacientes, todas atendendo aos critérios de elegibilidade. A Tabela 1 apresenta os dados clínicos e sociodemográficos das voluntárias deste estudo.

Tabela 1 – Dados clínicos e sociodemográficos das voluntárias

	Periodontite Positivo	Periodontite Negativo	Valor de <i>p</i>
Nº de voluntárias	6	6	-
Idade (média ± dp)	$55,8 \pm 8,4$	$49,8 \pm 6,2$	0.23
Renda (média ± dp)	R\$ 1.763,50	R\$ 1.714,40	0.78
Cor da pele			
Branca	1	3	
Parda	4	3	0.54
Preta	1	0	
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) (média ± dp)	$30,7 \pm 5,3$	$26,9 \pm 1,8$	0.39
Etilismo			
Sim	2	3	
Não	4	3	1
Diabetes			
Sim	4	3	
Não	2	3	1
Tabagismo			
Sim	2	3	
Não	4	3	1
Histórico familiar de			
Câncer de mama	3	1	0.54
Mutação genética			
Sim	1	0	
Não	1	2	1
Idade da menarca (anos) (média ± dp)	$12,7 \pm 2,2$	$12,0 \pm 1,2$	0.86
Idade ao ter 1º filho (anos) (média ± dp)	$25,4 \pm 5,9$	$22,5 \pm 2,1$	0.61
Idade da menopausa (anos) (média ± dp)	$48,0 \pm 5,8$	$48,7 \pm 7,0$	1
Uso de anticoncepcional (anos) (média ± dp)	$2,0 \pm 3,9$	$8,4 \pm 12,4$	0.1

Os dados referentes a presença de mutações genéticas não estavam disponíveis nos prontuários de oito participantes, resultando em uma análise com  $n = 4$  para essa variável.

Fonte: Autoria própria.

Os resultados dos testes de Mann-Whitney e exato de Fisher indicam que não há diferenças significativas entre os grupos em relação às variáveis analisadas. Todos os valores foram superiores a 0,05, indicando ausência de diferenças significativas entre os grupos (JAFARI; ANSARI-POUR, 2019). Isso sugere que as distribuições dessas variáveis são semelhantes entre os grupos, o que é necessário para garantir que as diferenças observadas nas mudanças metabólicas sejam atribuídas à presença de periodontite, e não a outros fatores de confusão.

Além disso, o diagnóstico do câncer de mama foi criteriosamente avaliado em ambos os grupos (Tabela 2), de forma a assegurar a comparabilidade entre as participantes. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto ao tipo histológico, grau tumoral ou subtipo molecular da doença.

Tabela 2 – Diagnóstico do câncer de mama

Variável / Grupo	Periodontite Positivo	Periodontite Negativo	Valor de <i>p</i>
Tipo Histológico do Câncer			
CDI	6	6	1
Grau do Câncer			
1	1	0	
2	1	2	
3	3	3	1
Tipo Molecular do câncer			
Luminal A	3	0	
Luminal B	2	3	0.22
Triplô Negativo	1	3	
Estágio do Câncer			
Estágio I	1	0	
Estágio IIA	1	0	
Estágio IIB	3	3	0.69
Estágio IIIA	1	1	
Estágio IV	0	2	

Os dados referentes ao grau de do câncer de mama não estavam disponíveis nos prontuários de duas participantes, resultando em uma análise com  $n = 10$  para essa variável.

Fonte: Autoria própria.

Após o exame clínico periodontal, observou-se que seis participantes apresentaram a coexistência do câncer de mama e da periodontite, enquanto as outras seis apresentaram o câncer de mama isoladamente (Tabela 3). Em relação ao número de dentes perdidos, a média observada foi de 6 ( $\pm 2$ ) dentes para os pacientes com periodontite e 4 ( $\pm 4$ ) para os pacientes sem periodontite. No entanto, a diferença entre esses grupos não foi estatisticamente significativa, com um valor de  $p = 0,64$ .

Tabela 3 – Detalhamento do Diagnóstico da periodontite

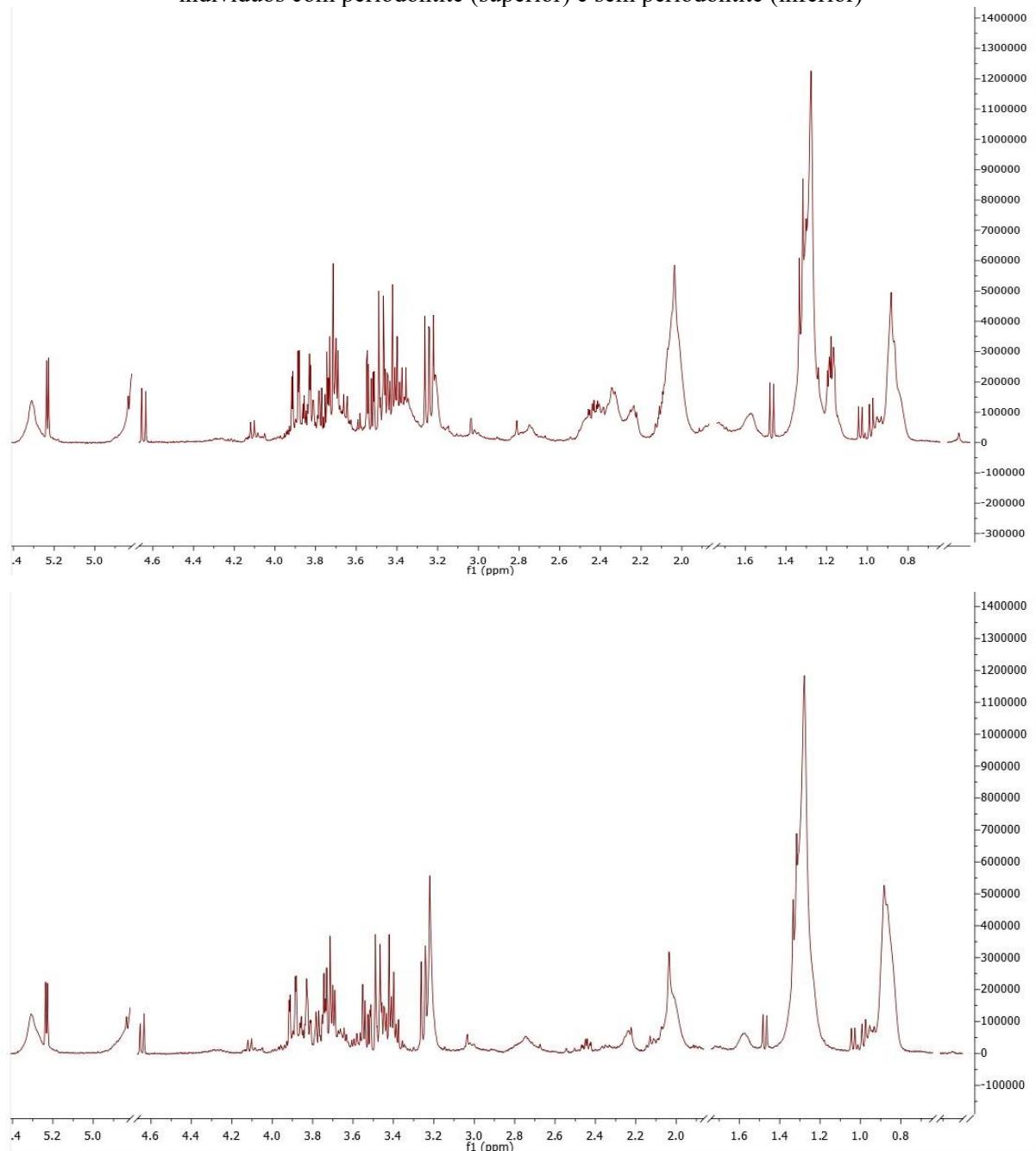
Estágio da periodontite	Extensão da periodontite			Grau da periodontite				
	I	III	IV	Generalizada	Localizada	A	B	C
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>		<b>3</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>4</b>

Fonte: Autoria própria.

## 6.2 Análise Quimiométrica

O principal objetivo do estudo realizado foi discriminar amostras de pacientes acometidas por periodontite e câncer de mama daquelas acometidas por câncer de mama sem periodontite, através de uma abordagem metabonômica. Para isso, as amostras de soro foram submetidas à análise por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , permitindo a avaliação do perfil de metabólitos das participantes (Figura 13).

Figura 13 – Espectros típicos de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) de amostras de soro obtidas de indivíduos com periodontite (superior) e sem periodontite (inferior)

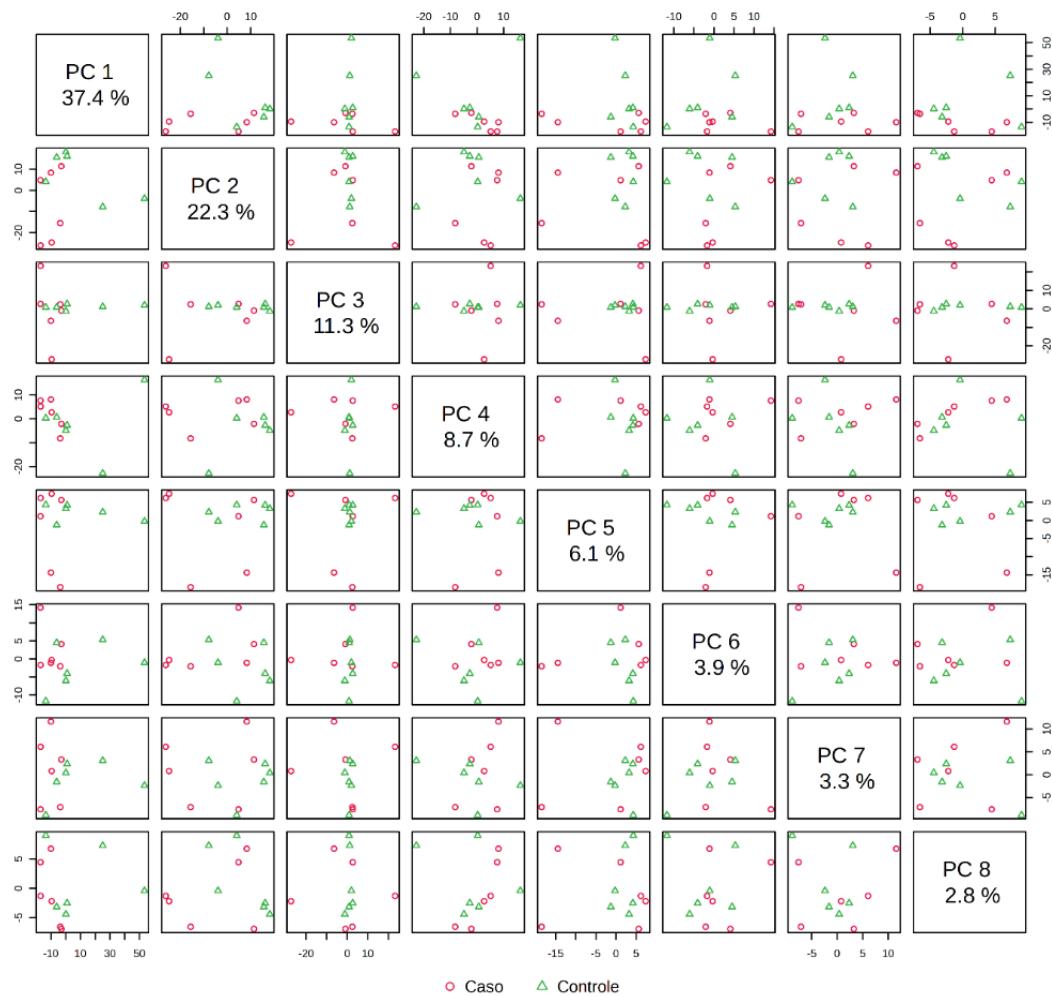


Fonte: Autoria própria.

A inspeção individual dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das amostras não evidenciou diferenças capazes de discriminar os grupos. Assim, o uso de ferramentas de estatística multivariada tornou-se essencial para identificar padrões latentes.

A Figura 14 apresenta gráficos de escores da PCA, que indicam que as cinco primeiras componentes principais explicam 85,8% da variância contida no conjunto de dados. Entretanto, considerando a totalidade das amostras, não foram observados agrupamentos naturais nas classes de interesse.

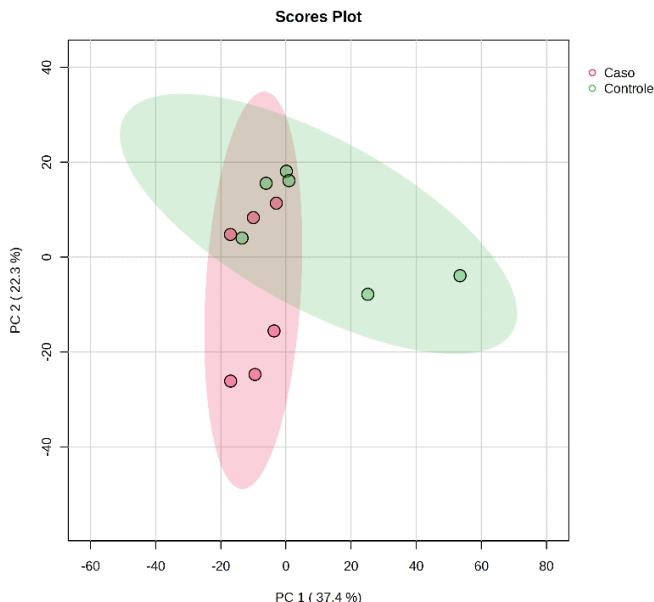
Figura 14 – Gráficos de escores da PCA usando dados de RMN de  $^1\text{H}$  do soro. Em vermelho, estão representadas as voluntárias com periodontite, enquanto as sem periodontite estão representadas por triângulos verdes.



Fonte: Metaboanalyst 6.0

A Figura 15 mostra o gráfico de escore usando as duas primeiras componentes principais, que explicam 59,7% da variância. Nela (Figura 15), observa-se uma clara sobreposição das amostras.

Figura 15 – Gráfico de escores da PCA – PC1 *versus* PC2



Fonte: Metaboanalyst 6.0

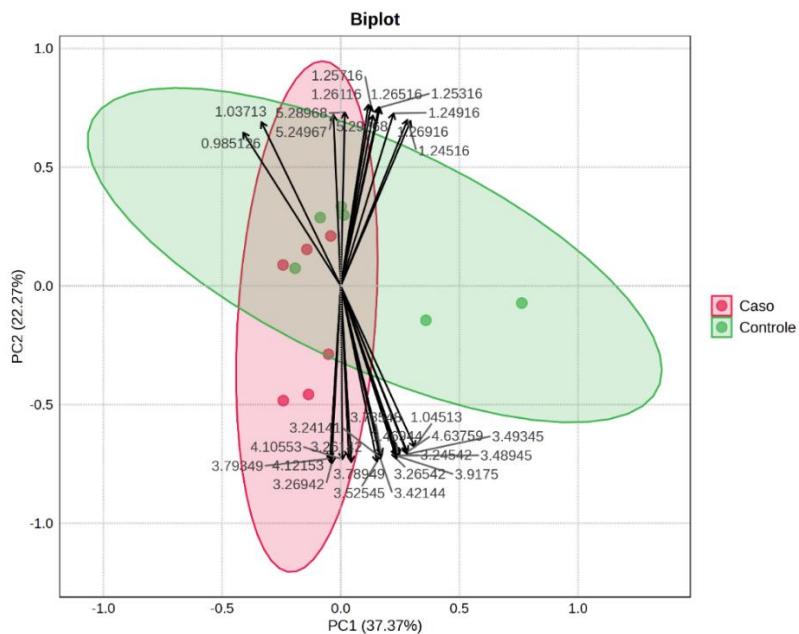
Dessa forma, embora a PCA não tenha promovido uma separação nítida entre os grupos analisados, a distribuição das amostras ao longo da PC2 revelou um padrão de agrupamento, com cinco amostras apresentando escores negativos (1, 2, 4, 7, 8) enquanto sete amostras apresentaram escores positivos (3, 5, 6, 9, 10, 11 e 12). Essa configuração sugere a presença de perfis metabólicos divergentes dentro do conjunto analisado, possivelmente refletindo diferenças biológicas não capturadas pela classificação clínica estudada. Outrossim, com base nas variáveis analisadas (4.7 – Procedimento para a coleta de dados), não foi possível identificar um fator comum que justificasse a formação desses subgrupos.

É conveniente destacar que todas as participantes, com exceção de uma, haviam iniciado algum tipo de tratamento oncológico, o que pode estar intimamente associado às modificações metabólicas observadas, uma vez que estudos prévios identificaram alterações no perfil metabólico de pacientes submetidas à quimioterapia (CARDOSO *et al.*, 2022; DEBIK *et al.*, 2019; DÍAZ *et al.*, 2022; YAMADA *et al.*, 2024).

Além disso, a PCA revelou que as pacientes com valores negativos na PC2 foram agrupadas em duas categorias distintas. O primeiro grupo, caracterizado por valores negativos tanto na PC1 quanto na PC2, foi composto por três pacientes diagnosticadas com periodontite e câncer de mama. Por outro lado, o segundo grupo apresentou valores negativos na PC2 e positivos na PC1, sendo formado por duas pacientes com diagnóstico isolado de câncer de mama. Essa divisão sugere que, embora todas as pacientes compartilhem valores negativos na PC2, as variações no comportamento da PC1 podem refletir diferenças entre as condições clínicas.

A visualização do *biplot*, gerado a partir da PCA, permite observar tanto a distribuição das amostras quanto à contribuição das variáveis espectrais (deslocamentos químicos) para a separação observada (Figura 16). As variáveis são representadas por vetores e indicam os deslocamentos químicos que mais contribuíram para a variância capturada pelas componentes principais.

Figura 16 – Gráficos de escores e de pesos (loadings) - Biplot da PCA



Fonte: Metaboanalyst 6.0

A análise do gráfico *biplot* revelou que seis metabólitos foram responsáveis pela discriminação entre os grupos de pacientes com e sem periodontite, no subgrupo com escores negativos em PC2. A partir dos deslocamentos químicos observados, foi possível identificar esses metabólitos com o auxílio do HMDB. Nas pacientes sem periodontite, houve um aumento nos níveis séricos de Isobutirato ( $\delta$  1,04 ppm), Celobiose ( $\delta$  3,49 ppm) e 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina ( $\delta$  3,91 ppm). Em contrapartida, nas pacientes com periodontite, os metabólitos L-arginina ( $\delta$  3,24 ppm), Desoxiguanosina ( $\delta$  3,79 ppm) e Lactato ( $\delta$  4,11 ppm) apresentaram concentrações elevadas.

No presente estudo, o isobutirato, um ácido graxo de cadeia curta, apresentou níveis séricos elevados em duas pacientes sem diagnóstico de periodontite. Evidências recentes sugerem que esse metabólito pode exercer efeitos diretos sobre células tumorais, modulando processos relacionados à progressão neoplásica (LI *et al.*, 2025). No contexto do câncer colorretal, Chen *et al.* (2023) demonstraram que o isobutirato promove metástase por meio da ativação da proteína RACK1, o que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina na

superexpressão de genes associados à migração e invasão, como *MMP2*, *MMP9* e *ICAM1*. Embora tais efeitos ainda não tenham sido diretamente investigados no câncer de mama, esses achados levantam a hipótese de que o isobutirato possa desempenhar papel semelhante em outras neoplasias, incluindo as mamárias. A elevação desse metabólito nas duas pacientes deste estudo com câncer de mama em estágios mais avançados (IIIA e IV), ambas classificadas como subtipo triplo negativo, reforça a necessidade de estudos futuros que explorem o potencial envolvimento do isobutirato na progressão e no prognóstico do câncer de mama.

Além do isobutirato, níveis elevados de celobiose também foram identificados nas pacientes previamente mencionadas. A celobiose é um dissacarídeo formado por duas unidades de glicose ligadas por uma ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica, geralmente resultante da degradação da celulose pela microbiota intestinal (JAGDALE; KAREKAR, 2020). Embora não existam evidências que associem a celobiose ao câncer de mama, sua elevação pode refletir alterações no metabolismo glicídico microbiano, particularmente em processos fermentativos mediados por bactérias do intestino grosso (HASAN; DHUNGEL; GOVIND, 2021).

De maneira semelhante, níveis elevados de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) foram detectados no soro das pacientes com câncer de mama que apresentaram os maiores escores na PC1. A L-DOPA é um aminoácido que atua como precursor da dopamina, neurotransmissor fundamental para diversas funções neurológicas (GANDHI; SAADABADI, 2025). Embora tradicionalmente associada a distúrbios neurológicos, como doença de Parkinson (ESKOW JAUNARAJS *et al.*, 2011), depressão (BEKHBAT *et al.*, 2022) e esquizofrenia (HOWES; BUKALA; BECK, 2024), alterações nos níveis de L-DOPA também podem ter implicações no contexto oncológico. Sua conversão em dopamina depende da atividade da enzima L-DOPA descarboxilase (DDC), cuja expressão elevada tem sido relacionada a melhores desfechos clínicos em pacientes com câncer de mama (TREMML *et al.*, 2020). Dessa forma, a elevação sistêmica de L-DOPA observada neste estudo pode refletir uma atividade enzimática diminuída, sugerindo uma conversão reduzida em dopamina. Esse perfil metabólico, por sua vez, pode estar associado a um comportamento tumoral mais agressivo, como o verificado nessas pacientes.

Contrariamente aos metabólitos previamente discutidos, a L-arginina esteve aumentada em três pacientes que apresentaram o diagnóstico de câncer de mama e periodontite concomitantemente. A L-arginina é um aminoácido semiessencial sintetizado predominantemente pelo ciclo da ureia, com papel fundamental na biossíntese de proteínas, poliaminas, prolina, creatina e óxido nítrico (WU *et al.*, 2016). Estudos recentes demonstram mecanismos que podem explicar essa alteração metabólica encontrada. Chen *et al.* (2023)

evidenciaram que a *P. gingivalis* expressa gingipaínas específicas de arginina (RgpA e RgpB). Essas proteases clivam proteínas da matriz extracelular liberando fragmentos ricos em resíduos de arginina, o que pode contribuir para o acúmulo local e sistêmico deste aminoácido (CHEN *et al.*, 2023). Em contraste, Wu *et al.* (2016) observaram que a suplementação com L-arginina em células epiteliais mamárias bovinas estimuladas por LPS promoveu uma redução significativa na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , indicando um possível efeito imunomodulador. Dessa forma, a L-arginina parece desempenhar um papel diversificado no contexto inflamatório, agindo simultaneamente como substrato para vias pró-inflamatórias e como modulador imunoregulador.

Além dessa alteração, os níveis séricos de 2'-desoxiguanosina, um nucleosídeo associado ao estresse oxidativo, também estavam elevados nesse grupo (TORAMAN *et al.*, 2020). A 2'-desoxiguanosina está envolvida nas respostas celulares ao estresse oxidativo, especialmente em contextos inflamatórios (KONOPKA *et al.*, 2007). Ambientes ricos em ROS, como os observados na periodontite e no câncer de mama, favorecem a oxidação de nucleosídeos, particularmente da desoxiguanosina, devido ao seu baixo potencial de ionização. Esse processo resulta na formação de derivados oxidativos, como a 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), reconhecida como um marcador sensível de dano oxidativo ao DNA (AMENTE *et al.*, 2019; GORINI *et al.*, 2021; KARWOWSKI, 2024). A presença de 8-oxodG em fluidos biológicos, como saliva, tem sido correlacionada à gravidade da periodontite e a outras condições inflamatórias intensas (KONOPKA *et al.*, 2007; TORAMAN *et al.*, 2020). O aumento da 2'-desoxiguanosina pode refletir um estado elevado de dano oxidativo, associado à ativação das vias de reparo do DNA, funcionando como um indicador indireto de estresse genômico em processos inflamatórios crônicos (GORINI *et al.*, 2021). O reparo do DNA oxidado ocorre principalmente pela via da excisão de base (BER - *Base Excision Repair*), na qual nucleosídeos oxidados, como a 8-oxodG, são substituídos por nucleosídeos não modificados, como a 2'-desoxiguanosina, o que pode resultar no aumento da concentração de nucleosídeos livres no meio extracelular (GORINI *et al.*, 2021).

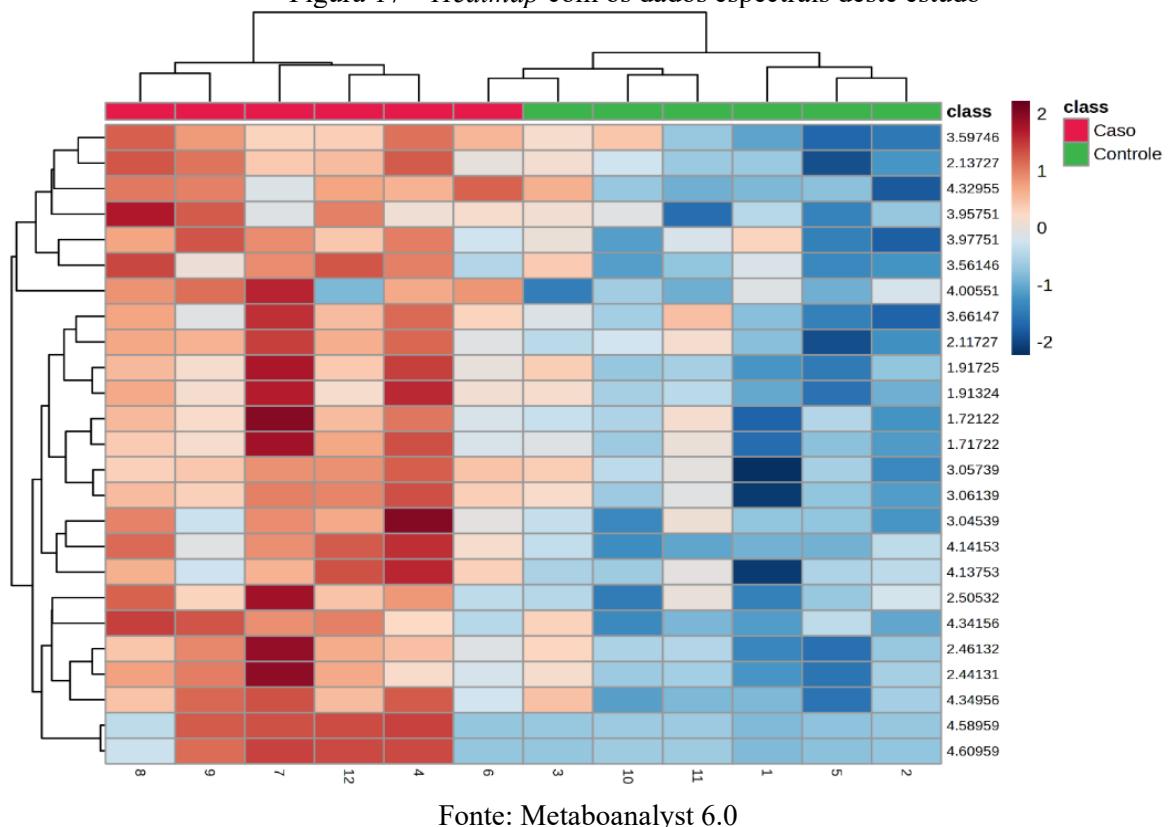
Ainda assim, a elevação dos níveis séricos de lactato observada nessas pacientes pode refletir uma interação metabólica relevante entre processos inflamatórios crônicos e progressão tumoral. Na periodontite, a presença de um microambiente inflamatório e hipóxico favorece a intensificação da glicólise anaeróbica e, consequentemente, a produção de lactato por células inflamatórias e bactérias periodontopatogênicas (ISHIKAWA *et al.*, 2021; LUO *et al.*, 2022). Estudos demonstram que as concentrações de lactato no fluido gengival crevicular de indivíduos com periodontite severa podem atingir níveis significativamente elevados em

comparação a indivíduos saudáveis, chegando a até 20 mM (QIQIANG; HUANXIN; XUEJUN, 2012). Este acúmulo de lactato local está associado à indução de mediadores inflamatórios como IL-6 e IL-8, moléculas de adesão celular (ICAM-1) e fatores de reabsorção óssea como RANKL, além de inibir a regeneração do periodonto por bloquear a diferenciação osteogênica de células-tronco periodontais (ISHIKAWA *et al.*, 2021; LUO *et al.*, 2022).

No câncer de mama, o lactato desempenha um papel bem estabelecido na progressão tumoral. Ele promove acidificação tecidual, angiogênese, evasão imunológica, metástase e resistência a tratamentos, sendo considerado um marcador de agressividade em diversos subtipos tumorais (CHEUNG *et al.*, 2020; LIBERTI; LOCASALE, 2016; PÉREZ-TOMÁS; PÉREZ-GUILLÉN, 2020). Assim, os dados deste estudo indicam que a periodontite pode contribuir para um aumento sistêmico de lactato que, por sua vez, favorece um microambiente tumoral mais permissivo à progressão do câncer de mama.

Apesar dos achados apresentados aqui estarem em consonância com dados previamente descritos na literatura, a PCA não apresentou capacidade discriminatória satisfatória para distinguir os grupos avaliados. Diante disso, optou-se por complementar a investigação utilizando uma abordagem exploratória adicional. A Figura 17 apresenta o resultado do heatmap com análise hierárquica de clusters. De modo geral, as pacientes com periodontite apresentaram níveis aumentados dos metabólitos diferenciais.

Figura 17 – Heatmap com os dados espectrais deste estudo



Fonte: Metaboanalyst 6.0

A combinação entre o agrupamento hierárquico e o *heatmap* evidenciou dois clusters principais, contendo sete amostras e cinco amostras, respectivamente. A classificação clínica prévia contou com seis amostras em cada grupo, o que diverge da classificação observada no *heatmap*. Nesse método, foi possível observar que a amostra 6, pertencente a uma paciente do grupo com periodontite, foi agrupada junto as voluntárias do grupo sem periodontite. Essa divergência sugere que o perfil metabólico desta paciente apresenta alta similaridade com os perfis característicos dos indivíduos controle.

Tal achado pode refletir um fenômeno bidirecional, no qual tanto a paciente 6, diagnosticada com periodontite, quanto a paciente 3, classificada como sem periodontite e com quem apresentou maior similaridade no perfil metabólico, compartilham características metabonômicas semelhantes, o que pode ter influenciado seu agrupamento na análise hierárquica. A paciente 6, ainda que pertencente ao grupo caso, pode apresentar um padrão menos inflamatório, possivelmente indicando uma fase controlada da doença (SOCRANSKY *et al.*, 1984). Por outro lado, a paciente 3, embora não apresentasse sinais clínicos de periodontite, possui histórico de fissura labiopalatina, uma condição capaz de alterar significativamente o microambiente oral e favorecer o desenvolvimento de disbiose (ARBOLEDA *et al.*, 2023; GHELLER *et al.*, 2021). Apesar de ter sido submetida à cirurgia corretiva durante a primeira infância, a condição continua a impactar o microbioma oral (JIANG *et al.*, 2024), não sendo descartada a possibilidade de efeitos permanentes no metaboloma.

No presente caso, a ausência de sinais clínicos de periodontite na paciente controle (amostra 3) pode ser explicada pelo entendimento atual de que a periodontite não resulta exclusivamente da presença de um biofilme disbiótico, mas também da interação complexa e contínua entre esse biofilme e fatores de susceptibilidade do hospedeiro (FENG *et al.*, 2022; HAJISHENGALLIS, 2015; PAPAPANOU *et al.*, 2018). Assim, ainda que exista uma possível predisposição funcional refletida no metaboloma, a ausência de um contexto imuno-inflamatório permissivo pode explicar a não ocorrência de destruição periodontal na paciente controle (BARTOLD; VAN DYKE, 2019; KORNMAN, 2008).

Diante disso, a convergência metabólica entre as duas participantes sugere que, embora clinicamente distintas, ambas compartilham aspectos que as colocam em uma posição intermediária entre os dois extremos definidos pela classificação original. Apesar de análises subsequentes terem sido realizadas com o intuito de elucidar os fatores responsáveis por essa discrepância (incluindo revisão da história clínica, dados demográficos e hábitos de vida), nenhuma justificativa plausível foi identificada. Esse achado destaca a complexidade do

fenótipo metabólico na população e reforça a importância de abordagens integrativas e multivariadas para a interpretação de dados ômicos (HOLMES; WILSON; NICHOLSON, 2008; SUBRAMANIAN *et al.*, 2020).

### 6.3 Identificação e Caracterização dos Metabólitos Diferenciais

As frequências espectrais obtidas das amostras de soro das pacientes com câncer de mama isolado e câncer de mama associado a periodontite foram comparadas com frequências conhecidas (HMDB) para identificar as variáveis (deslocamento químico) relevantes para a separação dos grupos. Com base nessa análise, seis metabólitos foram identificados, conforme detalhado na Tabela 4, todos apresentando níveis elevados nas pacientes com periodontite.

Tabela 4 – Identificação dos principais metabólitos discriminantes entre os grupos estudados. Todos os metabólitos listados apresentaram níveis elevados nas pacientes com periodontite.

Metabólito	$\delta$ (ppm)
L-Isoleucina	3,66
L-Valina	3,59
L-Tirosina	3,04
2'-Desoxiguanosina	2,50
4-Hidroxiprolina	2,44 – 2,46
L-Lisina	1,71 – 1,72

Fonte: Autoria própria.

De forma geral, as alterações observadas nos perfis metabólicos do soro das pacientes com periodontite associada ao câncer de mama refletem a modulação de múltiplas vias biológicas, com destaque para o metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs, do inglês *branched-chain amino acids*), metabolismo do colágeno e estresse oxidativo. No presente estudo, as pacientes com periodontite associada ao câncer de mama apresentaram um aumento da concentração de BCAAs, quando comparadas àquelas com câncer de mama de forma isolada. Os BCAAs (leucina, isoleucina e valina) são aminoácidos essenciais reconhecidos por seu papel na síntese proteica e no metabolismo celular (HYVÄRINEN; KASHYAP; KULLAA, 2023). Biossintetizados exclusivamente por plantas, fungos e bactérias, esses compostos desempenham funções metabólicas importantes tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (FRANCO; BLANCHARD, 2017; TIAN *et al.*, 2020).

No contexto da periodontite, a presença do patógeno *P. gingivalis* está associada à biossíntese endógena de BCAAs por meio da atividade da enzima BCAT (do inglês, *branched-chain amino acid aminotransferase*), elevando sua disponibilidade e intensificando a expressão

das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9 em células-tronco do ligamento periodontal (NING *et al.*, 2025). Essas enzimas são mediadoras-chave na remodelação tecidual e destruição óssea, amplificando a patogênese da periodontite por meio da regulação positiva das metaloproteinases da matriz (MMPs) e dos ligantes ativadores do receptor do fator nuclear κB (NF-κB), (NING *et al.*, 2025; TIAN *et al.*, 2020). Além disso, níveis séricos elevados de BCAAs foram observados em camundongos com periodontite experimental (TIAN *et al.*, 2020).

Paralelamente, estudos indicam que o metabolismo alterado dos BCAAs pode contribuir para o desenvolvimento de desordens metabólicas sistêmicas, incluindo resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e diferentes tipos de cânceres (LYNCH; ADAMS, 2014; NIE *et al.*, 2018). As evidências apontam que os níveis de BCAAs estão elevados em tecidos de câncer de mama (NIE *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2025; ZHANG; HAN, 2017). Esse acúmulo está associado, em parte, à superexpressão do transportador LAT1 (do inglês, *L-type Amino Acid Transporter 1*), localizado na membrana plasmática das células tumorais, que atua como um facilitador da entrada de BCAAs no citoplasma (WANG *et al.*, 2025).

Além disso, a expressão aumentada da enzima BCAT1 (do inglês, *branched-chain amino acid transaminase 1*), localizada no citosol das células tumorais, tem sido associada à ativação do catabolismo de BCAAs no câncer de mama (NIE *et al.*, 2018; ZHANG; HAN, 2017). Essas alterações no metabolismo dos BCAAs promovem a geração de glutamina e de intermediários biossintéticos, que atendem às demandas energéticas e anabólicas das células tumorais em crescimento (XU *et al.*, 2023). Tal reprogramação está intimamente associada a mutações oncogênicas, favorecendo o uso dos BCAAs como substratos para a proliferação celular, mesmo sob condições adversas de disponibilidade de nutrientes e oxigênio (NIE *et al.*, 2018). Ademais, o acúmulo de BCAAs no sangue periférico de pacientes com câncer de mama pode estar relacionado a um desequilíbrio enzimático, em que a redução na expressão ou atividade de enzimas envolvidas nas etapas posteriores do catabolismo contribui para a degradação incompleta desses aminoácidos (WANG *et al.*, 2025). No presente estudo, resultados evidenciam que esse acúmulo é mais acentuado em pacientes com a presença concomitante de periodontite e câncer de mama, o que pode sugerir uma possível influência da inflamação periodontal sobre o metabolismo sistêmico dos BCAAs.

Além das alterações sistêmicas observadas nos aminoácidos de cadeia ramificada, a lisina também se destacou como um metabólito discriminante, uma vez que sua concentração sérica apresentou elevação significativa nas pacientes com periodontite, conforme evidenciado pelo

heatmap. A lisina é um aminoácido essencial fundamental para a manutenção e renovação contínua do epitélio aderido aos dentes, o qual atua como uma barreira protetora contra os produtos microbianos no sulco gengival (LEVINE; LOHINAI, 2021). No contexto da periodontite, diversos estudos demonstram que a atividade de enzimas bacterianas, como a lisina descarboxilase (LdcE), esgota a lisina localmente ao convertê-la em cadaverina e dióxido de carbono, promovendo apoptose autofágica das células do epitélio aderido e aumentando a permeabilidade aos produtos bacterianos (DALANGIN; KIM; CAMPBELL, 2020; LEVINE; LOHINAI, 2021; WARREN *et al.*, 2024).

Esse processo leva a uma depleção significativa da lisina no biofilme subgengival, sobretudo quando há alta atividade de LdcE. Quando a concentração local de lisina cai abaixo de 0,11  $\mu\text{mol/g}$  de biofilme, o equivalente à concentração mínima de lisina no plasma humano saudável, ocorre comprometimento da adesão epitelial, diminuição da renovação celular e ativação da resposta inflamatória local (LEVINE; LOHINAI, 2021). Esse mecanismo contribui diretamente para a progressão da destruição tecidual observada na periodontite.

De maneira correlata, há evidências de que, em contextos de lesão ou inflamação aguda, o organismo pode responder com a liberação de lisina para a circulação sistêmica, elevando seus níveis no sangue periférico. Esse fenômeno já foi observado em situações de dano muscular e dietas restritivas, nas quais a proteólise local libera lisina como parte de uma resposta adaptativa precoce (ALIBRAHEM *et al.*, 2025). Tal redistribuição também pode favorecer mecanismos de proteção tecidual e controle da dor aguda (BARKER, 2014). Assim, é plausível que, diante da perda local de lisina nos tecidos periodontais, o organismo ative mecanismos compensatórios sistêmicos, como o aumento da lisina circulante, com o objetivo de preservar a integridade epitelial e modular a inflamação.

Além dos aminoácidos essenciais, a análise metabonômica também evidenciou concentrações aumentadas de aminoácidos não essenciais, como a tirosina e a 4-hidroxiprolina, no soro de pacientes com associação de câncer de mama e periodontite. A tirosina desempenha funções biológicas vitais, incluindo a síntese de neurotransmissores como dopamina, norepinefrina e epinefrina, além de hormônios da tireoide e melanina (FERNSTROM; FERNSTROM, 2007; SLOMINSKI; ZMIJEWSKI; PAWELEK, 2012). Estudos prévios, como os de Sugimoto *et al.* (2010), Barnes *et al.* (2011) e Romano *et al.* (2019), relataram níveis elevados de tirosina na saliva de pacientes com periodontite, destacando seu papel no processo de destruição tecidual. Romano *et al.* (2019), em particular, ressaltam o potencial da tirosina como biomarcador para o monitoramento da progressão da doença. A inflamação crônica promove o aumento dos níveis de tirosina, possivelmente devido à ativação imunológica e suas

repercussões no metabolismo de aminoácidos (CAPURON *et al.*, 2011; MURR *et al.*, 2014). No presente estudo, foi possível observar um aumento nos níveis de tirosina no soro de pacientes com periodontite e câncer de mama de forma simultânea, indicando uma provável amplificação das alterações metabólicas na presença dessas condições.

De forma semelhante, a análise também revelou um aumento significativo de 4-hidroxiprolina no soro das pacientes com periodontite. A 4-hidroxiprolina é um aminoácido derivado da hidroxilação pós-traducional da prolina, catalisada pela enzima prolil-4-hidroxilase durante a biossíntese do colágeno (LIOI *et al.*, 2024; SONG *et al.*, 2023). Essa modificação confere estabilidade térmica à estrutura helicoidal tripla do colágeno, importante para a manutenção de sua integridade em condições fisiológicas (SONG *et al.*, 2023). Presente em praticamente todos os tipos de colágeno, a 4-hidroxiprolina está diretamente relacionada à resistência mecânica da matriz extracelular (MEC) e à sustentação da arquitetura tecidual (GARDEAZABAL; IZETA, 2024). No contexto da fisiopatologia, tanto na periodontite quanto no câncer de mama, há uma intensa remodelação da MEC, com aumento da degradação do colágeno, o que leva ao acúmulo de 4-hidroxiprolina nos fluidos corporais (DENG; WONG; PENG, 2024; PHANG *et al.*, 2015).

Na periodontite, o processo inflamatório induz a expressão de metaloproteinases (MMPs), que degradam o colágeno e promovem a liberação de 4-hidroxiprolina na circulação (GARDEAZABAL; IZETA, 2024; DENG; WONG; PENG, 2024). Esse mecanismo também está relacionado ao aumento da concentração de prolina e de outros aminoácidos derivados do colágeno na saliva de pacientes com doença periodontal (BALCI *et al.*, 2021). De maneira semelhante, no câncer de mama, observa-se uma deposição exacerbada de colágeno, especialmente sob hipóxia tumoral, com ativação de prolil-4-hidroxilases e aumento subsequente na disponibilidade de 4-hidroxiprolina (SONG *et al.*, 2023; NECULA *et al.*, 2022). A degradação do colágeno no microambiente tumoral também participa da modulação de vias de sinalização envolvidas na migração e invasão celular (PHANG *et al.*, 2015). Em consonância com esses achados, os dados obtidos na presente pesquisa revelaram níveis elevados de 4-hidroxiprolina no soro de pacientes com periodontite associada ao câncer de mama.

No *heatmap*, a 2'-desoxiguanosina voltou a se destacar como metabólito significativamente aumentado entre as pacientes com periodontite, corroborando os achados observados na PCA. Essa associação com a periodontite já havia sido discutida anteriormente neste trabalho, reforçando a relevância desse metabólito nos processos inflamatórios e de estresse oxidativo envolvidos na doença (AMENTE *et al.*, 2019; GORINI *et al.*, 2021; KARWOWSKI, 2024; KONOPKA *et al.*, 2007).

Os resultados deste estudo reforçam a aplicabilidade da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  de alta resolução na análise metabólica de biofluidos, evidenciando seu valor como ferramenta robusta em investigações metabonômicas. Além disso, os achados contribuem ao evidenciar alterações no perfil metabólico de pacientes com periodontite associada ao câncer de mama, uma relação ainda não explorada pela literatura.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo teve como objetivo geral discriminar amostras de pacientes acometidas por câncer de mama com e sem periodontite, por meio de uma abordagem metabonômica baseada em espectroscopia de RMN. A investigação revelou diferenças marcantes nos perfis metabólicos entre os grupos analisados, sugerindo que a presença concomitante da periodontite pode influenciar o metabolismo sistêmico de pacientes com câncer de mama. Esses achados reforçam a hipótese de que processos inflamatórios crônicos orais, como a periodontite, estão associados a alterações no perfil de metabólitos endógenos, aspecto que merece ser mais profundamente explorado em estudos futuros com maior poder amostral.

No que se refere à caracterização da amostra, observou-se que, entre as 12 pacientes incluídas na pesquisa, metade apresentava sinais clínicos compatíveis com periodontite, indicando uma elevada prevalência da doença nesse grupo específico de mulheres com câncer de mama. Essa constatação reforça a necessidade de considerar condições periodontais em contextos oncológicos, especialmente diante da possibilidade de interações sistêmicas.

Adicionalmente, embora a análise descritiva tenha evidenciado padrões distintos nos parâmetros periodontais em relação às características tumorais, o tamanho reduzido da amostra limitou a possibilidade de se estabelecer correlações estatisticamente significativas.

Por fim, a análise metabonômica realizada por meio da PCA permitiu identificar metabólitos com potencial discriminatório entre os grupos, desde que considerados em conjunto. Em outras palavras: nenhum desses metabólitos isoladamente é capaz discriminar os grupos, mas podem discriminá-los se associados. Pacientes sem periodontite apresentaram maior concentração de isobutirato, celobiose e 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, enquanto aquelas com periodontite exibiram elevação de L-arginina, 2'-desoxiguanosina e lactato. Já a análise por heatmap indicou o aumento de metabólitos como 4-hidroxiprolina, L-isoleucina, L-lisina, L-tirosina e L-valina nas pacientes com periodontite, o que sugere a existência de uma assinatura metabólica específica associada à condição periodontal em mulheres com câncer de mama.

Dessa forma, os resultados apresentados oferecem evidências preliminares sobre a influência da periodontite no perfil metabólico de pacientes com câncer de mama, apontando para uma possível interação biológica entre essas duas condições crônicas. A principal contribuição teórica deste estudo reside na introdução de uma perspectiva metabonômica inédita sobre a interface entre inflamação periodontal e câncer, ampliando a compreensão das vias metabólicas envolvidas e estabelecendo fundamentos para investigações futuras.

## 8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

As principais limitações do estudo incluem o número reduzido de amostras, o que pode comprometer a generalização dos resultados. Além disso, a impossibilidade de aplicar um método supervisionado de análise de dados pode ter dificultado a identificação de padrões mais refinados entre os grupos. Outra limitação foi a inclusão de pacientes que estavam em tratamento oncológico, o que pode ter influenciado o perfil metabonômico observado.

Para futuros estudos, recomenda-se ampliar o número de amostras e incluir na pesquisa apenas pacientes que não estejam em tratamento oncológico, a fim de verificar a consistência dos resultados observados. Além disso, seria importante aplicar esses achados em coortes prospectivas, para avaliar a evolução das alterações metabólicas ao longo do tempo e em diferentes estágios das condições. Este estudo serve como um piloto que oferece resultados promissores, mas que necessita de um conjunto amostral mais robusto para validar e expandir suas conclusões.

## REFERÊNCIAS

- ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). **Wiley interdisciplinary reviews. Computational statistics**, v. 2, n. 1, p. 97–106, 2010.
- ABDULKAREEM, A. A. *et al.* Current concepts in the pathogenesis of periodontitis: from symbiosis to dysbiosis. **Journal of oral microbiology**, v. 15, n. 1, 2023.
- ABED, J. *et al.* Fap2 mediates *Fusobacterium nucleatum* colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed Gal-GalNAc. **Cell host & microbe**, v. 20, n. 2, p. 215–225, 2016.
- ABOLHASANI-ZADEH, F. *et al.* Relationship between the risk of breast cancer and periodontal disease: a case-control study. **Scientific reports**, v. 15, n. 1, p. 10518, 2025.
- ALAKWAA, F. M.; CHAUDHARY, K.; GARMIRE, L. X. Deep learning accurately predicts estrogen receptor status in breast cancer metabolomics data. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 1, p. 337–347, 2018.
- ALIBRAHEM, W. *et al.* Exploring the analgesic potential of L-lysine: Molecular mechanisms, preclinical evidence, and implications for pharmaceutical pain therapy. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 5, 2025.
- ALON-MAIMON, T.; MANDELBOIM, O.; BACHRACH, G. *Fusobacterium nucleatum* and cancer. **Periodontology 2000**, v. 89, n. 1, p. 166–180, 4 mar. 2022.
- AL-SULAITI, H. *et al.* Metabolomics approaches for the diagnosis, treatment, and better disease management of viral infections. **Metabolites**, v. 13, n. 8, p. 948, 2023.
- AL-THOUBAITY, F. K. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of medicine and surgery (2012)**, v. 49, p. 44–48, 2020.
- ÁLVAREZ-MERCADO, A. I. *et al.* Gut Microbiota and breast cancer: The dual role of microbes. **Cancers**, v. 15, n. 2, p. 443, 2023.
- AMENTE, S. *et al.* Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. **Nucleic acids research**, v. 47, n. 1, p. 221–236, 2019.
- AMIN, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93–99, 2017.
- ANDERSEN, L. W. *et al.* Etiology and therapeutic approach to elevated lactate levels. **Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic**, v. 88, n. 10, p. 1127–1140, 2013.
- ANDERSON, N. M.; SIMON, M. C. The tumor microenvironment. **Current biology: CB**, v. 30, n. 16, p. R921–R925, 2020.

ARAÚJO, R. *et al.* Infection biomarkers based on metabolomics. **Metabolites**, v. 12, n. 2, 2022.

ARAÚJO, T. *et al.* Classification of breast cancer histology images using Convolutional Neural Networks. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0177544, 2017.

ARBOLEDA, V. *et al.* Oral microbiome as a tool of systemic disease on cleft patients: A new landscape. **Cureus**, v. 15, n. 2, p. e35444, 2023.

ARNER, E. N.; RATHMELL, J. C. Metabolic programming and immune suppression in the tumor microenvironment. **Cancer cell**, v. 41, n. 3, p. 421–433, 2023.

ARORA, M. *et al.* An Exploration of Shared Genetic Risk Factors Between Periodontal Disease and Cancers: A Prospective Co-Twin Study. v. 171, n. 2, p. 253–259, 15 jan. 2010.

AZEVEDO, M. M.; PINA-VAZ, C.; BALTAZAR, F. Microbes and cancer: Friends or Faux? **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3115, 2020.

BAEZA, M. *et al.* Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. **Journal of applied oral science**, v. 28, 2020.

BAIMA, G. *et al.* Periodontitis and risk of cancer: Mechanistic evidence. **Periodontology 2000**, 2023.

BALCI, N. *et al.* Free amino acid composition of saliva in patients with healthy periodontium and periodontitis. **Clinical oral investigations**, v. 25, n. 6, p. 4175–4183, 2021.

BALTA, M. G.; LOOS, B. G.; NICU, E. A. Emerging concepts in the resolution of periodontal inflammation: A role for resolvin E1. **Frontiers in immunology**, v. 8, 2017.

BARENDRGT, D. S. *et al.* Comparison of two automated periodontal probes and two probes with a conventional readout in periodontal maintenance patients. **Journal of clinical periodontology**, v. 33, n. 4, p. 276–282, 2006.

BARKER, N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 1, p. 19–33, 2014.

BARNES, V. M. *et al.* Metabolomics reveals elevated macromolecular degradation in periodontal disease. **Journal of dental research**, v. 90, n. 11, p. 1293–1297, 2011.

BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. An appraisal of the role of specific bacteria in the initial pathogenesis of periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 46, n. 1, p. 6–11, 2019.

BATISTA, A. D. *et al.* Proton nuclear magnetic resonance-based metabonomic models for non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. **World journal of hepatology**, v. 10, n. 1, p. 105–115, 2018.

BECK, J. D. *et al.* Periodontal Medicine: 100 Years of Progress. **Journal of Dental Research**, v. 98, n. 10, p. 1053–1062, 20 ago. 2019.

- BECKONERT, O. *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, 2007.
- BEKHBAT, M. *et al.* Functional connectivity in reward circuitry and symptoms of anhedonia as therapeutic targets in depression with high inflammation: evidence from a dopamine challenge study. **Molecular psychiatry**, v. 27, n. 10, p. 4113–4121, 2022.
- BERNHARD, V. R. *et al.* Subgingival microbial profile of women with breast cancer: a cross-sectional study. **Applied Cancer Research**, v. 39, n. 1, 4 nov. 2019.
- BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 35, p. 5–26, 2012.
- BHUSHAN, A.; GONSALVES, A.; MENON, J. U. Current state of breast cancer diagnosis, treatment, and theranostics. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 5, p. 723, 2021.
- BIEDENBÄNDER, T. *et al.* Dynamic nuclear polarization for sensitivity enhancement in biomolecular solid-state NMR. **Chemical reviews**, v. 122, n. 10, p. 9738–9794, 2022.
- BOCCARD, J.; RUTLEDGE, D. N. A consensus orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) strategy for multiblock Omics data fusion. **Analytica chimica acta**, v. 769, p. 30–39, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *A saúde bucal no Sistema Único de Saúde* [recurso eletrônico]. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude\\_bucal\\_sistema\\_unico\\_saude.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_bucal_sistema_unico_saude.pdf)
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.
- BRITO, F.; CURCIO, H. F. Q.; DA SILVA FIDALGO, T. K. Periodontal disease metabolomics signatures from different biofluids: a systematic review. **Metabolomics**, v. 18, n. 11, 25 out. 2022.
- BROOKS, G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism. **Redox biology**, v. 35, n. 101454, p. 101454, 2020.
- BROWN, J. S. *et al.* Updating the definition of cancer. **Molecular cancer research: MCR**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 2023.
- BUI, F. Q. *et al.* Association between periodontal pathogens and systemic disease. **Biomedical journal**, v. 42, n. 1, p. 27–35, 2019.
- BYLESJÖ, M. *et al.* OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of chemometrics**, v. 20, n. 8–10, p. 341–351, 2006.
- CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.

CANUTO, G. A. B. *et al.* Metabolomics: Definitions, state-of-the-art and representative applications. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2017.

CAO, Y. *et al.* L-Arginine supplementation inhibits the growth of breast cancer by enhancing innate and adaptive immune responses mediated by suppression of MDSCs in vivo. **BMC cancer**, v. 16, n. 1, p. 343, 2016.

CAPURON, L. *et al.* Chronic low-grade inflammation in elderly persons is associated with altered tryptophan and tyrosine metabolism: role in neuropsychiatric symptoms. **Biological psychiatry**, v. 70, n. 2, p. 175–182, 2011.

CARDOSO, M. R. *et al.* Metabolomics by NMR combined with machine learning to predict neoadjuvant chemotherapy response for breast cancer. **Cancers**, v. 14, n. 20, p. 5055, 2022.

CASTELLI, F. A. *et al.* Metabolomics for personalized medicine: the input of analytical chemistry from biomarker discovery to point-of-care tests. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 414, n. 2, p. 759–789, 2022.

CEGLAREK, U. *et al.* Challenges and developments in tandem mass spectrometry based clinical metabolomics. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 301, n. 1–2, p. 266–271, 2009.

CHEN, C.-C. *et al.* Stratified analysis of the association between periodontitis and female breast cancer based on age, comorbidities and level of urbanization: A population-based nested case-control study. **Plos one**, v. 17, n. 7, p. e0271948–e0271948, 26 jul. 2022.

CHEN, D. *et al.* Targeting oxidative stress-mediated regulated cell death as a vulnerability in cancer. **Redox biology**, v. 84, n. 103686, p. 103686, 2025.

CHEN, H. W. *et al.* Analysis of metabolic profiles of generalized aggressive periodontitis. **Journal of periodontal research**, v. 53, n. 5, p. 894–901, 2018.

CHEN, J. *et al.* Isobutyric acid promotes colorectal cancer metastasis through activating RACK1. **Cancer science**, v. 114, n. 10, p. 3900–3913, 2023.

CHENG, R. *et al.* Periodontal inflammation recruits distant metastatic breast cancer cells by increasing myeloid-derived suppressor cells. **Oncogene**, v. 39, n. 7, p. 1543–1556, 2020.

CHEUNG, S. M. *et al.* Lactate concentration in breast cancer using advanced magnetic resonance spectroscopy. **British journal of cancer**, v. 123, n. 2, p. 261–267, 2020.

CHUNG, S.-D. *et al.* A population-based study on the associations between chronic periodontitis and the risk of cancer. **International journal of clinical oncology**, v. 21, n. 2, p. 219–223, 2016.

CIERNIKOVA, S. *et al.* Tumor microbiome – an integral part of the tumor microenvironment. **Frontiers in oncology**, v. 12, 2022.

CLEREHUGH, V.; TUGNAIT, A. Diagnosis and management of periodontal diseases in children and adolescents. **Periodontology 2000**, v. 26, p. 146–168, 2001.

- COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 8S, p. 1569–1576, 2008.
- CONDOR, A.-M. *et al.* Metabolomics analysis as a tool in periodontitis diagnosis: A systematic review. **Clinical and experimental dental research**, v. 11, n. 1, p. e70095, 2025.
- CORBELLA, S. *et al.* Is periodontitis a risk indicator for cancer? A meta-analysis. **PLoS one**, v. 13, n. 4, p. e0195683, 2018.
- CURTIS, M. A.; DIAZ, P. I.; VAN DYKE, T. E. The role of the microbiota in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 14–25, 2020.
- DALAMAGA, M. Clinical metabolomics: Useful insights, perspectives and challenges. **Metabolism open**, v. 22, p. 100290, 2024.
- DALANGIN, R.; KIM, A.; CAMPBELL, R. E. The role of amino acids in neurotransmission and fluorescent tools for their detection. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 17, p. 6197, 2020.
- DEBIK, J. *et al.* Assessing treatment response and prognosis by serum and tissue metabolomics in breast cancer patients. **Journal of proteome research**, v. 18, n. 10, p. 3649–3660, 2019.
- DENG, Q.; WONG, H. M.; PENG, S. Salivary and gingival crevicular fluid biomarkers of periodontal health and/or obesity among children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. **Heliyon**, v. 10, n. 1, p. e23782, 2024.
- DHUP, S. *et al.* Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. **Current pharmaceutical design**, v. 18, n. 10, p. 1319–1330, 2012.
- DÍAZ, C. *et al.* Predicting dynamic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a novel metabolomics approach. **Molecular oncology**, v. 16, n. 14, p. 2658–2671, 2022.
- DIZDAR, O. *et al.* Increased cancer risk in patients with periodontitis. **Current medical research and opinion**, v. 33, n. 12, p. 2195–2200, 2017.
- DONA, A. C. *et al.* A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 14, p. 135–153, 2016.
- DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, abr. 2005.
- EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of surgical oncology**, v. 17, n. 6, p. 1471–1474, 2010.
- ELABDEEN, H. R. Z. *et al.* Ratio of pro-resolving and pro-inflammatory lipid mediator precursors as potential markers for aggressive periodontitis. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e70838, 2013.

- ELLIS, D. I. *et al.* Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 9, p. 1243–1266, 2007.
- ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. **Histopathology** 1991; 19; 403–410: AUTHOR COMMENTARY. **Histopathology**, v. 41, n. 3a, p. 151–151, 2002.
- EMWAS, A.-H. *et al.* NMR spectroscopy for metabolomics research. **Metabolites**, v. 9, n. 7, p. 123, 2019.
- EMWAS, A.-H. M. *et al.* NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. **Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society**, v. 9, n. 5, p. 1048–1072, 2013.
- ESKOW JAUNARAJS, K. L. *et al.* Potential mechanisms underlying anxiety and depression in Parkinson's disease: consequences of l-DOPA treatment. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 35, n. 3, p. 556–564, 2011.
- FARHAT, Z. *et al.* Periodontal disease and breast cancer risk: Results from the Nurses' Health Study. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 30, n. 9, p. 1757–1760, 2021.
- FENG, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018.
- FENG, Y. *et al.* Role of interleukin-17A in the pathomechanisms of periodontitis and related systemic chronic inflammatory diseases. **Frontiers in immunology**, v. 13, 2022.
- FERNSTROM, J. D.; FERNSTROM, M. H. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **The journal of nutrition**, v. 137, n. 6 Suppl 1, p. 1539S–1547S; discussion 1548S, 2007.
- FIEHN, O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. **Comparative and functional genomics**, v. 2, n. 3, p. 155–168, 2001.
- FIGUEROA, R. L. *et al.* Predicting sample size required for classification performance. **BMC medical informatics and decision making**, v. 12, n. 1, p. 8, 2012.
- FONTANA, C.; WIDMALM, G. Primary structure of glycans by NMR spectroscopy. **Chemical reviews**, v. 123, n. 3, p. 1040–1102, 2023.
- FRANCO, T. M. A.; BLANCHARD, J. S. Bacterial branched-chain amino acid biosynthesis: Structures, mechanisms, and drugability. **Biochemistry**, v. 56, n. 44, p. 5849–5865, 2017.
- FREUDENHEIM, J. L. *et al.* Periodontal disease and breast cancer: Prospective cohort study of postmenopausal women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 25, n. 1, p. 43–50, 2015.

FUJIWARA, N. *et al.* Involvement of *Fusobacterium* Species in Oral Cancer Progression: A Literature Review Including Other Types of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6207, 27 ago. 2020.

GABA, F. I.; GONZÁLEZ, R. C.; MARTÍNEZ, R. G. The role of oral *Fusobacterium nucleatum* in female breast cancer: A systematic review and meta-analysis. **International journal of dentistry**, v. 2022, p. 1–12, 2022.

GANDHI, K. R.; SAADABADI, A. Levodopa (L-dopa). Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025.

GARDEAZABAL, L.; IZETA, A. Elastin and collagen fibres in cutaneous wound healing. **Experimental dermatology**, v. 33, n. 3, p. e15052, 2024.

GEERTS, S. O. *et al.* Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. **Journal of periodontology**, v. 73, n. 1, p. 73–78, 2002.

GENCO, R. J.; BORGNAKKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 59–94, 2013.

GENCO, R. J.; SANZ, M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 7–13, 2020.

GHELLER, S. DE A. P. *et al.* Periodontal findings in children and adolescents with cleft lip and/or palate: A case-control study. **Pediatric dentistry**, v. 43, n. 2, p. 133–139, 2021.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of oncology**, v. 22, n. 8, p. 1736–1747, 2011.

GORINI, F. *et al.* Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. **DNA repair**, v. 97, n. 103027, p. 103027, 2021.

GREENACRE, M. *et al.* Principal component analysis. **Nature reviews. Methods primers**, v. 2, n. 1, p. 1–21, 2022.

GROMSKI, P. S. *et al.* A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis – a marriage of convenience or a shotgun wedding. **Analytica chimica acta**, v. 879, p. 10–23, 2015.

GUO, X. *et al.* Bioinspired peptide adhesion on Ti implants alleviates wear particle-induced inflammation and improves interfacial osteogenesis. **Journal of colloid and interface science**, v. 605, p. 410–424, 2022.

GUO, X.; YU, K.; HUANG, R. The ways *Fusobacterium nucleatum* translocate to breast tissue and contribute to breast cancer development. **Molecular oral microbiology**, v. 39, n. 1, p. 1–11, 2024.

GUSMÃO, T. P. L.; ALVES, F. A. Atendimento odontológico ao paciente durante e após o tratamento oncológico. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO.

UNIVERSIDADE ABERTA DO SUS. Assistência odontológica para pacientes com Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) na Atenção Primária à Saúde (APS). Assistência odontológica para pacientes com DCNT: pacientes com câncer. São Luís: UFMA; UNA-SUS, 2020.

GÜVEN, D. C. *et al.* Evaluation of cancer risk in patients with periodontal diseases. **Turkish journal of medical sciences**, v. 49, n. 3, p. 826–831, 2019.

HADI, N. I. *et al.* Serum metabolomic profiles for breast cancer diagnosis, grading and staging by gas chromatography-mass spectrometry. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciencia rural**, v. 39, n. 4, p. 1275–1283, 2009.

HAJISHENGALLIS, G. Interconnection of periodontal disease and comorbidities: Evidence, mechanisms, and implications. **Periodontology 2000**, v. 89, n. 1, p. 9–18, 2022.

HAJISHENGALLIS, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. **Nature reviews. Immunology**, v. 15, n. 1, p. 30–44, 2015.

HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. **Nature reviews. Immunology**, v. 21, n. 7, p. 426–440, 2021.

HAJISHENGALLIS, G.; KOROSTOFF, J. M. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. **Periodontology 2000**, v. 75, n. 1, p. 116–151, 2017.

HAMP, S. E.; NYMAN, S.; LINDHE, J. Periodontal treatment of multirooted teeth. Results after 5 years. **Journal of clinical periodontology**, v. 2, n. 3, p. 126–135, 1975.

HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: New dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HANNEMANN, J. *et al.* L-arginine dependence of breast cancer - molecular subtypes matter. **BMC cancer**, v. 25, n. 1, p. 546, 2025.

HARBECK, N. *et al.* Breast cancer. **Nature reviews. Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 1–31, 2019.

HATANAKA, K. *et al.* Enzymatic measurement of short-chain fatty acids and application in periodontal disease diagnosis. **PLoS one**, v. 17, n. 7, p. e0268671, 2022.

HENRY, N. *et al.* Short chain fatty acids taken at time of thrombectomy in Acute Ischemic Stroke patients are independent of stroke severity but associated with inflammatory markers and worse symptoms at discharge. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 797302, 2021.

- HERRERA, D. *et al.* Adjunctive effect of locally delivered antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. **Journal of clinical periodontology**, v. 47, n. S22, p. 239–256, 2020.
- HIEKEN, T. J. *et al.* The microbiome of aseptically collected human breast tissue in benign and malignant disease. **Scientific reports**, v. 6, p. 30751, 2016.
- HIRATA, E.; SAHAI, E. Tumor microenvironment and differential responses to therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 7, p. a026781, 2017.
- HOARE, A. *et al.* Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. **Mediators of Inflammation**, v. 2019, p. 1–14, 27 mar. 2019.
- HOCH, T. *et al.* Multiplexed imaging mass cytometry of the chemokine milieus in melanoma characterizes features of the response to immunotherapy. **Science immunology**, v. 7, n. 70, p. eabk1692, 2022.
- HOLMES, E.; WILSON, I. D.; NICHOLSON, J. K. Metabolic phenotyping in health and disease. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 714–717, 2008.
- HOPKINS, S. *et al.* Oral health and cardiovascular disease. **The American journal of medicine**, v. 137, n. 4, p. 304–307, 2024.
- HOWES, O. D.; BUKALA, B. R.; BECK, K. Schizophrenia: from neurochemistry to circuits, symptoms and treatments. **Nature reviews. Neurology**, v. 20, n. 1, p. 22–35, 2024.
- HUANG, K. *et al.* Systematic review of NMR-based metabolomics practices in human disease research. **Metabolites**, v. 12, n. 10, p. 963, 2022.
- HUJOEL, P. P. *et al.* An Exploration of the Periodontitis–Cancer Association. **Annals of Epidemiology**, v. 13, n. 5, p. 312–316, maio 2003.
- HYVÄRINEN, E. *et al.* Salivary metabolomics for diagnosis and monitoring diseases: Challenges and possibilities. **Metabolites**, v. 11, n. 9, p. 587, 2021.
- HYVÄRINEN, E.; KASHYAP, B.; KULLAA, A. M. Oral sources of salivary metabolites. **Metabolites**, v. 13, n. 4, p. 498, 2023.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Cartilha sobre câncer de mama*. 2022. Disponível em:  
[https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/cartilha\\_cancer\\_de\\_mama\\_2022\\_visualizacao.pdf](https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/cartilha_cancer_de_mama_2022_visualizacao.pdf).
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em:  
<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>
- ISHIKAWA, T. *et al.* The role of lactic acid on wound healing, cell growth, cell cycle kinetics, and gene expression of cultured junctional epithelium cells in the pathophysiology of periodontal disease. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1507, 2021.

- ISSRANI, R. *et al.* Periodontitis as a Risk Factor for Breast Cancer – What We Know Till Date? **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 10, p. 3109–3114, 1 out. 2021.
- JAGDALE, S.; KAREKAR, S. Bird's eye view on aquosome: Formulation and application. **Journal of drug delivery science and technology**, v. 58, n. 101776, p. 101776, 2020.
- JAKUBOVICS, N. S. *et al.* The dental plaque biofilm matrix. **Periodontology 2000**, v. 86, n. 1, p. 32–56, 2021.
- JAYARAMAN, V. *et al.* Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 9, p. 1195–1204, 26 jun. 2014.
- JIA, M. *et al.* The association between periodontal disease and breast cancer in a prospective cohort study. **Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)**, v. 13, n. 12, p. 1007–1016, 2020.
- JIANG, W. *et al.* Investigating oral microbiome profiles in patients with cleft lip and palate compared with the healthy control. **BMC oral health**, v. 24, n. 1, p. 623, 2024.
- JUNOT, C. *et al.* High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways. **Mass spectrometry reviews**, v. 33, n. 6, p. 471–500, 2014.
- KANAAN, Y. *et al.* Metabolic profile of triple-negative breast cancer in African-American women reveals potential biomarkers of aggressive disease. **Cancer genomics & proteomics**, v. 11, n. 6, p. 279–294, 2014.
- KAPLAN, J. B. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 205–218, 2010.
- KARWOWSKI, B. T. The Influence of 2'-Deoxyguanosine Lesions on the Electronic Properties of <sup>OXO</sup>G:::C Base Pairs in Ds-DNA: A Comparative Analysis of Theoretical Studies. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 29, n. 16, p. 3756, 2024.
- KASSEBAUM, N. J. *et al.* Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. **Journal of dental research**, v. 93, n. 11, p. 1045–53, 2014.
- KEESING, S.; ROSENWAX, L.; McNAMARA, B. The implications of women's activity limitations and role disruptions during breast cancer survivorship. **Women's health (London, England)**, v. 14, p. 174550571875638, 2018.
- KEY, T. J. *et al.* Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. **The lancet oncology**, v. 14, n. 10, p. 1009–1019, 2013.
- KIM, K. *et al.* Trace amounts of antibiotic altered metabolomic and microbial profiles of weaned pigs infected with a pathogenic E. coli. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 59, 2022.
- KOKOL, P.; KOKOL, M.; ZAGORANSKI, S. Machine learning on small size samples: A synthetic knowledge synthesis. **Science progress**, v. 105, n. 1, p. 368504211029777, 2022.

KONOPKA, T. *et al.* Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. **Archivum immunologiae et therapiæ experimentalis**, v. 55, n. 6, p. 417–422, 2007.

KORNMAN, K. S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. **Journal of periodontology**, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1560–1568, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. *Robbins & Cotran - Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 10. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2023.

KURITA-OCHIAI, T. *et al.* Butyric acid induces apoptosis in inflamed fibroblasts. **Journal of dental research**, v. 87, n. 1, p. 51–55, 2008.

LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature reviews. Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 745–759, 2018.

LEVINE, M.; LOHINAI, Z. M. Resolving the contradictory functions of lysine decarboxylase and butyrate in periodontal and intestinal diseases. **Journal of clinical medicine**, v. 10, n. 11, p. 2360, 2021.

LI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British journal of cancer**, v. 93, n. 9, p. 1046–1052, 2005.

LI, G. *et al.* *Fusobacterium nucleatum*-derived small extracellular vesicles facilitate tumor growth and metastasis via TLR4 in breast cancer. **BMC cancer**, v. 23, n. 1, p. 473, 2023.

LI, S. *et al.* Short-chain fatty acids and cancer. **Trends in cancer**, v. 11, n. 2, p. 154–168, 2025.

LIAO, C. *et al.* Tumor hypoxia: From basic knowledge to therapeutic implications. **Seminars in cancer biology**, v. 88, p. 172–186, 2023.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How does it benefit cancer cells? **Trends in biochemical sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 2016.

LIETZAN, A. D. *et al.* Microbial  $\beta$ -glucuronidases drive human periodontal disease etiology. **Science advances**, v. 9, n. 18, p. eadg3390, 2023.

LIOI, M. *et al.* Chromatographic separation by RPLC-ESI-MS of all hydroxyproline isomers for the characterization of collagens from different sources. **Journal of chromatography A**, v. 1720, n. 464771, p. 464771, 2024.

LITTLE, A. *et al.* *Fusobacterium nucleatum*: a novel immune modulator in breast cancer? **Expert reviews in molecular medicine**, v. 25, n. e15, 2023.

LOOS, B. G.; VAN DYKE, T. E. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 26–39, 2020.

ŁUKASIEWICZ, S. *et al.* Breast cancer—epidemiology, risk factors, classification, prognostic markers, and current treatment strategies—an updated review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, 2021.

LUO, Y. *et al.* Lactate inhibits osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via autophagy through the MCT1-mTOR signaling pathway. **Bone**, v. 162, n. 116444, p. 116444, 2022.

LYNCH, C. J.; ADAMS, S. H. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 723–736, 2014.

LYRA, W. DA S. *et al.* Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Quimica nova**, v. 33, n. 7, p. 1594–1597, 2010.

MA, L.-N. *et al.* Lactic acid: A novel signaling molecule in early pregnancy? **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 279, 2020.

MA, X. *et al.* Periodontal health related–inflammatory and metabolic profiles of patients with end-stage renal disease: potential strategy for predictive, preventive, and personalized medicine. **The EPMA journal**, v. 12, n. 2, p. 117–128, 2021.

MAMAS, M. *et al.* The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 1, p. 5–17, 2011.

MAO, C. *et al.* Circulating metabolites serve as diagnostic biomarkers for HER2-positive breast cancer and have predictive value for trastuzumab therapy outcomes. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 36, n. 2, p. e24212, 2022.

MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS NETO, T. L. Atividade física e envelhecimento: aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 1, p. 2–13, 2001.

MAYR, M. Metabolomics: Ready for the prime time? **Circulation. Cardiovascular genetics**, v. 1, n. 1, p. 58–65, 2008.

MCGUIRE, A. *et al.* Effects of age on the detection and management of breast cancer. **Cancers**, v. 7, n. 2, p. 908–929, 2015.

Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 24, n. 4, p. 285–294, 2005.

MØRCH, L. S. *et al.* Contemporary hormonal contraception and the risk of breast cancer. **The New England journal of medicine**, v. 377, n. 23, p. 2228–2239, 2017.

MOSKOWITZ, C. S. *et al.* Breast Cancer After Chest Radiation Therapy for Childhood Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 21, p. 2217–2223, 20 jul. 2014.

MOURA, C.; VALE, N. The role of dopamine in repurposing drugs for oncology. **Biomedicines**, v. 11, n. 7, p. 1917, 2023.

MÜHLEMANN, H. R.; SON, S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. **Helvetica odontologica acta**, v. 15, n. 2, p. 107–113, 1971.

MURR, C. *et al.* Immune activation and inflammation in patients with cardiovascular disease are associated with higher phenylalanine to tyrosine ratios: the ludwigshafen risk and cardiovascular health study. **Journal of amino acids**, v. 2014, p. 783730, 2014.

NAKAMURA, H.; TAKADA, K. Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. **Cancer science**, v. 112, n. 10, p. 3945–3952, 2021.

NASCIMENTO, G. G.; ALVES-COSTA, S.; ROMANDINI, M. Burden of severe periodontitis and edentulism in 2021, with projections up to 2050: The Global Burden of Disease 2021 study. **Journal of periodontal research**, v. 59, n. 5, p. 823–867, 2024.

NASCIMENTO, R. G.; OTONI, K. M. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, São Paulo, v. 30, n. 0, p. 1-8, jun. 2020.

NECULA, L. *et al.* Collagen family as promising biomarkers and therapeutic targets in cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 20, p. 12415, 2022.

NEJMAN, D. *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type–specific intracellular bacteria. **Science (New York, N.Y.)**, v. 368, n. 6494, p. 973–980, 2020.

NELSON, H. D. *et al.* Effectiveness of breast cancer screening: Systematic review and meta-analysis to update the 2009 U.s. preventive services task force recommendation. **Annals of internal medicine**, v. 164, n. 4, p. 244, 2016.

NETO, F. T. L. *et al.* <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics for infertility diagnosis in men with varicocele. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 37, n. 9, p. 2233–2247, 2020.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054–1056, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, jan. 1999.

NIE, C. *et al.* Branched chain amino acids: Beyond nutrition metabolism. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, 2018.

NING, X. *et al.* Branched-chain amino acids promote gelatinase secretion from human periodontal ligament stem cells through nuclear factor kappa-B signaling. **Archives of oral biology**, n. 106297, p. 106297, 2025.

NOLAN, E.; LINDEMAN, G. J.; VISVADER, J. E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1708–1728, 2023.

NWIZU, N. N. *et al.* Periodontal disease and incident cancer risk among postmenopausal women: Results from the women’s health initiative observational cohort. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1255–1265, 2017.

NWIZU, N.; WACTAWSKI-WENDE, J.; GENCO, R. J. Periodontal disease and cancer: Epidemiologic studies and possible mechanisms. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 213–233, 8 maio 2020.

OBEAGU, E. I.; OBEAGU, G. U. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine**, v. 103, n. 3, p. e36905, 2024.

OFFENBACHER, S. *et al.* Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **Journal of periodontology**, v. 67, n. 10S, p. 1103–1113, 1996.

OLIVEIRA, M.F.; ALBUQUERQUE-NETO, M.C.; LEITE, T.S. *et al.* Performance evaluate of different chemometrics formalisms used for prostate cancer diagnosis by NMR-based metabolomics. **Metabolomics**, 20, 8, 2024.

ORLANDI, M.; GRAZIANI, F.; D'AIUTO, F. Periodontal therapy and cardiovascular risk. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 107–124, 2020.

PAN, W.; WANG, Q.; CHEN, Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. **International journal of oral science**, v. 11, n. 3, 2019.

PAPAPANOU, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of periodontology**, v. 89, n. S1, 2018.

PARHI, L. *et al.* Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2020.

PARK, K. G. *et al.* Stimulation of human breast cancers by dietary L-arginine. **Clinical science (London, England: 1979)**, v. 82, n. 4, p. 413–417, 1992.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 2012.

PÉREZ-TOMÁS, R.; PÉREZ-GUILLÉN, I. Lactate in the tumor microenvironment: An essential molecule in cancer progression and treatment. **Cancers**, v. 12, n. 11, p. 3244, 2020.

PHANG, J. M. *et al.* Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 18, n. 1, p. 71–77, 2015.

POLLET, R. M. *et al.* An atlas of  $\beta$ -glucuronidases in the human intestinal microbiome. **Structure (London, England: 1993)**, v. 25, n. 7, p. 967- 977.e5, 2017.

PONTES, T. A. *et al.* Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomics. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217348, 2019.

PUSSINEN, P. J. *et al.* Periodontitis and cardiometabolic disorders: The role of lipopolysaccharide and endotoxemia. **Periodontology 2000**, v. 89, n. 1, p. 19–40, 2022.

PUTRI, S. P. *et al.* Current metabolomics: practical applications. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 115, n. 6, p. 579–589, 2013.

QIQIANG, L.; HUANXIN, M.; XUEJUN, G. Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy: Volatile fatty acids in gingival crevicular fluid. **Journal of periodontal research**, v. 47, n. 6, p. 740–749, 2012.

RATHER, I. H.; KUMAR, S.; GANDOMI, A. H. Breaking the data barrier: a review of deep learning techniques for democratizing AI with small datasets. **Artificial intelligence review**, v. 57, n. 9, 2024.

RHEE, E. P.; GERSZTEN, R. E. Metabolomics and cardiovascular biomarker discovery. **Clinical chemistry**, v. 58, n. 1, p. 139–147, 2012.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nature biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 303–304, 2008.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in Toxicology: A Review. **Toxicological Sciences**, v. 85, n. 2, p. 809–822, 2 fev. 2005.

ROMANO, F. *et al.* Effect of non-surgical periodontal therapy on salivary metabolic fingerprint of generalized chronic periodontitis using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Archives of oral biology**, v. 97, p. 208–214, 2019.

RUIZ-PEREZ, D. *et al.* So you think you can PLS-DA? **BMC bioinformatics**, v. 21, n. S1, 2020.

SANARA, P. P. *et al.* Comparative analysis of gingival crevicular fluid  $\beta$ -glucuronidase levels in health, chronic gingivitis and chronic periodontitis. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 7, n. Suppl 2, p. S660-5, 2015.

SAN-MILLÁN, I.; BROOKS, G. A. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 2, p. 119–133, 2017.

SANZ, M. *et al.* Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. **Journal of clinical periodontology**, v. 47, n. 3, p. 268–288, 2020.

SANZ, M. *et al.* Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. **Diabetes research and clinical practice**, v. 137, p. 231–241, 2018.

SCHMIDT, D. R. *et al.* Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 4, p. 333–358, 2021.

SFREDDO, Camila S. *et al.* Periodontitis and breast cancer: a case-control study. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 45, n. 6, p. 545-551, 2017.

SHAO, J. *et al.* Periodontal Disease and Breast Cancer: A Meta-Analysis of 1,73,162 Participants. **Frontiers in Oncology**, v. 8, 12 dez. 2018.

SHI, T. *et al.* Periodontal disease and susceptibility to breast cancer: A meta-analysis of observational studies. **Journal of clinical periodontology**, v. 45, n. 9, p. 1025–1033, 2018.

SHIRASUGI, M. *et al.* Relationship between periodontal disease and butyric acid produced by periodontopathic bacteria. **Inflammation and regeneration**, v. 38, n. 1, p. 23, 2018.

SLOMINSKI, A.; ZMIJEWSKI, M. A.; PAWELEK, J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions: L-tyrosine and L-DOPA as bioregulators. **Pigment cell & melanoma research**, v. 25, n. 1, p. 14–27, 2012.

SOCRANSKY, S. S. *et al.* New concepts of destructive periodontal disease. **Journal of clinical periodontology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 1984.

SÖDER, B. *et al.* Periodontal disease may associate with breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 127, n. 2, p. 497–502, 2011.

SONG, M. *et al.* Increased expression of collagen prolyl hydroxylases in ovarian cancer is associated with cancer growth and metastasis. **American journal of cancer research**, v. 13, n. 12, p. 6051–6062, 2023.

SOUSA, J. R.; DARTORA, C. A. Um estudo didático da dinâmica de spins. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 43, p. e20210099, 2021.

SUBRAMANIAN, I. *et al.* Multi-omics data integration, interpretation, and its application. **Bioinformatics and biology insights**, v. 14, p. 1177932219899051, 2020.

SUGIMOTO, M. *et al.* Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. **Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society**, v. 6, n. 1, p. 78–95, 2010.

TEUGHELS, W. *et al.* Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. **Journal of clinical periodontology**, v. 47 Suppl 22, n. S22, p. 257–281, 2020.

THARWAT, A. *et al.* Linear discriminant analysis: A detailed tutorial. **AI Communications. The European Journal on Artificial Intelligence**, v. 30, n. 2, p. 169–190, 2017.

TIAN, J. *et al.* Porphyromonas gingivalis induces insulin resistance by increasing BCAA levels in mice. **Journal of dental research**, v. 99, n. 7, p. 839–846, 2020.

TONETTI, M. S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K. S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of Periodontology**, v. 89, n. 1, p. S159–S172, jun. 2018.

TORAMAN, A. *et al.* Effects of vitamin C local application on ligature-induced periodontitis in diabetic rats. **Journal of applied oral science**, v. 28, p. e20200444, 2020.

TRAYES, K. P.; COKENAKES, S. E. H. Breast Cancer Treatment. **American Family Physician**, v. 104, n. 2, p. 171–178, 1 ago. 2021.

TREMMEL, E. *et al.* L-dopa-decarboxylase (DDC) is a positive prognosticator for breast cancer patients and epinephrine regulates breast cancer cell (MCF7 and T47D) growth in vitro according to their different expression of GI- protein- coupled receptors. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 24, p. 9565, 2020.

TSUKASAKI, M.; TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: evolving concepts in bone–immune interactions in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 19, n. 10, p. 626–642, 2019.

- VABALAS, A. *et al.* Machine learning algorithm validation with a limited sample size. **PloS one**, v. 14, n. 11, p. e0224365, 2019.
- VAN DER MERWE, M. *et al.* The onco-immunological implications of *Fusobacterium nucleatum* in breast cancer. **Immunology letters**, v. 232, p. 60–66, 2021.
- VARGAS-VILLAFUERTE, K. R. *et al.* Preliminary results of non-surgical periodontal treatment in patients with breast cancer undergoing chemotherapy. **Journal of periodontology**, v. 87, n. 11, p. 1268–1277, 2016.
- VETTORE, M. V.; MARQUES, R. A. de A.; PERES, M. A. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBrasil 2010: abordagem multinível. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, supl. 3, p. 29–39, 2013.
- WANG, L. *et al.* Multiple roles of branched-chain amino acid metabolism in tumour progression. **Journal of biomedical science**, v. 32, n. 1, p. 41, 2025.
- WARREN, G. *et al.* Discovery and preclinical evaluation of a novel inhibitor of FABP5, ART26.12, effective in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. **The journal of pain: official journal of the American Pain Society**, v. 25, n. 7, p. 104470, 2024.
- WISHART, D. S. Metabolomics for investigating physiological and pathophysiological processes. **Physiological reviews**, v. 99, n. 4, p. 1819–1875, 2019.
- WOLD, S. *et al.* Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. **Chemometrics and intelligent laboratory systems: an international journal sponsored by the Chemometrics Society**, v. 44, n. 1–2, p. 175–185, 1998.
- WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate analysis in metabolomics. **Current metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92–107, 2013.
- WORLEY, B.; POWERS, R. PCA as a practical indicator of OPLS-DA model reliability. **Current metabolomics**, v. 4, n. 2, p. 97–103, 2016.
- WU, C. Z. *et al.* Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. **BMC oral health**, v. 20, n. 1, 2020.
- WU, Z. *et al.* The association between poor oral health and risk of breast cancer in the UK Biobank. **Cancer causes & control: CCC**, v. 34, n. 6, p. 491–494, 2023.
- XU, E. *et al.* Branched-chain amino acids catabolism and cancer progression: focus on therapeutic interventions. **Frontiers in oncology**, v. 13, p. 1220638, 2023.
- YAMADA, M. *et al.* Predictive analysis of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy through plasma metabolomics. **Breast cancer research and treatment**, v. 207, n. 2, p. 393–404, 2024.
- ZHANG, L.; HAN, J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated mitochondrial biogenesis and function. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 486, n. 2, p. 224–231, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* The relationship between periodontal disease and breast cancer: From basic mechanism to clinical management and prevention. **Oral health & preventive dentistry**, v. 21, p. 49–60, 2023.

ZHAO, S. *et al.* Linear discriminant analysis. **Nature reviews. Methods primers**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2024.

ZHU, F. *et al.* Neighborhood linear discriminant analysis. **Pattern recognition**, v. 123, n. 108422, p. 108422, 2022.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÉNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL



### CONSUMO DE BEBIDA ALCOÓLICA

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

#### QUESTIONÁRIO CAGE

**C – (cut down)** – Alguma vez sentiu que deveria diminuir a quantidade de bebida ou parar de beber?

0 – ( ) não 1 – ( ) sim

**A – (annoyed)** – As pessoas o (a) aborrecem porque criticam o seu modo de beber?

0 – ( ) não 1 – ( ) sim

**G – (guilty)** – Se sente culpado (a) pela maneira com que costuma beber?

0 – ( ) não 1 – ( ) sim

**E – (eye opened)** – Costuma beber pela manhã (ao acordar), para diminuir o nervosismo ou a ressaca?

0 – ( ) não 1 – ( ) sim

**Resultado:** Se CAGE  $\geq 2$ , resultado do questionário AUDIT (*Alcohol Use Disorders Identification Test*)

#### QUESTIONÁRIO AUDIT

**1. Com que frequência consome bebidas que contêm álcool?** [Escreva o número que melhor corresponde à sua situação.]

0 = nunca

1 = uma vez por mês ou menos

2 = duas a quatro vezes por mês

3 = duas a três vezes por semanas

4 = quatro ou mais vezes por semana

**2. Quando bebe, quantas bebidas contendo álcool consome num dia normal?**

0 = uma ou duas

1 = três ou quatro

2 = cinco ou seis

3 = de sete a nove

4 = dez ou mais

**3. Com que frequência consome seis bebidas ou mais numa única ocasião?**

0 = nunca

1 = menos de uma vez por mês

2 = pelo menos uma vez por mês

3 = pelo menos uma vez por semana

4 = diariamente ou quase diariamente

**4. Nos últimos 12 meses, com que frequência se apercebeu de que não conseguia parar de beber depois de começar?**

0 = nunca

1 = menos de uma vez por mês

2 = pelo menos uma vez por mês

3 = pelo menos uma vez por semana

4 = diariamente ou quase diariamente

**5. Nos últimos 12 meses, com que frequência não conseguiu cumprir as tarefas que habitualmente lhe exigem por ter bebido?**

0 = nunca

1 = menos de uma vez por mês

2 = pelo menos uma vez por mês

3 = pelo menos uma vez por semana

4 = diariamente ou quase diariamente



**6. Nos últimos 12 meses, com que frequência precisou beber logo de manhã para “curar” uma ressaca?**

- 0 = nunca  
1 = menos de uma vez por mês  
2 = pelo menos uma vez por mês  
3 = pelo menos uma vez por semana  
4 = diariamente ou quase diariamente

**7. Nos últimos 12 meses, com que frequência teve sentimento de culpa ou de remorsos por ter bebido?**

- 0 = nunca  
1 = menos de uma vez por mês  
2 = pelo menos uma vez por mês  
3 = pelo menos uma vez por semana  
4 = diariamente ou quase diariamente

**8. Nos últimos 12 meses, com que frequência não se lembrou do que aconteceu na noite anterior por causa de ter bebido?**

- 0 = nunca  
1 = menos de uma vez por mês  
2 = pelo menos uma vez por mês  
3 = pelo menos uma vez por semana  
4 = diariamente ou quase diariamente

**9. Já alguma vez ficou ferido ou ficou alguém ferido por você ter bebido?**

- 0 = não  
1 = sim, mas não nos últimos 12 meses  
2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

**10. Já alguma vez um familiar, amigo, médico ou profissional de saúde manifestou preocupação pelo seu consumo de álcool ou sugeriu que deixasse de beber?**

- 0 = não  
1 = sim, mas não nos últimos 12 meses  
2 = sim, aconteceu nos últimos 12 meses

**Obs.:** Preencha as questões 2 e 3, transformando as quantidades em “doses”:

- **CERVEJA:** 1 copo (de chope – 350ml), 1 lata – 1 “DOSE” ou garrafa – 2 “DOSES”
- **VINHO:** 1 copo comum grande (250ml) – 2 “DOSES” – 2 “DOSES” ou 1 garrafa – 8 “DOSES”
- **CACHAÇA, VODCA, UÍSQUE ou CONHAQUE:** 1 “martelinho” (60ml) – 2 “DOSES” 1 “martelo” (100ml) – 3 “DOSES” OU 1 garrafa – mais de 20 “DOSES”
- **UÍSQUE, RUM, LICOR, etc.:** 1 “dose de dosador” (45-50ml) – 1 “DOSE”

**Obs.2:**

- Nas questões número 1 e 3, caso não seja compreendido, substitua por “com que frequência” ou “quantas vezes por ano, mês ou semana”; nas questões 4 a 8, substitua por de quanto em quanto tempo”.
- Nas questões número 4 a 8 caso não seja compreendido, substitua “durante o último ano” por “desde o mês de ....(corrente) do ano passado.
- Na questão 3 substitua “seis ou mais doses” pela quantidade equivalente das bebidas no(s) recipientes em que são consumidas. Ex. “....três garrafas de cerveja ou mais”...

**Resultado:** Some o número de cada uma de suas 10 respostas, consulte na tabela abaixo em qual intervalo numérico seu resultado se encontra, este resultado estima o risco do seu tipo de consumo:

**Consumo de Baixo Risco** – 0 a 7 pontos

**Consumo de Risco** – 8 a 15 pontos

**Uso Nocivo ou Consumo de Alto Risco** – 15 a 19 pontos

**Possível Dependência** – 20 ou mais pontos

**Máximo** – 40 pontos

## ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÉNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL

PPG  
UFPE  
SAÚDE  
TRANSLACIONAL

### QUESTIONÁRIO DE FARGESTRÖM

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Responda às perguntas abaixo, some o número no final de cada resposta e veja o resultado no final da página.

**Em quanto tempo depois de acordar você fuma o primeiro cigarro?**

- ( ) Dentro de 5 minutos (3)  
( ) 6-30 minutos (2)  
( ) 31-60 minutos (1)  
( ) Depois de 60 minutos (0)

**Você acha difícil ficar sem fumar em lugares onde é proibido (porexemplo, na igreja, no cinema, em bibliotecas, e outros)?**

- ( ) Sim (1)  
( ) Não (0)

**Qual o cigarro do dia que traz mais satisfação?**

- ( ) O primeiro da manhã (1)  
( ) Outros (0)

**Quantos cigarros você fuma por dia?**

- ( ) Menos de 10 (0)  
( ) De 11 a 20 (1)  
( ) De 21 a 30 (2)  
( ) Mais de 31 (3)

**Você fuma mais frequentemente pela manhã?**

- ( ) Sim (1)  
( ) Não (0)

**Você fuma mesmo doente quando precisa ficar na cama a maior parte do tempo?**

- ( ) Sim (1)  
( ) Não (0)

**Resultado:**

Avaliação do resultado Dependência (soma dos pontos):

- 0-2: muito baixa
- 3-4: baixa
- 5: média
- 6-7: elevada
- 8-10: muito elevada

## ANEXO C

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PERFIL METABONÔMICO DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER DE MAMA E PERIODONTITE

**Pesquisador:** LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 79165224.7.0000.8807

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.806.140

#### Apresentação do Projeto:

Este trata-se de um projeto de pesquisa para Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional da Universidade Federal de Pernambuco, submetido por Larissa Giovanna Viana Trindade Zimmerle da Nóbrega, sob orientação do Professor Dr. Ricardo Oliveira da Silva. As informações aqui descritas foram extraídas dos documentos: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2314253 (3).pdf e Projeto\_Detalhado\_Final.

A pesquisadora informa que a literatura recentemente vem sugerindo uma relação entre periodontite e diferentes tipos de câncer. Alguns estudos encontraram uma associação estatisticamente significativa entre periodontite e o surgimento das neoplasias malignas, outros sugerem que várias espécies de patógenos associados à periodontite induzem a expressão de genes que também estão relacionados à carcinogênese por meio da atividade de inibição da apoptose e do aumento da migração e invasão celular.

A metabonômica pode ser definida como a medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica e dinâmica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética. (ROBERTSON, 2005) Na estratégia metabonômica avalia-se mudanças no perfil dos metabólitos presentes no biofluído com a agressão sofrida. (ROBERTSON, 2005) Esses metabólitos são produtos intermediários ou finais do metabolismo em uma amostra biológica e o conjunto de todos os metabólitos de baixa massa molecular (até 1500 Da), presentes em um sistema biológico, é chamado de metaboloma. (CANUTO et al., 2017) Assim, a metabolômica

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-901

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br

## HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.806.140

identifica e quantifica os metabólitos presentes em um determinado sistema biológico, usando amostras que incluem plasma, urina, saliva, tecidos e outros.

Os termos metabonômica e metabolômica frequentemente são usados como sinônimos (MADSEN et al., 2010), a diferença é que a análise metabolômica exige a utilização de uma ferramenta de separação de misturas, normalmente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia em fase gasosa (CG), associada à espectrometria de massas; en quanto na estratégia metabonômica, a análise é feita sem a utilização de um meio de separação de mistura, com mínima intervenção na amostra, normalmente usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). (DUNN; ELLIS, 2005) A RMN de 1H é a técnica mais utilizada atualmente devido aos benefícios já citados e ao fato de ter uma alta resolução, sendo capaz de avaliar diferentes tipos de metabólitos bem como de realizar análises quantitativas e qualitativas. (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; MAYR, 2008) Essa técnica funciona detectando sutis mudanças na frequência de ressonância dos núcleos de hidrogênio-1 quando expostos a campos magnéticos fortes e pulsos de radiofrequência. (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2003; MAYR, 2008) Essa frequência de ressonância varia com o ambiente químico em torno do núcleo de hidrogênio-1, permitindo a diferenciação, identificação e quantificação das diferentes moléculas presentes na amostra. Os dados obtidos geram um espectro de frequências no qual cada pico é examinado considerando sua posição na faixa de frequência, intensidade e interações com outros núcleos. (MAYR, 2008).

A identificação de alterações no metaboloma causadas por determinadas patologias permite tanto o estudo de mecanismos fisiopatológicos como a identificação de biomarcadores associados a determinados fenótipos (JAYARAMAN et al., 2014). O perfil de metabólitos endógenos relacionados a uma doença é identificado como uma “impressão digital metabólica” do processo patológico, razão pela qual a metabonômica vem se destacando como uma ferramenta diagnóstica valiosa. (GODOY et al., 2010) Trata-se de um estudo observacional, descritivo, transversal, usando amostra de conveniência, não-probabilística, a partir de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, provenientes do Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE, observando-se os critérios de inclusão e exclusão. As pacientes serão distribuídas em dois grupos: Grupo 1 - Pacientes com câncer de mama e periodontite; Grupo 2 - Pacientes com câncer de mama sem periodontite.

A pesquisa será realizada no período compreendido entre julho e dezembro de 2024 em três locais distintos:

I) no NDC (antigo SAME) no HC/EBSERH/UFPE para consulta aos prontuários;

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901

**UF:** PE **Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br

Página 02 de 09

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.806.140

II) O recrutamento dos sujeitos da pesquisa, avaliação periodontal e coleta sanguínea serão realizados no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE; O número de participantes poderá oscilar em razão dos critérios de exclusão e discordância da paciente em participar do estudo. Nas informações básicas do Projeto estima-se 30 pacientes com câncer de mama e periodontite, e outro grupo com 30 pacientes com câncer de mama sem periodontite;

III) A análise do metaboloma será realizada no Departamento de Química Fundamental (DQF), Laboratório da Central Analítica e Laboratório de Metabonômica e Quimiometria.

**Critérios de inclusão:** Mulheres com câncer de mama confirmados por ultrassonografia/mamografia seguida de biópsia, diagnosticadas ou acolhidas no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE. Pacientes com 18 anos ou mais serão elegíveis para participar. Não haverá restrições quanto ao estadiamento do câncer e ao tratamento.

**Critérios de exclusão:** Mulheres que já tenham completado o tratamento contra o câncer ou consideradas em remissão serão excluídas. Pacientes que apresentem menos de dez dentes também não farão parte do estudo.

**Recrutamento dos Participantes:** As pacientes serão recrutadas até a data final ser alcançada. Elas serão instruídas, pelo médico assistente ou pesquisadora, acerca do objeto da pesquisa, os benefícios e riscos associados. Caso queiram participar, serão convidadas a assinar o TCLE. Os prontuários selecionados serão analisados em detalhes, abrangendo dados demográficos e informações específicas sobre câncer de mama. Também serão coletados resultados de exames laboratoriais e exposição a fatores de risco.

Será aplicado um questionário de saúde e um questionário para obter informações sobre exposição a fatores de risco para periodontite e/ou câncer de mama com todas as participantes da pesquisa no ambulatório de oncologia (questionário sobre riscos comportamentais/ ambientais). Posteriormente, dados relacionados ao diagnóstico clínico periodontal serão coletados através da realização de um exame clínico periodontal, a fim de estabelecer o diagnóstico da condição periodontal de acordo com a classificação das doenças e condições periodontais e perimplantares, incluindo o estágio, extensão e grau da periodontite sempre que for possível. Os instrumentais odontológicos utilizados para realização do exame periodontal estão descritos na metodologia do projeto.

Para auxiliar o diagnóstico periodontal será considerado se participante tabagista ou não conforme escala de Fagerstrom e perfil glicêmico (glicemia plasmática de jejum [ $>126$  mg/dl em 2 momentos diferentes] e hemoglobina glicada (HbA1c) [ $\geq 6,5\%$ ]), conforme informações

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-901

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.806.140

do prontuário.

Será realizada a coleta de amostra sanguínea, de todas as participantes da pesquisa, por meio de punção venosa periférica para análise por Ressonância magnética de 1H.

A amostra de sangue será centrifugada (3000 RPM por 15 minutos), visando obter o soro (sobrenadante). Uma fração de 2,0 ml de soro será transferido para um eppendorf e mantido em ultrafreezer a -40°C até o momento da análise por Ressonância magnética nuclear (RMN). A identificação dos metabólitos de interesse será realizada através dos bancos de dados eletrônicos Human Metabolome Database (HMDB) (WISHART et al., 2022), Biological Magnetic Resonance Bank (BMRB) (HOCH et al., 2022) e artigos publicados.

O material biológico será devolvido, após análise por RMN, ao Hospital das Clínicas para descarte adequado.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário: Discriminar amostras de pacientes acometidas por periodontite e câncer de mama daquelas acometidas por câncer de mama sem periodontite, através de uma abordagem metabonômica.

Objetivo Secundário:

- Identificar a prevalência da periodontite nas pacientes com câncer de mama atendidas no Serviço de Oncologia do HC/EBSERH/UFPE;
- Descrever os diagnósticos periodontais apresentados e correlacionar com a classificação do câncer de mama (tipo histológico, grau, tipo molecular e estadiamento) sempre que essa informação estiver disponível;
- Identificar os metabólitos endógenos responsáveis pela discriminação dos grupos estudados

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: O exame clínico periodontal poderá gerar sensação dolorosa que é de intensidade variável para cada indivíduo e por isso será realizado criteriosamente, utilizando-se a força recomendada (25N), e respeitando o indivíduo que neste momento declarar que não deseja ser submetido a este desconforto, apesar de oferecer um risco mínimo. O exame pode, ainda, liberar bactérias da cavidade oral na corrente sanguínea, mas o mesmo pode acontecer em várias circunstâncias, por exemplo, irrigação subgengival, extração, tratamento endodôntico, escovação dos dentes e mastigação. A punção venosa trata-se de um procedimento invasivo e

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-901

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.806.140

possui vários riscos (medo/ansiedade; reação vasovagal; punção arterial; dor/lesão de nervos; sangramento persistente; hematoma; alergia e infecção) na sua execução, os quais devem ser conhecidos, comunicados e minimizados, através de procedimentos de prevenção (deixar claro que o paciente saberá cada passo, o que será feito e o que vai sentir; assegurar que o paciente esteja assentado em uma cadeira apropriada; fazer uma palpação cuidadosa e aplicar um ângulo adequado de entrada do bisel; perfurar apenas a parede superior da veia, remover o garrote antes de remover a agulha e certificar-se de que a agulha penetrou completamente a parede da veia; uso de luva nitrílica e garrote de tecido para redução do risco de alergia; adesão a uma técnica asséptica irá minimizar o risco de infecção cruzada de colhedor para paciente [por exemplo, limpeza profunda das mãos usando água e sabão seguido de uso de álcool 70% e luvas]).

**Benefícios:**

Estudos apontam que o tratamento odontológico prévio ao tratamento oncológico favorece a resposta clínica e até mesmo a tolerabilidade à imunoterapia. Assim, após possuírem o diagnóstico periodontal definido, as pacientes serão encaminhadas para o tratamento odontológico das necessidades que forem diagnosticadas. As pacientes serão encaminhadas à USF do território em que estão inseridas. Isso será realizado, a fim de que o cuidado de suporte desses pacientes seja confirmado e prioridades sejam dadas para reavaliação e manutenção dos cuidados periódicos. Além disso, o tratamento oncológico geralmente envolve consequências orais, como: Mucosite (inflamação do tecido que reveste todo o trato gastrintestinal); Xerostomia (sensação de boca seca, podendo estar associada ou não a diminuição do fluxo salivar); Disgeusia (diminuição ou alteração do paladar); Disfagia (dificuldade de engolir. Tosses e/ou engasgos durante ou logo após alimentação; sensação de alimento parado na garganta); Odinofagia (dor ao engolir alimentos) e Infecções oportunistas (bacterianas, virais e fúngicas). Portanto, as participantes da pesquisa receberão uma cartilha com informações sobre cuidados que podem ser realizados para minimizar consequências orais decorrentes da terapia oncológica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide " Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide " Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações"

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-901

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.806.140

**Recomendações:**

- Recomendamos corrigir o texto da página 14 do Projeto de pesquisa, último parágrafo, visto que será aplicado um questionário e não realizado;
- Caso haja participação de outros profissionais na aplicação dos questionários favor informar o (os) demais colaboradores na plataforma;
- Recomendamos informar autoria na diagramação/elaboração da *Cartilha de cuidados bucais durante a terapia oncológica*;
- Sugerimos corrigir o Questionário Internacional de Atividade Física - IPAQ (International Physical Activity Questionary) informando que as perguntas de número 3 a 6 não fazem parte do IPAQ, sendo destinadas apenas para o público alvo de sua pesquisa, e posteriormente avaliar a sua inserção na seção de anexo ao invés de apêndice.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_2314253.pdf	18/04/2024 20:12:08		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Final_Larissa.pdf	18/04/2024 20:09:03	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Final_Larissa.docx	18/04/2024 20:08:45	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_18anos.docx	18/04/2024 20:07:49	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_18anos.pdf	18/04/2024 20:07:38	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-901

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 6.806.140

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_18anos.pdf	18/04/2024 20:07:38	NOBREGA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJECTO_2314253.pdf	17/04/2024 13:45:49		Aceito
Outros	Declaracao_Vinculo.pdf	17/04/2024 13:43:02	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Anuencia_Quimica_Assinada.pdf	17/04/2024 13:41:36	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Anuencia_Oncologia_Assinada.pdf	17/04/2024 13:41:16	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Anuencia_NDC_Assinada.pdf	17/04/2024 13:39:50	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Anuencia_GEP_Assinada.pdf	17/04/2024 13:39:27	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Termo_compromisso_confidencialidade_assinado.pdf	17/04/2024 13:38:31	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Curriculos_Lattes_Larissa_Nobrega.pdf	17/04/2024 13:37:17	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Ricardo_Silva.pdf	17/04/2024 13:36:51	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto_Detalhado_Final_Larissa.pdf	17/04/2024	LARISSA	Aceito

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-901

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-3743

**E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE**



Continuação do Parecer: 6.806.140

/ Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Final_Larissa.pdf	13:35:24	GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Final_Larissa.pdf	17/04/2024 13:35:24	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Recusado
Cronograma	Cronograma.pdf	17/04/2024 13:34:44	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	17/04/2024 13:34:31	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_18anos.pdf	17/04/2024 13:34:07	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_18anos.pdf	17/04/2024 13:34:07	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Recusado
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Aassinada.pdf	17/04/2024 13:33:52	LARISSA GIOVANNA VIANA TRINDADE ZIMMERLE DA NOBREGA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

<b>Endereço:</b> Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do	
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	<b>CEP:</b> 50.670-901
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)2126-3743	<b>E-mail:</b> cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.806.140

RECIFE, 06 de Maio de 2024

---

**Assinado por:**  
**Ana Caetano**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-3743 **E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br

Página 09 de 09

## APÊNDICE A



### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES



#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o(a) Sr.(a.) para participar como voluntário(a) da pesquisa **PERFIL METABONÔMICO DE PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER DE MAMA E PERIODONTITE**, que está sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) Larissa Giovanna Viana Trindade Zimmerle da Nóbrega, com endereço na Av. Prof. Artur de Sá, 329-481 - Cidade Universitária, Recife - PE, CEP 50740-525. Telefone para contato: (81) 9.89140187 E-mail: larissa.trindade@ufpe.br.

A mesma está sob a orientação de: Dr. Ricardo Oliveira da Silva, Telefone: (81) 2126-7465, e-mail ricardo.silva@ufpe.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

#### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

**Descrição da pesquisa e esclarecimento da participação:** O presente estudo será realizado em pacientes com periodontite e câncer de mama, a fim de investigar se há alguma correlação entre as doenças. Serão coletados dados do prontuário: Dados gerais (nome, CPF, data de nascimento, idade, sexo, cor/raça, endereço de origem, telefone, escolaridade e ocupação), há quanto tempo foi diagnosticada com câncer de mama, histórico familiar e estadiamento do câncer. Todas as participantes serão submetidas a algumas perguntas (anamnese) e exame clínico periodontal (feito para determinar se há algum problema gengival). Também será realizada a coleta de 5 ml de sangue (1 colher das de chá – por punção de veia do braço) para análise. Esses procedimentos serão realizados presencialmente, no Serviço de Oncologia do HC/EBSEH/UFPE. A amostra sanguínea será submetida a uma análise por meio de ressonância magnética nuclear nas dependências do Departamento de Química Fundamental da UFPE. A coleta sanguínea e exame periodontal serão realizados uma única vez para cada voluntário. A anamnese, exame periodontal e coleta sanguínea terão uma duração média de 2:30 h.

**Riscos:** O exame clínico periodontal poderá gerar sensação dolorosa que é de intensidade variável para cada indivíduo e por isso será realizada criteriosamente, respeitando o indivíduo que neste momento declarar que não deseja ser submetido a este desconforto, apesar de oferecer um risco mínimo. O exame pode, ainda, liberar bactérias da cavidade oral na corrente sanguínea, mas o mesmo pode acontecer em várias circunstâncias, por exemplo, irrigação subgengival, extração, tratamento endodôntico, escovação dos dentes e mastigação. A punção venosa trata-se de um procedimento invasivo e possui alguns riscos (medo/ansiedade; reação vaso-vagal; punção arterial; dor/lesão de nervos; sangramento persistente; hematoma; alergia e infecção) na sua execução, os quais devem ser conhecidos, comunicados e minimizados, através de procedimentos de prevenção (deixar claro que o paciente saberá cada passo, o que será feito e o que vai sentir; assegurar que o paciente esteja assentado em uma cadeira apropriada; fazer uma palpação cuidadosa e aplicar um ângulo adequado de entrada do bisel; perfurar apenas a parede superior da veia, remover o garrote antes de remover a agulha e certificar-se de que a agulha penetrou completamente a parede da veia; uso de luva nitrílica e garrote de tecido para redução do risco de alergia; adesão a uma técnica asséptica irá minimizar o risco de infecção cruzada de colhedor para paciente [por exemplo, limpeza profunda das mãos usando água e sabão seguido de uso de álcool 70% e luvas]). O risco inerente a todo processo de pesquisa científica e comum aos estudos documentais baseados em registros de dados é a não observância à confidencialidade dos dados dos participantes, em que se destaca a sua identidade pessoal e fotografias clínicas (não se aplica a este projeto). Os dados serão coletados e planilhados pela equipe de pesquisa em espaço reservado, sem a presença de outra pessoa que não compunha a equipe de pesquisa e ficarão armazenados em um notebook com acesso aos dados restrito à equipe de pesquisa por senha. Os dados dos participantes da pesquisa serão mantidos em sigilo pela equipe de pesquisa conforme previsto pelo CEP/CONEP.

**Benefícios:** Estudos apontam que o tratamento odontológico prévio ao tratamento oncológico favorece a resposta clínica e até mesmo a tolerabilidade à imunoterapia. Assim, após possuírem o diagnóstico periodontal definido, as pacientes serão encaminhadas para o tratamento odontológico das necessidades que forem diagnosticadas, a fim de melhorar não apenas a saúde bucal, mas também a saúde geral. A Unidade de Saúde da Família (USF) [também chamado de posto de saúde ou postinho] faz parte da Atenção Primária à Saúde (APS), que é a porta de entrada prioritária para a organização do cuidado na Rede de Atenção à Saúde (RAS). Atua como ordenadora da rede e coordenadora do cuidado, além de realizar o cuidado integral e contínuo da população que está sob sua responsabilidade. Compete à APS o apoio ao cuidado das pessoas com câncer, dado que o tratamento ao câncer é oferecido pela rede hospitalar, mas o tratamento de outros agravos bucais pode ser realizado na APS em sintonia com atenção hospitalar. Dessa forma, o cirurgião-dentista da USF é responsável pela avaliação odontológica e pela adequação do meio bucal, a serem realizados antes do após o término do tratamento oncológico. Desse modo, as pacientes diagnosticadas com qualquer alteração odontológica que possa causar danos à saúde bucal ou geral do paciente serão encaminhadas à USF do território em que estão inseridas. Isso será realizado, a fim de que o cuidado de suporte desses pacientes seja confirmado e prioridades sejam dadas para reavaliação e manutenção dos cuidados periódicos. Além disso, o tratamento oncológico geralmente envolve consequências orais, como: Mucosite (inflamação do tecido que reveste todo o trato gastrintestinal); Xerostomia (sensação de boca seca, podendo estar associada ou não a diminuição do fluxo salivar); Disgeusia (diminuição ou alteração do paladar); Disfagia (dificuldade de engolir. Tosses e/ou engasgos durante ou logo após alimentação; sensação de alimento parado na garganta); Odinofagia (dor ao



**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE  
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA  
DE SERVIÇOS HOSPITALARES**



engolir alimentos) e Infecções oportunistas (bacterianas, virais e fúngicas). Assim, as participantes da pesquisa receberão uma cartilha com informações sobre alguns cuidados que podem ser realizados para minimizar consequências orais decorrentes da terapia oncológica.

**Armazenamento e utilização de material biológico:** As amostras de soro serão armazenadas no Laboratório de Metabonômica e Quimiometria da UFPE, mesmo após aquisição dos dados espetrais de RMN. Ao término da pesquisa, essas amostras serão encaminhadas ao serviço de oncologia do HC/EBSERH/UFPE, para o descarte adequado. Os dados espetrais obtidos ficarão armazenados no computador do LabMeQ, mas não conterão dados gerais (pessoais) das voluntárias, sendo identificado apenas por um código. A autorização para armazenamento e utilização desse material poderá ser retirada pelo sujeito da pesquisa, a qualquer momento.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa por meio de análise de prontuários, exame odontológico periodontal e coleta sanguínea, ficarão armazenados no computador pessoal da pesquisadora, em pastas específicas destinadas ao estudo (dados do prontuário e resultados do exame periodontal), e no freezer do Departamento de Química Fundamental da UFPE (amostras sanguíneas), até que seja realizada análise das amostras, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, no endereço Av. Jorn. Aníbal Fernandes, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-560, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

O Sr./Sra. poderá solicitar, se assim quiser, o relatório final da pesquisa que fez parte. Também, cópias de todos os resultados dos exames complementares realizados nesta pesquisa poderão ser solicitadas ao pesquisador.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

**Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do HC/UFPE/Ebsrh no endereço: Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, térreo - corredor administrativo - Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil CEP: 50670-901, Tel.: (81) 2126.3743 – e-mail: [cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br](mailto:cepsh.hc-ufpe@ebsrh.gov.br).**

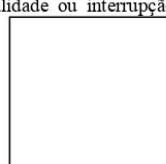
\_\_\_\_\_  
(assinatura do pesquisador)

**CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo Perfil metabonômico de pacientes diagnosticadas com câncer de mama e periodontite, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção assistência/tratamento.

Local e data: Recife, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_



**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):**

Nome: _____	Nome: _____
Assinatura: _____	Assinatura: _____

## APÊNDICE B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÉNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL



### FICHA CLÍNICA

#### I. Dados para identificação

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_ Data do Exame Periodontal/Anamnese: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Órgão Expedito: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) Feminino

Cor: ( ) branca ( ) negra ( ) parda ( ) amarela ( ) indígena

Estado Civil: ( ) Solteira / ( ) Casada / ( ) Divorciada / ( ) Viúva

Endereço: \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Telefone para contato: ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ e ( ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Renda individual: R\$ \_\_\_\_\_ Renda familiar: R\$ \_\_\_\_\_

Quantos membros vivem sobre o mesmo teto? \_\_\_\_\_

Nível de instrução: ( ) Sem escolaridade ( ) Primeiro grau incompleto ( ) Primeiro grau completo ( ) Segundo grau incompleto ( ) Segundo grau completo ( ) Nível superior incompleto ( ) Nível superior completo ( ) Pós-graduação

Está empregado atualmente? ( ) Sim ( ) Não Qual função desempenha? \_\_\_\_\_

Serviço de procedência: ( ) Oncologia

Médico assistente: \_\_\_\_\_ CRM: \_\_\_\_\_

#### II. Anamnese

1. Está em tratamento médico atualmente, que não seja oncológico? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, para qual(is) condição(ões):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2. Está fazendo uso de alguma Medicação, que não seja para o tratamento do câncer? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, Qual(is):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

3. Já iniciou o tratamento oncológico? ( ) Sim ( ) Não

Se sim,

a) Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

b) Qual modalidade de tratamento já foi realizada até o momento?

( ) Quimioterapia – Agente: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Ciclos: \_\_\_\_\_.

( ) Radioterapia – Região: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Sessões: \_\_\_\_\_.

( ) Terapia endócrina – Agente: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_\_.

( ) Imunoterapia – Agente: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_\_.

( ) Terapia-alvo – Agente: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_\_.

( ) Terapia com anticorpos monoclonais – Agente: \_\_\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_ Início: \_\_\_\_\_.

( ) Terapia com inibidores de PARP

( ) Terapia com inibidores de CDK4/6

( ) Terapia com inibidores de PI3K

( ) Outros: \_\_\_\_\_

c) Há outra informação importante sobre o tratamento oncológico?

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



4. Está grávida? ( ) Sim ( ) Não

5. Hábito de fumar: ( ) nunca fumou / ( ) ex-fumante: \_\_\_\_\_ (anos que parou) / ( ) fumante:  
\_\_\_\_\_ (quantos cigarros por dia)

6. Tem diabetes? ( ) Sim ( ) Não

Se sim:

a) Qual tipo de diabetes? ( ) Tipo I ( ) Tipo II

b) Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

c) Quais medicamentos utiliza: \_\_\_\_\_

d) No caso da insulina:

Qual tipo e dose? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo usa insulina? \_\_\_\_\_

HbA1c: \_\_\_\_\_

Glicemia em jejum: \_\_\_\_\_

7. Tem algum problema cardiovascular? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is):

( ) Pressão alta / hipertensão ( ) Insuficiência cardíaca ( ) Cardiopatia congênita

( ) Arritmia cardíaca ( ) Miocardite ( ) Infarto agudo do miocárdio: Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

8. Já teve AVC/AVE? ( ) Sim ( ) Não

9. Usa marca-passo ou prótese valvar? ( ) Sim ( ) Não

10. Sofre de febre reumática? ( ) Sim ( ) Não

11. Tem/teve algum problema articular ou reumatismo? ( ) Sim / ( ) Não. Se sim, qual(is)?  
\_\_\_\_\_

12. Tem alguma doença renal? ( ) Sim ( ) Não, se sim, faz hemodiálise? ( ) Sim ( ) Não

13. Tem alguma doença hepática? ( ) Sim ( ) Não. Se sim, qual(is)?  
\_\_\_\_\_

14. Tem alguma doença gástrica? ( ) Sim ( ) Não. Se sim, qual(is)?  
\_\_\_\_\_

15. Tem alguma doença respiratória? ( ) Sim ( ) Não. Se sim, qual(is)?  
\_\_\_\_\_

16. Apresentou alguma alergia até o momento? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, a algum desses componentes?

( ) Látex ( ) Band-Aid ou similares ( ) Paracetamol ( ) Dipirona ( ) Amoxicilina

( ) Outros: \_\_\_\_\_

17. Tem/teve epilepsia, desmaios ou convulsões? ( ) Sim ( ) Não. Se sim, toma alguma medicação? Qual?  
\_\_\_\_\_

18. É transplantado? ( ) Sim ( ) Não. Se sim, há quanto tempo? \_\_\_\_\_

19. Já foi operado? ( ) Sim ( ) Não

Se sim, qual(is) cirurgia(as) \_\_\_\_\_



20. Teve problemas com a cicatrização? ( ) Sim ( ) Não

21. Teve problemas com a anestesia? ( ) Sim ( ) Não

22. Teve algum problema durante atendimento odontológico? ( ) Sim ( ) Não  
Se sim, qual(is) \_\_\_\_\_

23. Já teve hemorragia? ( ) Sim ( ) Não

### III. Hábitos de higiene bucal

1. Com que frequência você escova seus dentes?

( ) Menos que 1x ao dia ( ) 1x ao dia ( ) 2x ao dia ( ) Mais que 2x ao dia

2. O que você utiliza para limpar seus dentes?

( ) Escova dental ( ) Creme dental ( ) Fio dental ( ) Escova inter dental ( ) Solução para bochechos ( ) Outros: \_\_\_\_\_

3. Quando você escova seus dentes?

( ) Pela manhã ( ) Após o almoço ( ) Antes de dormir ( ) Outros

4. Por quanto tempo você escova seus dentes?

( ) Menos que um minuto ( ) Um minuto ( ) Dois minutos ( ) Não sabe

5. Com que frequência você costuma visitar o dentista?

( ) A cada 6 meses ( ) Quando tem algum problema dental ( ) Nunca foi ao dentista ( ) Outros: \_\_\_\_\_

6. Quando foi a última vez que foi ao dentista?

( ) Há 6 meses ( ) Entre 6-12 meses ( ) Entre 1-2 anos ( ) entre 2-5 anos ( ) Há mais de 5 anos

7. Está em tratamento para alguma condição odontológica no momento?

( ) Não ( ) Sim

Se sim, qual: \_\_\_\_\_

8. Qual(ais) tratamento(s) você realizou na sua última visita ao dentista?

( ) Consulta de acompanhamento ( ) Canal ( ) Tratamento na gengiva ( ) Restauração de um ou mais dentes

( ) Coroa/Prótese ( ) Tratamento ortodôntico ( ) Extração dentária ( ) Outros: \_\_\_\_\_

Eu \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, declaro que as informações acima prestadas são totalmente verdadeiras.

Recife, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_.

Assinatura do Paciente ou seu Responsável Legal

Assinatura da Pesquisadora

## APÊNDICE C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL



### FICHA COM DADOS SOBRE O CÂNCER DE MAMA

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**1. Data do diagnóstico do câncer de mama:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

- 2. Tipo histológico:** ( ) Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) ( ) Carcinoma lobular *in situ* (CLIS)  
( ) Carcinoma ductal invasivo (CDI) ( ) Carcinoma lobular invasivo (CLI)  
( ) Carcinoma tubular ( ) Carcinoma medular ( ) Carcinoma ( ) Carcinoma mucinoso  
( ) Carcinoma metaplásico ( ) Carcinoma apócrino ( ) Carcinoma secretor ( ) Doença de Paget

**3. Graus:** ( ) Grau 1 ( ) Grau 2 ( ) Grau 3

**4. Tipo molecular:** ( ) Luminal A ( ) Luminal B ( ) *HER2* amplificado ( ) Triplo negativo

**5. Estadiamento do câncer, classificação TNM:**

- ( ) **Estágio 0** - Tis, N0, M0  
( ) **Estágio I** - (T1, N0, M0)  
( ) **Estágio IIA** - ( ) T0, N1, M0 ou ( ) T1, N1, M0 ou ( ) T2, N0, M0  
( ) **Estágio IIB** - ( ) T2, N1, M0 ou ( ) T3, N0, M0  
( ) **Estágio IIIA** - ( ) T0, N2, M0 ou ( ) T1, N2, M0 ou ( ) T2, N2, M0 ou ( ) T3, N1, M0 ou ( ) T3, N2, M0  
( ) **Estágio IIIB** - ( ) T4, N0, M0 ou ( ) T4, N1, M0 ou ( ) T4, N2, M0  
( ) **Estágio IIIC** - T\_\_\_\_, N3, M0  
( ) **Estágio IV** - T\_\_\_\_, N\_\_\_\_, M1

## APÊNDICE D



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÉNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL



### AVALIAÇÃO PARA FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

#### 1. Dados antropométricos:

a) Altura: \_\_\_\_\_ m    b) Peso: \_\_\_\_\_ kg    c) IMC: \_\_\_\_\_    d) Circunferência da cintura: \_\_\_\_\_ cm

#### 2. Sedentarismo:

#### International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) - Versão curta

As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física em uma semana **NORMAL**, **USUAL** ou **HABITUAL**. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo.

Para responder as questões lembre-se que:

- Atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal.
- Atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal.

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza por **pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez:

2. a) Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que faça você suar **BASTANTE** ou aumentem **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

2. b) Nos dias em que você faz essas atividades vigorosas por **pelo menos 10 minutos contínuos**, quanto tempo no total você gasta fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

2.1. a) Em quantos dias de uma semana normal, você realiza atividades **MODERADAS** por **pelo menos 10 minutos contínuos**, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que faça você suar leve ou aumentem **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (**POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA**)

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum



2.1. b) Nos dias em que você faz essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gasta fazendo essas atividades por dia?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

2.2. a) Em quantos dias de uma semana normal você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?  
dias \_\_\_\_\_ por SEMANA  Nenhum

2.2. b) Nos dias em que você caminha por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gasta caminhando por dia?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

2.3. Estas últimas perguntas são em relação ao tempo que você gasta sentado ao todo no trabalho, em casa, na escola ou faculdade e durante o tempo livre. Isto inclui o tempo que você gasta sentado no escritório ou estudando, fazendo lição de casa, visitando amigos, lendo e sentado ou deitado assistindo televisão.

2.3. a) Quanto tempo por dia você fica sentado em um dia da semana?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

2.3. b) Quanto tempo por dia você fica sentado no final de semana?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

3. Consome algum tipo de bebida alcoólica atualmente, mesmo que de forma social?

Sim  Não

OBS.: Se sim, aplicar questionário CAGE. Se CAGE  $\geq 2$ , aplicar questionário AUDIT.

4. Fez radioterapia para tratamento de algum tumor (linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, tumor de Wilms, Neuroblastoma, Leucemia, tumor ósseo) em região torácica antes dos 30 anos?

Sim  Não

5. História reprodutiva/hormonal:

a) Qual foi a data da sua primeira menstruação? \_\_\_\_\_

b) Tem filho(a)(as)(os)?  Sim  Não

b.1) Se sim, quantos? \_\_\_\_\_

b.2) Se sim, a primeira gestação aconteceu após os 30 anos?  Sim  Não  Não se aplica

c) Parou de menstruar antes dos 55 anos?  Sim  Não  Não se aplica

d) Fez uso de pílulas anticoncepcionais?  Sim  Não

d.1) Se sim, por quanto tempo? \_\_\_\_\_

e) Fez reposição hormonal após a menopausa?  Sim  Não  Não se aplica

e. 1) Se sim, por quanto tempo fez a reposição? \_\_\_\_\_

6. Fatores hereditários/genéticos:

a) Seus pais, irmãos ou filhos tiveram câncer de mama?  Sim  Não

a. 1) Se sim, em que idade foi diagnosticado(a)? \_\_\_\_\_

b) Realizou teste genético para detecção de mutação nos gene BRCA1 e/ou BRCA2?

Sim  Não

b. 1) Qual foi o resultado?  Positivo  Negativo  Incerto

## APÊNDICE E



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE TRANSLACIONAL



### DIAGNÓSTICO DA CONDIÇÃO PERIODONTAL

Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_ Data do Exame Periodontal: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_

1. Estágio da Periodontite:

- Estágio I** (NIC de 1-2 mm; PS de  $\leq$  4 mm; Sem perda dental; perda radiográfica no terço coronal [ $< 15\%$ ])
- Estágio II** (NIC de 3-4 mm; PS de  $\leq$  5 mm; Sem perda dental; perda radiográfica no terço coronal [15-33%])
- Estágio III** (NIC  $\geq$  5 mm; PS  $\geq$  6 mm; Perda dental até 4; Furca grau II ou III; perda óssea radiográfica se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz)
- Estágio IV** (NIC  $\geq$  5 mm; PS  $\geq$  6 mm; Perda dental 5 dentes ou mais; Furca grau II ou III; Mobilidade dentária grau 2 ou 3; perda óssea radiográfica se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz)

2. Extensão

- Localizada** (menos de 30% dos dentes envolvidos)
- Generalizada** (mais de 30% dos dentes envolvidos)
- Padrão incisivo-molar**

3. Grau da Periodontite:

- Grau A** (Sem perda de NIC nos últimos 5 anos; Muito biofilme, pouca destruição; Não fumante; Normoglicêmico)
- Grau B** (Perda de até 2 mm de NIC nos últimos 5 anos ou mais; Destruição proporcional ao biofilme; Fuma menos de 10 cigarros/dia; HbA1c  $< 7\%$  em paciente com diabetes)
- Grau C** (Perda de mais de 2 mm de NIC nos últimos 5 anos ou mais; Destruição maior que o depósito de biofilme; Fuma mais de 10 cigarros/dia; HbA1c  $\geq 7\%$  em paciente com diabetes)



Nº do Prontuário: \_\_\_\_\_ Data do Exame Periodontal: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

**FICHA PERIODONTAL**

**PERIograma**

<b>VESTIBULAR</b>																
	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
PBS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MG-JCE	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NCI	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F																
M																

**PALATINA**

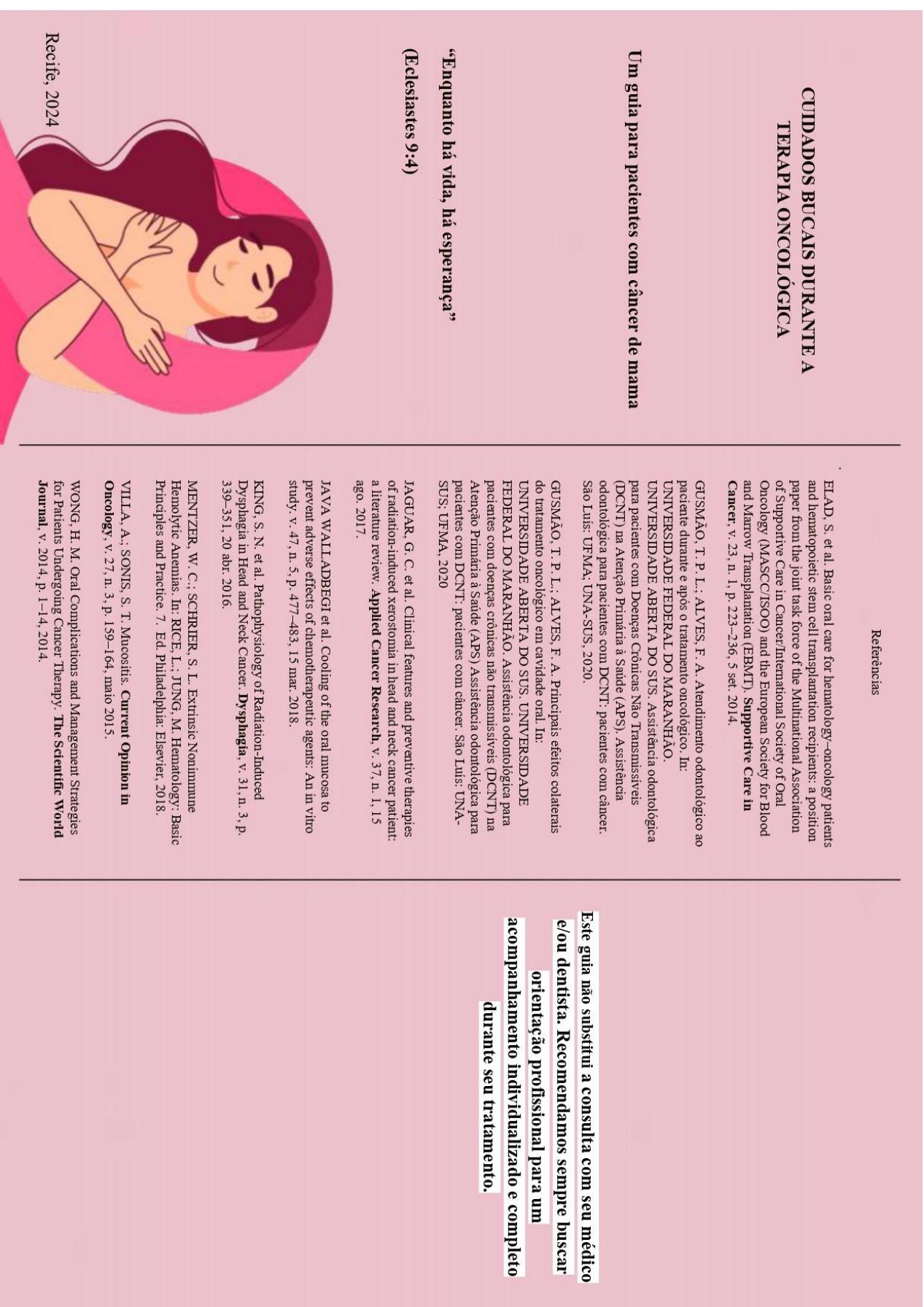
<b>VESTIBULAR</b>																
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
PBS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MG-JCE	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NCI	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F																
M																

**VESTIBULAR**

<b>LINGUAL</b>																
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
PBS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
MG-JCE	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NCI	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SUP	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
F																
M																

## CUIDADOS BUCAIS DURANTE A TERAPIA ONCOLÓGICA

### Um guia para pacientes com câncer de mama



ELAD, S. et al. Basic oral care for hematology–oncology patients and hematopoietic stem cell transplantation recipients: a position paper from the joint task force of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer/International Society of Oral Oncology (MASC/ISOO) and the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Supportive Care in Cancer*, v. 23, n. 1, p. 223–236, 5 set. 2014.

GUSMÃO, T. P. L.; ALVES, F. A. Atendimento odontológico ao paciente durante e após o tratamento oncológico. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO.

UNIVERSIDADE ABERTA DO SUS. Assistência odontológica para pacientes com Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) na Atenção Primária à Saúde (APS). Assistência odontológica para pacientes com DCNT: pacientes com câncer. São Luis: UFMA; UNA-SUS, 2020.

Este guia não substitui a consulta com seu médico e/ou dentista. Recomendamos sempre buscar orientação profissional para um acompanhamento individualizado e completo durante seu tratamento.

### “Enquanto há vida, há esperança”

(Eclesiastes 9:4)

JAGUAR, G. C. et al. Clinical features and preventive therapies of radiation-induced xerostomia in head and neck cancer patient: a literature review. *Applied Cancer Research*, v. 37, n. 1, 15 ago. 2017.

JAVA WALLADBEKI et al. Cooling of the oral mucosa to prevent adverse effects of chemotherapeutic agents: An in vitro study. v. 47, n. 5, p. 477–483, 15 mar. 2018.

KING, S. N. et al. Pathophysiology of Radiation-Induced Dysphagia in Head and Neck Cancer. *Dysphagia*, v. 31, n. 3, p. 339–351, 20 abr. 2016.

MENTZER, W. C.; SCHRIER, S. L. Extrinsic Nonimmune Hemolytic Anemias. In: RICE, L.; JUNG, M. Hematology: Basic Principles and Practice. 7. Ed. Philadelphia: Elsevier, 2018.

VILLA, A.; SONIS, S. T. Mucositis. *Current Opinion in Oncology*, v. 27, n. 3, p. 159–164, maio 2015.

WONG, H. M. Oral Complications and Management Strategies for Patients Undergoing Cancer Therapy. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1–14, 2014.

O tratamento oncológico geralmente envolve consequências orais que precisam ser observadas e tratadas. Esses efeitos podem ser agudos ou tardios, de acordo com o tipo de tratamento.

Os efeitos colaterais agudos da quimioterapia acontecem após sua realização e diminuição das células de defesa do paciente, geralmente ocorrendo entre o 7º e o 14º dia.

Seus principais efeitos em boca são:

- ❖ Mucosite (inflamação do tecido que reveste todo o trato gastrintestinal)
- ❖ Xerostomia (sensação de boca seca, podendo estar associada ou não a diminuição do fluxo salivar)
- ❖ Disgeusia (diminuição ou alteração do paladar)
- ❖ Distagia (dificuldade de engolir)
- ❖ Infecções oportunistas (bacterianas, virais e fúngicas)

#### MUCOSITE ORAL

A mucosite é a complicação aguda mais significante do tratamento do câncer, surge em alguns dias, em geral do 4º ao 7º dia após a quimioterapia e pode afetar qualquer região do trato gastrintestinal, sendo a boca o principal local afetado. De 20% a 40% dos pacientes com tumores sólidos (como no caso do câncer de mama) que recebem quimioterapia convencional tem chance de desenvolver a mucosite oral.

- Características clínicas da mucosite oral

Os sinais e sintomas iniciais da mucosite oral incluem eritema (vermelhidão), edema (inchado), sensação de ardência e sensibilidade aumentada a alimentos quentes ou ácidos. Em graus mais avançados, poderão estar presentes ulcerações dolorosas.

A intensidade da mucosite oral será relacionada ao tratamento (dose e frequência do quimioterápico) e características da paciente (idade, peso, estado de saúde bucal e outros)

- Tratamento da mucosite oral

Algumas modalidades terapêuticas são indicadas para reduzir a intensidade da mucosite oral, como:

- ✓ Prática da higiene oral
- Utilizar escovas extra macias e creme dental fluoretado.
- Realizar a escovação após as principais refeições. Utilizar o fio dental normalmente.
- ✓ Bochechos com solução de água bicarbonada

Bochechar uma solução contendo 50 ml de água e 1 colher de chá de bicarbonato de sódio 3 vezes ao dia, durante o tratamento.

✓ Crioterapia

Essa técnica consiste no uso de pedaços de gelo ou picolé no momento da quimioterapia. Isso diminui o fluxo sanguíneo para a região oral.

✓ Dieta

Evitar consumo de alimentos cítricos, salgados e secos. É indicado o consumo de alimentos ricos em fibras.

✓ Anestésico

Caso haja muita dor durante as refeições, pode-se utilizar anestésicos tópicos antes das refeições.

✓ Fotobiomodulação

A terapia com laser de baixa potência também é uma opção para tratar/prevenir a mucosite oral. A partir do primeiro dia de quimioterapia, pode ser realizada a aplicação do laser em toda mucosa oral.

#### BOCA SECA

Um dos principais efeitos colaterais do tratamento oncológico é a xerostomia, que é a sensação de boca seca, associada ou não a diminuição do fluxo salivar. Esse efeito é temporário e o sintoma desaparece ao final do tratamento.

- Tratamento da xerostomia

O tratamento pode se dar pelo aumento da ingestão de água e uso de saliva artificial.

#### ALTERAÇÃO DO PALADAR

A disgeusia é a alteração do paladar, que provoca mudanças no gosto dos alimentos durante o tratamento oncológico. É um efeito colateral da quimioterapia e está presente em até 50% das pessoas submetidas a quimioterapia. Essa alteração desaparece de 3 a 4 semanas após o término do tratamento quimioterápico.

- Tratamento da disgeusia

Não existem tratamentos específicos para a disgeusia, mas cuidados como higiene oral e bochechos com água bicarbonada antes das refeições ajudam a neutralizar o gosto ruim na boca.

#### DIFÍCULDADE PARA ENGOLIR

A distagia é caracterizada pela dificuldade de engolir alimentos e líquidos. Os sintomas incluem tossez e/ou engasgos durante ou logo após a alimentação e sensação de alimento parado na garganta. Também podem estar presentes dor ao engolir e perda de peso.

- Tratamento da distagia
- Para auxiliar a deglutição, é importante mastigar bem os alimentos, comer refeições menores e tentar comer alimentos com textura mais pastosa.

#### INFECÇÕES OPORTUNISTAS

As infecções por microrganismos oportunistas acontecem devido à neutropenia decorrente do tratamento o câncer. A neutropenia se caracteriza pela redução importante do número de neutrófilos. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa do organismo contra infecções bacterianas e fúngicas. Esse quadro pode ser diagnosticado através do hemograma e a gravidade da neutropenia está relacionada com o risco relativo de infecção, sendo classificada como leve (1.000 a 1.500/  $\mu\text{L}$ ), moderada (500 a 1.000/  $\mu\text{L}$ ) ou grave (<500/  $\mu\text{L}$ ). Dependendo do tratamento quimioterápico, a neutropenia apresenta um tempo de ciclo diferente, no geral ocorrendo de 3 a 7 dias após a realização da quimioterapia. Após 14 dias, em média, o número de neutrófilos volta a subir.

- Algumas infecções oportunistas que acometem a cavidade oral
- ❖ Candidiase oral

É uma infecção fúngica ocasionada principalmente pela *Candida albicans*. Sua apresentação clínica geralmente é representada pela presença de placas brancas removíveis à raspagem. A sensação de queimação está comumente associada.

- ❖ Virus herpes simplex (HSV)

Pacientes infectados por HSV apresentam recorrência de 7 a 14 dias após a quimioterapia, apresentando, clinicamente, vesículas ulceradas.

- ❖ Virus varicela zoster (VZV)

Também conhecida como herpes zoster, tem apresentação clínica de lesões que aparecem na pele ou na cavidade oral, com a presença de vesículas com base eritematosa, podendo ocorrer na região inervada pelo nervo trigêmeo. Essa infecção se manifesta após a quimioterapia, com a presença de lesões dolorosas que duram em média 7 dias.

## APÊNDICE H

DIAGNÓSTICO		PERIODONTITE				Grau					
		Estágio		Localização							
CÂNCER DE MAMA	Grau	I	II	III	IV	Generalizada	Localizada	a	A	B	C
		CDI	1	0	2	3	3	3	1	1	4
Type Histológico	Grau										
Grau 1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Grau 2	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Grau 3	3	0	0	2	1	1	2	1	1	1	1
Type Molecular											
Luminal A	1	0	0	0	2	2	1	0	0	3	
Luminal B	0	0	0	2	0	0	2	1	1	0	
Tripló Negativo	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	
Estágio											
Estágio I	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	
Estágio II A	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
Estágio II B	0	0	1	2	2	1	1	1	0	2	
Estágio III A	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	

## APÊNDICE I

Journal of Applied Oral Science



---

### Periodontitis and Breast Cancer Relationship Studied by NMR-based Metabonomics

Journal:	<i>Journal of Applied Oral Science</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Viana Trindade Zimmerle da Nóbrega, Larissa Giovanna; Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Saúde Translacional dos Santos Gois, Antonia Regina; Federal University of Pernambuco Zimmerle da Nóbrega, Ricardo; Hospital Clínico San Carlos Silva, Ricardo; Universidade Federal de Pernambuco, Fundamental Chemistry Department
Please use keywords available at <a href='http://decs.bvs.br/' target='new'> http://decs.bvs.br/</a>.:	Breast Neoplasms, Inflammation, Periodontal Diseases, Metabolomics, Chronic Disease

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/jaos-scielo>



## SciELO Brazil Criteria

### Open Science Compliance Form

Version of June 29<sup>th</sup>, 2020

10 Through this form, the authors inform the journal about the conformity of the  
11 manuscript with Open Science communication practices. The authors are requested to  
12 inform: (a) if the manuscript is a preprint and, if so, its location; (b) whether data,  
13 software codes and other materials underlying the manuscript text are properly cited  
14 and referenced; and, (c) whether opening options are accepted in the peer review  
15 process.

#### Preprints

24 Deposit of the manuscript in a preprint server recognized by the journal.

Is the manuscript a preprint?	
<input type="checkbox"/>	Yes - Name of the Preprint server: Preprint DOI:
<input checked="" type="checkbox"/>	No

#### Research Data and other Materials Availability

36 Authors are encouraged to make available previously or at the time of publication all  
37 content (data, software codes and other materials) underlying the manuscript text.  
38 Exceptions are allowed in cases of legal and ethical issues. The objective is to facilitate  
39 the manuscript evaluation and, if approved, contribute to preserving and reusing the  
40 contents and research reproducibility.

Are the contents underlying the manuscript text already available in their entirety and without restrictions or will they be at the time of publication?	
<input type="checkbox"/>	Yes: <input type="checkbox"/> the contents underlying the research text are included in the manuscript <input type="checkbox"/> the contents are already available <input type="checkbox"/> the contents will be made available at the time of publication of the article. Titles and respective URLs, access numbers or file DOIs of the contents underlying the article text follow below (use one line for each data):

<https://mc04.manuscriptcentral.com/jaos-scielo>

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
<p>(X) No:</p> <p>(X) data is available on demand from referees ( ) after publication the data will be available on demand to authors - a condition justified in the manuscript ( ) data cannot be made publicly available. Enter a justification:</p>																																																											

### Open peer review

Authors may choose one or more means to opening the journal peer review process.

When offered the option, authors agree with the publication of review reports of the approved manuscript?
(X) Yes
( ) No
When offered the option, authors agree to interact directly with reviewers responsible for evaluating the manuscript?
(X) Yes
( ) No



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Introduction

Cancer remains a major global public health challenge due to its high mortality rate and the significant social, emotional, and economic impacts it imposes on individuals, families, and healthcare systems. It is estimated that approximately 25% of deaths from non-communicable diseases worldwide are associated with some form of cancer. In 2022, breast cancer was the second leading cause of cancer-related mortality globally (1).

Despite significant advances in breast cancer research, important gaps remain in our understanding of the factors that contribute to disease onset and prognosis, as known risk factors do not fully account for its occurrence (2).

One promising area of investigation involves the association between breast cancer and other comorbid conditions. Among these, increasing attention has been directed to the relationship between cancer and oral health—particularly periodontitis, a chronic inflammatory disease that affects the supporting structures of the teeth (3–5). Several studies have suggested that periodontitis may be a potential risk factor for various types of cancer, including breast cancer, with recent evidence highlighting biological links between oral microbial dysbiosis and tumor development (6–9).

Hoare *et al.* (10) and Fujiwara *et al.* (11) have suggested that certain oral pathogens, such as *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), may directly influence the tumor microenvironment by promoting chronic inflammation, oxidative stress, and DNA damage, thereby supporting the growth and spread of cancer cells. Gaba, Gonzalez, and Martinez (12) reported a 78% increase in the relative risk of developing breast cancer among patients with elevated levels of *F. nucleatum* due to periodontitis. Similarly, Parhi *et al.* (8) demonstrated that *F. nucleatum* accelerates tumor progression and facilitates metastasis, possibly by inhibiting T-cell-mediated immune responses in the tumor microenvironment. Li *et al.* (13) found a positive association between serum levels of *F. nucleatum*, tumor size, and the occurrence of metastasis. This association is particularly concerning, as metastasis accounts for over 90% of deaths related to breast cancer (14).

Research in this area faces notable challenges due to its inherently multivariate nature, requiring the consideration of multiple variables, such as genetic, environmental, and immunological factors (15). Consequently, analytical approaches that account for such complexity are essential.

1  
2  
3

4 Nicholson *et al.* (16) defined metabolomics as the quantitative measurement of  
5 the multiparametric and dynamic metabolic response of living systems to physiological  
6 stimuli and/or genetic modifications. Metabonomic approaches have been applied to  
7 clinical diagnosis and prognosis in various diseases, including the differential diagnosis  
8 of osteopenia and osteoporosis in postmenopausal women (17), prostate cancer  
9 detection (18), associations between varicocele and male infertility (19), and predictions  
10 of varicocelectomy outcomes (20).

11

12 In this study, we present a pilot investigation using NMR-based metabonomic  
13 assays to explore the association between periodontitis and breast cancer.

14

15

## 16 **Objective**

17

18

19 Identify metabolic differences between patients diagnosed with breast cancer and  
20 periodontitis from those diagnosed with breast cancer alone, using NMR-based  
21 Metabonomics applied to serum samples.

22

23

## 24 **Method**

25

26

27 This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinics  
28 Hospital of the Federal University of Pernambuco, Brazil (approval no. 6.806.140).  
29 Written informed consent was obtained from all participants prior to inclusion, and  
30 anonymity was guaranteed.

31

32

33 Twelve women undergoing treatment for breast cancer at the hospital's oncology  
34 department were recruited for the study. Among these, six were also diagnosed with  
35 periodontitis. Breast cancer diagnoses were confirmed through imaging exams  
36 (ultrasound and mammography), followed by histopathological confirmation via breast  
37 tissue biopsy.

38

39

40 Periodontitis was diagnosed through clinical periodontal examination using a  
41 North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago, IL,  
42 USA), in accordance with the criteria proposed by Barendregt *et al.* (21).

43

44

45 Patients were excluded if they had completed treatment or were in remission, or  
46 if they had fewer than ten teeth present.

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

<https://mc04.manuscriptcentral.com/jaos-scielo>

1  
2  
3

4 Nicholson *et al.* (16) defined metabolomics as the quantitative measurement of  
5 the multiparametric and dynamic metabolic response of living systems to physiological  
6 stimuli and/or genetic modifications. Metabonomic approaches have been applied to  
7 clinical diagnosis and prognosis in various diseases, including the differential diagnosis  
8 of osteopenia and osteoporosis in postmenopausal women (17), prostate cancer  
9 detection (18), associations between varicocele and male infertility (19), and predictions  
10 of varicocelectomy outcomes (20).

11

12 In this study, we present a pilot investigation using NMR-based metabonomic  
13 assays to explore the association between periodontitis and breast cancer.

14

15

## 16 **Objective**

17

18

19 Identify metabolic differences between patients diagnosed with breast cancer and  
20 periodontitis from those diagnosed with breast cancer alone, using NMR-based  
21 Metabonomics applied to serum samples.

22

23

## 24 **Method**

25

26

27 This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinics  
28 Hospital of the Federal University of Pernambuco, Brazil (approval no. 6.806.140).  
29 Written informed consent was obtained from all participants prior to inclusion, and  
30 anonymity was guaranteed.

31

32

33 Twelve women undergoing treatment for breast cancer at the hospital's oncology  
34 department were recruited for the study. Among these, six were also diagnosed with  
35 periodontitis. Breast cancer diagnoses were confirmed through imaging exams  
36 (ultrasound and mammography), followed by histopathological confirmation via breast  
37 tissue biopsy.

38

39

40 Periodontitis was diagnosed through clinical periodontal examination using a  
41 North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy Manufacturing Company, Inc., Chicago, IL,  
42 USA), in accordance with the criteria proposed by Barendregt *et al.* (21).

43

44

45 Patients were excluded if they had completed treatment or were in remission, or  
46 if they had fewer than ten teeth present.

47

48

49

50 Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectra were acquired using a  
51 Bruker spectrometer operating at 400 MHz. For each sample, 400 µL of serum was  
52 mixed with 200 µL of D<sub>2</sub>O. Spectra were obtained using the Carr-Purcell-Meiboom-Gill  
53

54

55

56

57

58

59

60

Table 1 – clinical and socio demographical data of volunteers

n	Positive Periodontitis	Negative Periodontitis	p-value
Age (mean ± SD)	55.8 ± 8.4	49.8 ± 6.2	0.23
Ethnic group			
White	1	3	
Black	5	3	0.54
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) (mean ± SD)	30.7 ± 5.3	26.9 ± 1.8	0.39
Alcoholism			
Yes	2	3	
No	4	3	1
Diabetes Mellitus			
Yes	4	3	
No	2	3	1
Smoking			
Yes	2	3	
No	4	3	1
Breast cancer in family			
Yes	3	1	
No	3	5	0.54
Menarche age (years) (mean ± SD)	12.7 ± 2.2	12.0 ± 1.2	0.86
Age when first child was born (years) (mean ± SD)	25.4 ± 5.9	22.5 ± 2.1	0.61
Menopause age (years) (mean ± SD)	48.0 ± 5.8	48.7 ± 7.0	1
Time of contraceptive use (year) (mean ± SD)	2.0 ± 3.9	8.4 ± 12.4	0.1

Table 2 – Description of breast cancer and periodontitis diagnosis

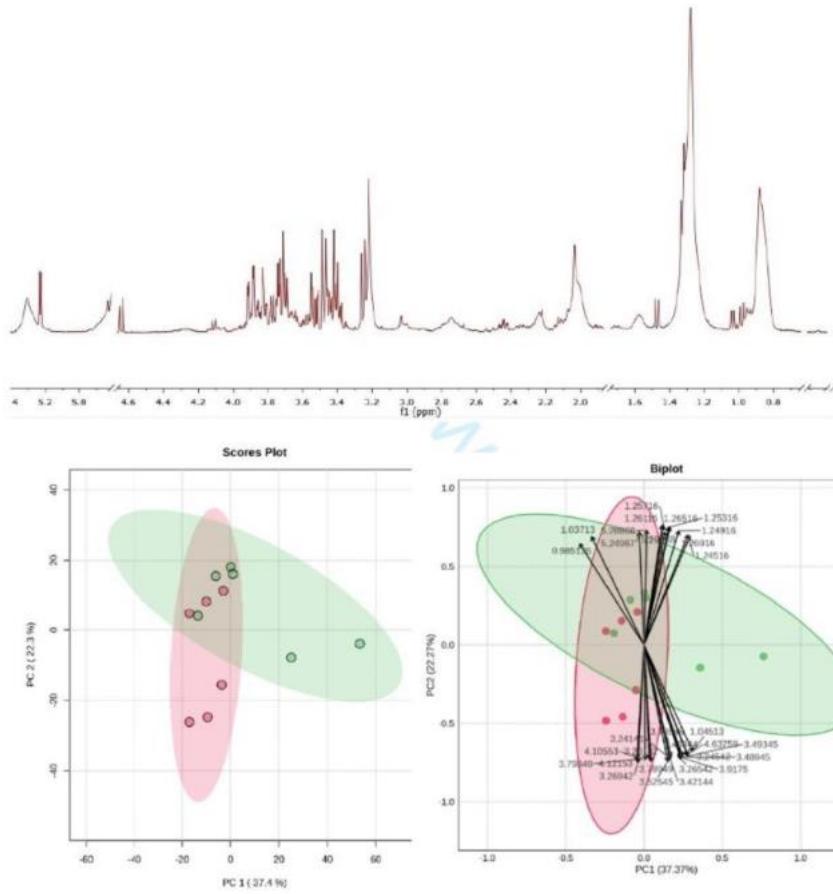
		Positive Periodontitis	Negative Periodontitis	p-value
Breast Cancer Diagnosis	Histological Type – CDI	6	6	
	1	1	0	
	2	1	2	1
Grade	3	3		
Molecular Type	Luminal A	3	0	
	Luminal B	2	3	
	Triple Negative	1	3	0.22
Cancer stage	I	1	0	
	IIA	1	0	
	IIB	3	3	
	IIIA	1	1	
	IV	0	2	0.69
Periodontitis Diagnosis	Stage	1	1	n.a.
	2	2	n.a.	-
	3	3	n.a.	-
Grade	A	1	n.a.	-
	B	1	n.a.	-
	C	4	n.a.	-
Extension	Generalized	3	n.a.	-
	Located	3	n.a.	-

This study employed two unsupervised pattern recognition methods—Principal Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis with heatmap (HCA-Heatmap). Figure 1 presents a typical <sup>1</sup>H NMR spectrum obtained in this study.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

alongside the PCA results from the dataset. Visual inspection of the spectra alone was insufficient to differentiate the samples.

Figure 1. Typical  $^1\text{H}$  NMR spectrum (CPMG, 400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) obtained in this study (top), PCA score plot (left bottom) and PCA Loading/Score biplot (right bottom) – In green, Control group (breast cancer only); in red, Case group (breast cancer and periodontitis).



PC1 and PC2 together explain 57.9% of the variance in the dataset, but the samples partially overlap in the PCA score plot. However, when considering cutoff values of zero for both PC1 and PC2, three distinct groups emerge. This grouping suggests the

1  
2  
3

4 presence of different metabolic profiles reflecting biological differences not captured by  
5 the initial classification. Specifically, three samples from volunteers diagnosed with  
6 periodontitis have negative scores on both PC1 and PC2, two samples from volunteers  
7 without periodontitis have positive scores on PC1, and seven samples present positive  
8 scores on PC2 and negative scores on PC1.  
9

10 From the PCA loading/score plot, six metabolites responsible for this  
11 discrimination were identified: isobutyrate ( $\delta$  1.04 ppm), cellobiose ( $\delta$  3.49 ppm), 3,4-  
12 dihydroxy-L-phenylalanine ( $\delta$  3.91 ppm), L-arginine ( $\delta$  3.24 ppm), deoxyguanosine ( $\delta$   
13 3.79 ppm), and lactate ( $\delta$  4.11 ppm). These metabolites showed higher serum levels in  
14 samples with negative PC2 scores. Among them, isobutyrate, cellobiose, and 3,4-  
15 dihydroxy-L-phenylalanine were more abundant in the group without periodontitis,  
16 whereas arginine, deoxyguanosine, and lactate were elevated in the group with  
17 periodontitis.  
18

19 Li *et al.* (23) reported that isobutyrate directly affects tumor cells by modulating  
20 processes related to neoplastic progression. In colorectal cancer, isobutyrate promotes  
21 metastasis through activation of the RACK1 protein, triggering an intracellular signaling  
22 cascade that leads to overexpression of genes associated with migration and invasion,  
23 such as MMP2, MMP9, and ICAM1 (24).  
24

25 Elevated serum levels of cellobiose may be linked to alterations in microbial  
26 glucose metabolism (25). Conversely, lower serum levels of 3,4-dihydroxy-L-  
27 phenylalanine in patients with periodontitis could indicate poorer clinical outcomes, as  
28 Tremmel *et al.* (26) reported that high expression of L-DOPA decarboxylase — the  
29 enzyme converting 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine to dopamine — is associated with  
30 better prognosis in breast cancer patients.  
31

32 Chen *et al.* (24) demonstrated that *Porphyromonas gingivalis* expresses RgpA  
33 and RgpB proteases, which cleave extracellular matrix proteins releasing arginine  
34 residues. This may explain higher serum arginine levels observed in periodontitis  
35 patients. Wu *et al.* (27) observed that L-arginine supplementation in LPS-stimulated  
36 bovine mammary epithelial cells significantly reduced pro-inflammatory cytokines such  
37 as IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ , suggesting a possible immunomodulatory role.  
38

39 Deoxyguanosine participates in cellular responses to oxidative stress, particularly  
40 in inflammatory contexts (28, 29). Both periodontitis and breast cancer promote oxidation  
41 of nucleosides like deoxyguanosine due to its low ionization potential, forming oxidative  
42 derivatives such as 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), a sensitive marker of oxidative  
43 DNA damage (30–32). The presence of 8-oxodG in biological fluids correlates with the  
44

45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

severity of periodontitis and other intense inflammatory conditions (28, 29). Elevated deoxyguanosine levels may reflect increased oxidative damage and activation of DNA repair pathways, indirectly indicating genomic stress in chronic inflammation (31).

9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

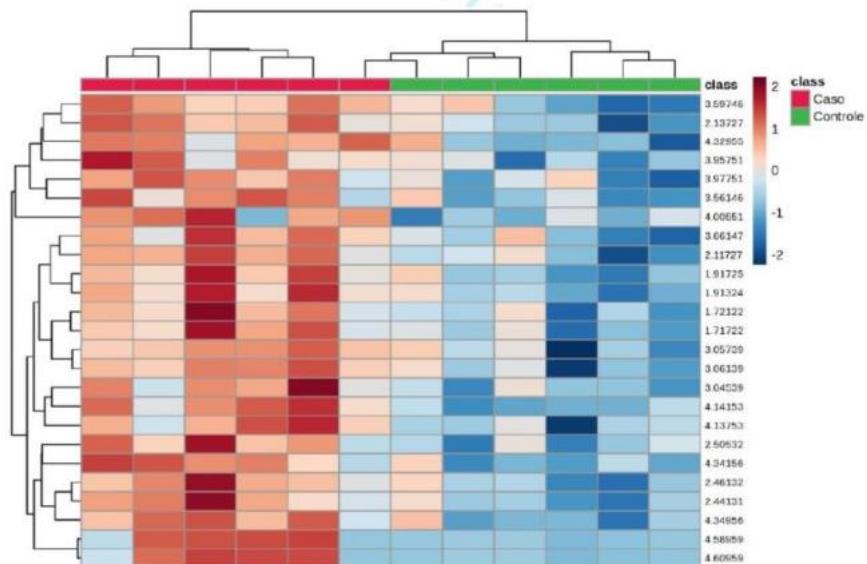
Increased lactate levels may reflect metabolic interactions between chronic inflammation and tumor progression. In periodontitis, the inflammatory and hypoxic microenvironment enhances anaerobic glycolysis and lactate production by inflammatory cells and periodontopathogenic bacteria (33, 34). In breast cancer, lactate is known to promote tumor progression by acidifying tissue, stimulating angiogenesis, metastasis, and treatment resistance, and is considered a marker of aggressiveness in several tumor subtypes (35–37). Therefore, elevated serum lactate in patients with periodontitis may foster a tumor microenvironment conducive to breast cancer progression.

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30

Figure 2 presents HCA-Heatmap result and indicates the formation of two groups containing five (positive periodontitis and breast cancer) and seven (negative periodontitis and positive breast cancer) volunteers.

31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Figure 2 – HCA-Heatmap plot from NMR spectra data. In red, Case group (periodontitis and breast cancer). In green, Control group (breast cancer only).



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13

This clustering differs slightly from the initial clinical diagnosis, which classified six samples in each group. Notably, sample 6, originally classified as periodontitis-positive, clustered with the non-periodontitis group. This suggests that this patient's metabolic profile resembles that of control individuals. Similarly, sample 3 grouped alongside sample 6, indicating comparable metabolic profiles between these two volunteers.

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

Although volunteer 6 exhibited no clinical signs of periodontitis, she has a history of cleft lip and palate—a condition known to significantly alter the oral microenvironment and promote dysbiosis (38, 39). Despite corrective surgery during early childhood, this condition continues to impact the oral microbiome (40), and its lasting effects on the metabolome cannot be ruled out.

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

The HCA-Heatmap analysis identified six metabolites that discriminate between groups: isoleucine ( $\delta$  3.66 ppm), valine ( $\delta$  3.59 ppm), tyrosine ( $\delta$  3.04 ppm), deoxyguanosine ( $\delta$  2.50 ppm), 4-hydroxyproline ( $\delta$  2.44–2.46 ppm), and lysine ( $\delta$  1.71–1.72 ppm). Overall, changes in serum metabolic profiles of patients with both periodontitis and breast cancer suggest modulation of several biological pathways, including branched-chain amino acid (BCAA) metabolism, collagen metabolism, and oxidative stress.

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

Patients with periodontitis and breast cancer exhibited higher serum levels of BCAs. Tian *et al.* (41) observed increased serum BCAs in periodontitis animal models. Moreover, *P. gingivalis* is linked to endogenous BCAA biosynthesis via branched-chain amino acid aminotransferase activity, which elevates BCAA availability and enhances expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in periodontal ligament stem cells (42). These enzymes play a central role in tissue remodeling and bone destruction, amplifying periodontitis pathogenesis through upregulation of metalloproteinases and receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ligands (41, 42).

47  
48  
49  
50  
51  
52

Similarly, elevated BCAA serum levels have been reported in breast cancer tissues (43–45). This accumulation partly results from overexpression of the L-type Amino Acid Transporter 1 (LAT1), a plasma membrane transporter facilitating BCAA uptake into tumor cells (44).

53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

The inflammatory process in periodontitis induces metalloproteinase expression, which degrades collagen and increases circulating 4-hydroxyproline levels (46, 47). This phenomenon is also reflected by elevated proline and other collagen-derived amino acids in saliva of patients with periodontal disease (48). In breast cancer, excessive

1  
2  
3

4 collagen deposition occurs especially under tumor hypoxia, activating prolyl-4-  
5 hydroxylases and raising 4-hydroxyproline availability (49, 50).  
6

7  
8  
9  
10  
11  
12

Finally, these findings suggest that periodontitis associated with breast cancer  
exacerbates the patient's clinical status. Therefore, despite the small sample size, this  
pilot study highlights the importance of periodontal evaluation in breast cancer patients.

13  
14

#### **Acknowledgments**

15  
16  
17  
18  
19

The authors would like to thank the participants of this study for their trust and  
collaboration.

20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

We are also grateful to Dr. Luiz José Batista and Dr. Inacelli Queiroz, from the Oncology  
Department of Hospital das Clínicas (HC/UFPE), for granting access to the services  
necessary for the development of this research. Special thanks to Prof. Dr. Luiz Alcino  
Gueiros, head of the Head and Neck Surgery Department at HC/UFPE, for kindly  
providing the physical space used for this study.

29  
30  
31

We thank the technical staff of the HC laboratory for their support and collaboration  
throughout the project.

32  
33  
34  
35

This study was supported by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of  
Graduate Education (CAPES).

36  
37  
38  
39

The study was approved by the Research Ethics Committee of Hospital das Clínicas,  
Federal University of Pernambuco (HC/UFPE), under approval number 6.806.140.

40  
41  
42

The authors declare no conflict of interest.

43  
44

#### **Funding**

45  
46  
47

This work was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher  
Education Personnel) through a scholarship.

48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**References**

1. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63.
2. Álvarez-Mercado AI, Navarro-Olivero M, Robles-Sánchez C, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Muñoz-Quezada S, *et al.* Gut microbiota and breast cancer: the dual role of microbes. *Cancers (Basel).* 2023;15(2):443.
3. Feng Y, Bai T, Wang Y, Fan X, Luo X, Wu L, *et al.* Role of interleukin-17A in the pathomechanisms of periodontitis and related systemic chronic inflammatory diseases. *Front Immunol.* 2022;13:988239.
4. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30–44.
5. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, *et al.* Periodontitis: consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol.* 2018;89(Suppl 1):S173–82.
6. Hieken TJ, Chen J, Hoskin TL, Walther-Antonio M, Johnson S, Ramaker S, *et al.* The microbiome of aseptically collected human breast tissue in benign and malignant disease. *Sci Rep.* 2016;6:30751.
7. Nejman D, Livyatan I, Fuks G, Gavert N, Zwang Y, Geller LT, *et al.* The human tumor microbiome is composed of tumor type–specific intracellular bacteria. *Science.* 2020;368(6494):973–80.
8. Parhi L, Alon-Maimon T, Sol A, Pikarsky E, Berger M, Bachrach G. Breast cancer colonization by *Fusobacterium nucleatum* accelerates tumor growth and metastatic progression. *Nat Commun.* 2020;11(1):3259.
9. Baima G, Iaderosa G, Corana M, Romano F, Citterio F, Butera A, *et al.* Periodontitis and risk of cancer: mechanistic evidence. *Periodontol 2000.* 2023;93(1):65–89.

- 1  
2  
3  
4 10. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic inflammation as a link  
5 between periodontitis and carcinogenesis. *Mediators Inflamm.*  
6 2019;2019:3276146.  
7  
8  
9 11. Fujiwara N, Kitamura N, Yoshida K, Yamamoto T. Involvement of  
10 Fusobacterium species in oral cancer progression: a literature review including  
11 other types of cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6207.  
12  
13 12. Gaba FI, González RC, Martínez RG. The role of oral Fusobacterium  
14 nucleatum in female breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int*  
15 *J Dent.* 2022;2022:1–12.  
16  
17 13. Li G, Wang K, Chen R, Zhang W, Liu Y, Yang Y, et al. Fusobacterium  
18 nucleatum-derived small extracellular vesicles facilitate tumor growth and  
19 metastasis via TLR4 in breast cancer. *BMC Cancer.* 2023;23(1):473.  
20  
21 14. Alon-Maimon T, Mandelboim O, Bachrach G. Fusobacterium nucleatum and  
22 cancer. *Periodontol 2000.* 2022;89(1):166–80.  
23  
24 15. Azevedo MM, Pina-Vaz C, Baltazar F. Microbes and cancer: friends or faux? *Int*  
25 *J Mol Sci.* 2020;21(9):3115.  
26  
27 16. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": understanding the  
28 metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via  
29 multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data.  
30 *Xenobiotica.* 1999;29(11):1181–9.  
31  
32 17. Pontes TA, Cardoso GP, Ribeiro-Alves M, Lima ARJ, Pinho LCM, Viana MB, et  
33 al. Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by  $^1\text{H}$   
34 NMR-based metabonomics. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217348.  
35  
36 18. Oliveira MF, Albuquerque-Neto MC, Leite TS, Ferreira CL, Pontes TA.  
37 Performance evaluate of different chemometrics formalisms used for prostate  
38 cancer diagnosis by NMR-based metabolomics. *Metabolomics.* 2024;20(8):73.  
39  
40 19. Neto FTL, Lima AR, Goulart LR, Anselmo DB, Moura MD, Cândido AL, et al.  $^1\text{H}$   
41 NMR-based metabonomics for infertility diagnosis in men with varicocele. *J*  
42 *Assist Reprod Genet.* 2020;37(9):2233–42.  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 20. Neto FTL, Lima AR, Moura MD, Anselmo DB, Goulart LR, Candido AL, *et al.*  
5 Prediction of semen analysis parameter improvement after varicocoelectomy  
6 using  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomics assays. *Andrology*. 2022;10(8):1581–92.  
7  
8 21. Barendregt DS, van der Velden U, Abbas F, Timmerman MF, Van der Weijden  
9 FA. Comparison of two automated periodontal probes and two probes with a  
10 conventional readout in periodontal maintenance patients. *J Clin Periodontol*.  
11 2006;33(4):276–82.  
12  
13 22. Pang Z, Lu Y, Zhou G, Hui F, Xu L, Viau C, *et al.* MetaboAnalyst 6.0: towards a  
14 unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation.  
15 *Nucleic Acids Res*. 2024;52:W398–406.  
16  
17 23. Li S, Zhu Y, Jin C, Wang H, Wang Y. Short-chain fatty acids and cancer.  
18 *Trends Cancer*. 2025;11(2):154–68.  
19  
20 24. Chen J, Sun Z, Liu R, Liu Z, Shi Y, Fan J, *et al.* Isobutyric acid promotes  
21 colorectal cancer metastasis through activating RACK1. *Cancer Sci*.  
22 2023;114(10):3900–13.  
23  
24 25. Hasan K, Dhungel BA, Govind R. Characterization of an operon required for  
25 growth on cellobiose in *Clostridioides difficile*. *Microbiology (Reading)*.  
26 2021;167(8):001099.  
27  
28 26. Tremmel E, Raskopf E, Balint J, Gaiser T, Hoheisel JD. L-dopa-decarboxylase  
29 (DDC) is a positive prognosticator for breast cancer patients and epinephrine  
30 regulates breast cancer cell (MCF7 and T47D) growth in vitro according to their  
31 different expression of G-protein-coupled receptors. *Int J Mol Sci*.  
32 2020;21(24):9565.  
33  
34 27. Wu T, Chen Z, Cheng H, Zhou Y, Liu D, Liang C, *et al.* Arginine relieves the  
35 inflammatory response and enhances the casein expression in bovine  
36 mammary epithelial cells induced by lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm*.  
37 2016;2016:9618795.  
38  
39 28. Konopka T, Kopeć W, Trubl G. Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-  
40 deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients.  
41 *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2007;55(6):417–22.  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
29. Toraman A, Cifcibasi E, Karayilmaz H, Cintan S, Issever H, Akar H, et al. Effects of vitamin C local application on ligature-induced periodontitis in diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20200444.
  30. Amente S, Di Palo G, Scala G, Castrignanò T, Esposito S, Lania G, et al. Genome-wide mapping of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine reveals accumulation of oxidatively-generated damage at DNA replication origins within transcribed long genes of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(1):221–36.
  31. Gorini F, Iorio E, Ricci G, Bernardini S. Towards a comprehensive view of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: highlighting the intertwined roles of DNA damage and epigenetics in genomic instability. *DNA Repair (Amst).* 2021;97:103027.
  32. Karwowski BT. The influence of 2'-deoxyguanosine lesions on the electronic properties of OXOG:::C base pairs in ds-DNA: a comparative analysis of theoretical studies. *Molecules.* 2024;29(16):3756.
  33. Ishikawa T, Sato H, Takahashi T, Okuda K, Miura H, Ishikawa S, et al. The role of lactic acid on wound healing, cell growth, cell cycle kinetics, and gene expression of cultured junctional epithelium cells in the pathophysiology of periodontal disease. *Pathogens.* 2021;10(11):1507.
  34. Luo Y, Xu W, Chen H, Xie Y, Huang Z, Zhang M, et al. Lactate inhibits osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via autophagy through the MCT1-mTOR signaling pathway. *Bone.* 2022;162:116444.
  35. Cheung SM, Lee JH, Lee JY, Lee YK, Park CK. Lactate concentration in breast cancer using advanced magnetic resonance spectroscopy. *Br J Cancer.* 2020;123(2):261–7.
  36. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? *Trends Biochem Sci.* 2016;41(3):211–8.
  37. Pérez-Tomás R, Pérez-Guillén I. Lactate in the tumor microenvironment: an essential molecule in cancer progression and treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3244.

- 1  
2  
3  
4 38. Arboleda V, Moreno LM, Lee CH, Levy N. Oral microbiome as a tool of  
5 systemic disease on cleft patients: a new landscape. *Cureus*.  
6 2023;15(2):e35444.  
7  
8  
9 39. Gheller SA, Alves LS, Boeira L, Baldissera EZ, Justo GZ, Mendes FM, et al. Periodontal findings in children and adolescents with cleft lip and/or palate: a  
10 case-control study. *Pediatr Dent*. 2021;43(2):133–9.  
11  
12  
13 40. Jiang W, Li Y, Zheng Y, Zhang H, Pan J, Liu Y, et al. Investigating oral  
14 microbiome profiles in patients with cleft lip and palate compared with the  
15 healthy control. *BMC Oral Health*. 2024;24(1):623.  
16  
17  
18 41. Tian J, Ling X, Li Y, Huang Y, Chen Z, Li J, et al. *Porphyromonas gingivalis*  
19 induces insulin resistance by increasing BCAA levels in mice. *J Dent Res*.  
20 2020;99(7):839–46.  
21  
22  
23 42. Ning X, Zhang S, Liu M, Fan M, He T, Ma X, et al. Branched-chain amino acids  
24 promote gelatinase secretion from human periodontal ligament stem cells  
25 through nuclear factor kappa-B signaling. *Arch Oral Biol*. 2025;161:106297.  
26  
27  
28 43. Nie C, He T, Zhang W, Zhang G, Ma X. Branched chain amino acids: beyond  
29 nutrition metabolism. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4):954.  
30  
31  
32 44. Wang L, Li Y, Bai Q, Cui Q, Ji H, Wang Y, et al. Multiple roles of branched-  
33 chain amino acid metabolism in tumour progression. *J Biomed Sci*.  
34 2025;32(1):41.  
35  
36 45. Zhang L, Han J. Branched-chain amino acid transaminase 1 (BCAT1) promotes  
37 the growth of breast cancer cells through improving mTOR-mediated  
38 mitochondrial biogenesis and function. *Biochem Biophys Res Commun*.  
39 2017;486(2):224–31.  
40  
41  
42 46. Gardeazabal L, Izeta A. Elastin and collagen fibres in cutaneous wound  
43 healing. *Exp Dermatol*. 2024;33(3):e15052.  
44  
45  
46  
47 47. Deng Q, Wong HM, Peng S. Salivary and gingival crevicular fluid biomarkers of  
48 periodontal health and/or obesity among children and adolescents: a systematic  
49 review and meta-analysis. *Heliyon*. 2024;10(1):e23782.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

48. Balci N, Baysal B, Tasdemir Z, Alkan BA. Free amino acid composition of saliva in patients with healthy periodontium and periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2021;25(6):4175–83.
49. Song M, Yu L, Han D, Li F, Song Y, Zhang J, et al. Increased expression of collagen prolyl hydroxylases in ovarian cancer is associated with cancer growth and metastasis. *Am J Cancer Res.* 2023;13(12):6051–62.
50. Necula L, Matei L, Manda G, Neagu M, Constantin C, Mihai S, et al. Collagen family as promising biomarkers and therapeutic targets in cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20):12415.

For Review Only