



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**GYSELLE RIBEIRO DE CARVALHO OLIVEIRA**

**ANÁLISE DE PATÓGENOS ORAIS ENTRE INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
CÂNCER GÁSTRICO E INDIVÍDUOS SEM CÂNCER.**

Belém  
Junho – 2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**GYSELLE RIBEIRO DE CARVALHO OLIVEIRA**

**ANÁLISE DE PATÓGENOS ORAIS ENTRE INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
CÂNCER GÁSTRICO E INDIVÍDUOS SEM CÂNCER.**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano

Área de concentração: Biologia Celular

Belém  
Junho – 2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- O48d Oliveira, Gyselle Ribeiro de Carvalho.  
Diferença quantitativa de patógenos orais entre indivíduos portadores de câncer gástrico e indivíduos sem câncer / Gyselle Ribeiro de Carvalho Oliveira. — 2021.  
68 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Rommel Burbano  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2021.
1. Doença periodontal. 2. Microbioma. 3. Câncer gástrico.  
4. Patógeno oral. I. Título.

CDD 571.6

---

“Porque Dele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente.

Amém!”

(Romanos 11:36)

Dedico este trabalho também ao meu filho, Yan, luz da minha vida, é ele que me incentiva a ser uma pessoa melhor a cada dia. Te amo filho!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus pela força que me sustenta, por iluminar meu caminho e colocar pessoas tão especiais na minha vida.

Ao meu esposo, Ney, pelo apoio, companheirismo, parceria e paciência. Sem você ao meu lado seria tudo mais difícil, és minha calma, amo você!

Aos meus pais, Aida e Orlando, por suprir minhas faltas, por ensinar muito sobre a vida, e principalmente proporcionar a educação que tive, não chegaria até aqui se não fosse pelo incondicional apoio de vocês. Amo vocês, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Sérgio e Henrique, é reconfortante saber que posso recorrer a vocês, mesmo morando distante, esse momento é nosso, visto que na minha jornada tive o apoio de vocês.

Ao meu orientador, prof. Dr. Rommel Burbano, por todo apoio e estímulo recebido, por não me deixar desistir, que essa parceria continue com muitos mais trabalhos pela frente, és um exemplo de competência.

Ao prof. Dr Antônio Nogueira, por sempre me estimular a chegar ainda mais longe, sou grata pelas portas que foram abertas, e pelo carinho sempre, obrigada por tudo professor!

A prof<sup>a</sup> Conceição Sales, pela amizade, pelo carinho e cuidado comigo ao longo desses anos trabalhando juntas na mesma disciplina, és uma grande inspiração como profissional, esposa, mãe e agora avó, ao seu lado tenho momentos de boas risadas.

Ao programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, pela oportunidade de proporcionar minha capacidade docente, e a secretaria do curso, pela ajuda incansável.

A Universidade Federal do Pará, instituição que fiz graduação, mestrado e agora doutorado, a qual sou docente, por todas as oportunidades oferecidas, espero poder retribuir com muito trabalho ao longo desses anos.

A todos os pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa.

## RESUMO

O câncer gástrico é o quarto câncer mais comum e o segundo maior em mortalidade no mundo. Fatores ambientais e de estilo de vida, contribuem para a malignidade da doença incluindo tabagismo, consumo excessivo de sal e conservas, baixa ingestão de vitamina C e legumes, esses fatores de risco só poderiam explicar menos de 60% de incidência do câncer gástrico. A associação de perda dentária, má higiene bucal com risco aumentado de câncer gástrico foi relatado em vários estudos epidemiológicos com diversas populações. A investigação de patógenos orais específicos relacionados ao câncer gástrico pode ajudar a identificar os mecanismos subjacentes e gerar conhecimento que poderão levar a melhora clínica, tratamento e intervenções. O objetivo do estudo foi comparar quantitativamente (qPCR) a associação entre patógenos orais em pacientes portadores de câncer gástrico (GC) e pacientes com ausência de câncer (AC), em hospital na cidade de Belém-PA. Participaram da pesquisa 192 pacientes de ambos os grupos, pareados metodologicamente em idade, etnia e sexo. Dentre as bactérias estudadas tivemos as consideradas cariogênicas: *S. mutans* e *S. sobrius*, e as *peridontopatogênicas*: *A. actinomycetemcomitans*; *T. denticola*; *T. Forsythia* e *P. gingivalis*. Os resultados sugerem uma associação quantitativa diferente na presença de patógenos orais entre indivíduos sem câncer e pacientes com câncer gástrico. Conforme observado, não se pode afirmar que as bactérias presentes na cavidade oral aumentem o risco de câncer gástrico ou sejam fatores agravantes da doença. Porém, vale ressaltar que, por fazer parte do aparelho digestivo, a falta de cuidados com a cavidade oral pode prejudicar o tratamento de pacientes com câncer gástrico.

Palavras-chave: Câncer gástrico, microbiota, doenças periodontais

## ABSTRACT

The loss of teeth and lack of oral hygiene have been associated with the risk of developing gastric cancer in several populations evidenced in epidemiological studies. In this study, we quantitatively compared the proportion of oral pathogens in individuals with gastric cancer and individuals without cancer in a referral hospital in the city of Belém, Brazil. This study evaluated 192 patients with gastric cancer and 192 patients without cancer. Periodontal clinical examination was performed, and all individuals were submitted to the collection of salivary and dental biofilms. When comparing the median periodontal indexes in the gastric and cancer-free groups, it was statistically significant in the gastric cancer group compared to the probing depth of the periodontal pocket. Levels of bacterial DNA were observed in saliva and dental plaque, with a statistically significant difference between individuals with cancer and without neoplasia in all the bacteria surveyed. Significant relationships between biological agents and gastric cancer have been found in bacterial species that cause high rates of periodontal pathology and caries. The results suggest a different quantitative association in the presence of oral pathogens between individuals without cancer and patients with gastric cancer. As noted, it cannot be said that the bacteria present in the oral cavity increase the risk of gastric cancer or are aggravating factors of the disease. However, it is worth mentioning that, as it is part of the digestive system, the lack of care for the oral cavity can negatively affect the treatment of patients with gastric cancer.

Keywords: Gastric câncer, microbiota, periodontal diseases.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de invasão de bactérias periodontais no corpo (Bourgeois et al. 2019) .....	25
Gráfico 1 – Nível médio de DNA bacteriano em relação ao grupo câncer gástrico .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistemas de classificação de Lares e da Organização Mundial de Saúde para o câncer gástrico.....	14
Tabela 2 – Distribuição das características dos participantes por status de câncer gástrico .....	33
Tabela 3 – Médias ajustadas para níveis de DNA bacteriano em relação a câncer gástrico .....	35
Tabela 4 – Comparação das médias dos níveis de DNA bacteriano entre o grupo sem câncer e os estágios das lesões de câncer gástrico .....	38

## SUMÁRIO

RESUMO	Pág. VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE TABELAS	IX

1. INTRODUÇÃO	
1.1. Câncer gástrico.....	11
1.1.1. Fatores de risco.....	14
1.1.2. Infecção por <i>Helicobacter Pylori</i> .....	16
1.1.3. Sistema de estadiamento TNM para câncer gástrico.....	17
1.2. Relação entre patógenos orais, lesões gástricas e câncer gástrico.....	20
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS. ....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
APÊNDICE A	
ANEXO	

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer Gástrico

Câncer é uma terminologia que engloba diversas doenças de fisiopatologias complexas e diversas e que acometem diferentes órgãos e sistemas. Apesar da grande diversidade fenotípica apresentada por essas afecções, designamos como câncer o conjunto de manifestações patológicas que apresentam seis características principais: manutenção da sinalização proliferativa, evasão da supressão do crescimento e divisão celular, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução de angiogênese e a ativação de mecanismos de invasão e metástase. Mais recentemente foram reconhecidos dois fatores emergentes como características principais do câncer, sendo esses a reprogramação metabólica e a evasão da resposta imune. Desta forma, atualmente é postulado que há 10 características principais e comuns a quase todas as neoplasias, e todas essas características são controladas por um conjunto de genes diferentes entre si, mas que agem em conjunto para o desencadeamento de um câncer (Hanahan e Weinberg 2011).

O tipo adenocarcinoma é responsável por cerca de 95% dos casos de tumor do estômago. Outros tipos de tumores, como linfomas e sarcomas, também podem ocorrer no estômago. Os linfomas são diagnosticados em cerca de 3% dos casos. Sarcomas são tumores raros, iniciados nos tecidos que dão origem a músculos, ossos e cartilagens. Um tipo que pode afetar o estômago é o tumor estromal gastrointestinal (INCA 2017)

A incidência de câncer gástrico (CG) vem diminuindo em todo o mundo. No entanto, ele continua a ser o quinto câncer mais comum, e ainda causa significativa morbidade e mortalidade em vários países (Bray et al. 2018). O principal modelo de carcinogênese do CG envolve várias alterações moleculares induzidas pelos fatores ambientais, incluindo: admissão de dietas com altos níveis de sal (principalmente com elevadas concentrações de sódio); má conservação de alimentos; aumento de compostos N-nitrosos na mucosa gástrica; deficiências de antioxidantes/vitamínicas (por exemplo, vitamina C); infecção por *Helicobacter pylori*; polimorfismo de genes de citocinas pró-

inflamatórias; consumo prolongado de álcool e tabaco (Correa 1992). O efeito cumulativo destas agressões sobre o epitélio gástrico ao longo dos anos leva ao desenvolvimento de neoplasia, assim, o CG normalmente tem a sua incidência elevada na a sexta década de vida, em pacientes com gastrite atrófica crônica e metaplasia intestinal (Ramos et al. 2018).

O câncer constitui um dos principais problemas de saúde pública mundial sendo responsável por aproximadamente 14 milhões de casos novos e 8,2 milhões de óbitos (Stewart e Wild 2014). Dentre os diferentes tipos de câncer que afetam humanos, o câncer gástrico (CID-10 C16) é o quinto tumor maligno mais frequente e é a terceira principal causa de morte por câncer no mundo (Ferlay et al. 2015).

Segundo as mais recentes estimativas de incidência de câncer de estômago no Brasil, estavam previstos 21.290 casos novos para o ano de 2021 (INCA 2021). As taxas de incidência ajustadas variaram entre 6 / 100.000 para mulheres e 15 / 100.000 para homens. As incidências variam de acordo com a região brasileira; nos homens, é o segundomaior incidente nas regiões Norte e Nordeste e quinto na região Sudeste. Nas mulheres, o câncer gástrico é o quarto mais comum na região norte e a sexto no Sudeste (INCA 2021).

Globalmente, as maiores taxas de mortalidade foram encontradas em Ásia Oriental (24,0 e 9,8 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente), seguido pela Europa Oriental e Sul e América Central. As menores taxas foram observadas na América do Norte (2,8 e 1,5 por 100.000 homens e mulheres) (Ferlay et al., 2015). Taxas de mortalidade no Brasil eram 12,2 e 5,2 por 100.000 homens e mulheres. As tendências estão diminuindo, mas as taxas de mortalidade permanecem altas em ambos os sexos e desiguais nas regiões geográficas (De Souza Giusti et al. 2016). Na região Norte do Brasil, o câncer gástrico, sem considerar os tumores de pele não melanoma, representa a segunda neoplasia mais frequente no sexo masculino e a terceira no sexo feminino (INCA, 2017). Além disso, o estado do Pará apresenta taxas de mortalidade historicamente acima da média brasileira (Guimarães e Muzi 2012).

Apesar de dados estatísticos revelarem um declínio da incidência do câncer gástrico em países desenvolvidos, a taxa mundial de sobrevida média cumulativa cinco anos após o diagnóstico é estimada em aproximadamente 21% (Pelucchi et al. 2014), sendo inferior a 10% quando metástases são detectadas (Orditura et al. 2014). Em Belém, essa taxa é estimada em cerca de 9-10%, constituindo o câncer gástrico um grave problema de saúde pública (INCA, 2017). A baixa sobrevida em relação a países desenvolvidos deve-se em parte ao diagnóstico dessa malignidade em estágio avançado (McLean e El-Omar 2014; Orditura et al. 2014).

O câncer gástrico apresenta resistência intrínseca à radioterapia e à quimioterapia, e, provavelmente, a prevenção é o meio mais eficaz para a redução da mortalidade causada por essa malignidade (Cervantes et al. 2013). Atualmente, apesar de alguns avanços no tratamento do câncer gástrico, a cirurgia ainda é o principal tratamento curativo (Stiekema et al. 2013; Orditura et al. 2014). Esses fatos ressaltam a gravidade dessa patologia e a necessidade do desenvolvimento de novos estudos que possam ajudar na identificação de características genéticas peculiares de um tumor, ampliando a capacidade de prever o comportamento dessa neoplasia e permitindo o estabelecimento de condutas terapêuticas mais precisas (McLean e El-Omar 2014).

A classificação de Lauren (1965) é a mais utilizada por patologistas, médicos e epidemiologistas ao redor do mundo (Yakirevich e Resnick 2013a). No entanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2010 revisou a classificação dos adenocarcinomas gástricos de acordo com padrões morfológicos comumente exibidos por tumores em outros sítios gastrointestinais, tais como intestino delgado e cólon, resultando em uma classificação mais uniforme dos tumores gástricos como um todo (Lauwers et al. 2010). A classificação de 2010 reconhece cinco tipos principais de adenocarcinoma

gástricos baseados no padrão de crescimento: papilar, tubular, mucinoso, pobrementecoeso (incluindo carcinomas em anel de sinete) e misto. A relação entre os tipos histológicos de Lauren (1965) e a classificação de 2010 pode ser vista na tabela 1.

**Tabela 1: Sistemas de classificação de Lauren e da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o câncer gástrico.**

<b>Lauren (1965)</b>	<b>OMS (2010)</b>
Intestinal	Adenocarcinoma papilar
	Adenocarcinoma tubular
	Adenocarcinoma mucinoso
Difuso	Adenocarcinoma pobremente coeso (incluindo carcinoma de células em anel de sinete e outras variantes)
Misto	Mistura entre os tipos glandulares (tubular/papilar) e pobremente coeso/em anel de sinete
Indeterminado	Carcinoma não-diferenciado
Tipos raros	Carcinoma adenoescamoso
	Carcinoma com estroma linfoide
	Adenocarcinoma hepatoide
	Carcinoma de células escamosas

Adaptado de (Yakirevich e Resnick 2013)

### 1.1.1. Fatores de risco

O câncer gástrico é uma patologia multifatorial e aspectos ambientais, comportamentais e genéticos têm importância em sua etiologia. Alguns destes fatores como idade e sexo, não podem ser modificados, enquanto outros, tais como fumo e infecção por *H. pylori*, são maleáveis (Karimi et al. 2014).

A incidência de câncer gástrico segue o padrão das outras neoplasias, cuja incidência aumenta gradativamente de acordo com o aumento da idade da população. Aproximadamente 1% dos casos ocorre em idades inferiores a 35 anos, enquanto 30% dos diagnósticos são feitos em pacientes com idade entre 75 e 84 anos (de Martel et al. 2013; Karimi et al. 2014). Homens apresentam uma incidência maior de câncer gástrico, e estatísticas mundiais estimam que a proporção de homens afetados com câncer gástrico

para cada mulher diagnosticada com a doença varia entre 2:1 e 5:1. (Karimi et al. 2014; Ferlay et al. 2015).

No tangente aos fatores socioeconômicos, o câncer gástrico e suas lesões precursoras têm sido associados a um menor tempo de educação formal e menor renda (Bonequi et al. 2013; Ferlay et al. 2015). Estes grupos populacionais apresentam uma taxa de infecção por *H. pylori* maior, consomem uma quantidade maior de alimentos em conserva e preservados em salmoura, além de possuírem menos acesso a frutas e vegetais frescos, o que pode ser o responsável pela associação entre a renda e a incidência de câncergástrico (de Martel et al. 2013; Karimi et al. 2014).

O uso excessivo de sal no preparo e na conservação de alimentos e o consumo de alimentos defumados e enlatados é um fator ambiental importante, pois estes alimentos contêm compostos N-nitrosos e benzopireno; os nitratos consumidos na dieta podem ser convertidos em nitritos por bactérias produtoras de nitrato-redutases, tais como a *H. pylori* (Grosse et al. 2015).

A associação do fumo com o câncer gástrico foi bastante difícil de ser provada, haja vista a variabilidade encontrada em diferentes estudos, mas não é muito forte (Grosse et al. 2015). Uma meta-análise de diversos estudos de coorte mostrou que o risco de câncergástrico é aumentado em 60% para homens e em 20% para mulheres fumantes quando comparados com não-fumantes, e essa associação é ainda mais fraca para ex-fumantes (Ladeiras-Lopes et al. 2008), mas o risco de câncer gástrico aumenta significativamente conforme aumenta a quantidade de cigarros consumidos por dia e a duração e pela quantidade de anos que a pessoa fuma (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2012a).

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é um agente infeccioso que tem sido ligado à diversas malignidades tais como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e carcinoma nasofaríngeo (Camargo et al., 2011). Na década de 2000 o EBV começou a ser detectado também em amostras de câncer gástrico e hoje se sabe que o câncer gástrico associado ao EBV é uma entidade nosológica distinta responsável por pelo menos 10% do total de malignidades gástricas (Chen et al., 2012) que apresenta um padrão de alterações genéticas próprio, tais como excessiva metilação em ilhas CpG (maior do que em todos os outros tumores analisados pelo The Cancer Genome Atlas até o presente momento), hipermetilação de *CDKN2A* (também conhecido como p16) e mutações em *PIK3CA* (Bass et al. 2014).

### **1.1.2. Infecção por *Helicobacter pylori***

O maior fator de risco para desenvolvimento do câncer de estômago é a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* e a infecção por esta bactéria é reconhecida como carcinogênica para humanos baseada na sua associação com o adenocarcinoma gástrico (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 2012b). A infecção por esta bactéria é o principal agente etiológico em mais de 95% das gastrites crônicas e responsável pelo aumento do risco de câncer em até nove vezes após 15 anos de seguimento (de Martel et al. 2013). Foi recentemente estimado que cerca de 75% dos adenocarcinomas distais do estômago são atribuíveis a *H. pylori* (de Martel et al. 2012). É importante frisar que a associação entre câncer gástrico e a infecção por *H. pylori* pode ser ainda mais forte; quando se inicia o processo de gastrite atrófica, uma lesão pré-maligna, onde ocorre uma redução da quantidade de bactérias presentes na mucosa gástrica, fazendo com que os títulos de IgG se tornem baixos a ponto de serem sorologicamente

indetectáveis e a detecção de IgG por ELISA é o método padrão de diagnóstico (de Martel et al. 2013).

A proteína cagA é o fator de virulência mais estudado na *H pylori* e sua presença é detectada em aproximadamente 70% das cepas isoladas no mundo, variando de 90-95% em países como China, Coréia do Sul e Japão a 40% nos Estados Unidos e Austrália (Jones et al., 2010). Cepas cagA positivas são mais associadas à incidência de câncer gástrico do que cepas negativas (Karimi et al. 2014). Após ser injetada pela *H pylori* na célula hospedeira, a proteína CagA influencia uma miríade de processos celulares, tais como a adesão celular, proliferação, diferenciação, apoptose, transcrição gênica e inflamação tecidual (Jones et al. 2010).

### **1.1.3 Sistema de estadiamento TNM para câncer gástrico**

O estadiamento descreve aspectos do câncer, como localização, se disseminou, e se está afetando as funções de outros órgãos do corpo. Conhecer o estágio do tumor ajuda na definição do tipo de tratamento e a prever o prognóstico da paciente. O sistema de estadiamento utilizado com mais frequência para o câncer de estômago é o sistema TNM do (AJCC 2016), onde TNM é abreviatura de tumor (T), linfonodo (N) e metástase (M), que se baseia em três informações principais:

- T. Indica o tamanho do tumor primário e se disseminou para outras áreas. Acompanhado de um número (0 a 4) é usado para descrever o tumor primário, particularmente o seu tamanho. Pode também ser atribuída uma letra minúscula a ou b com base na ulceração e taxa mitótica.
- N. Descreve se existe disseminação da doença para os linfonodos regionais ou se há evidência de metástases em trânsito. Representa os linfonodos regionais, é atribuído

a ele um número (0 a 3), que indica se a doença disseminou para os gânglios linfáticos. Pode também ser atribuída uma letra minúscula: a, b ou c.

- M. Indica se existe presença de metástase em outras partes do corpo, ou seja, se a doença se espalhou para outras partes do corpo.

#### - **Tumor Primário (T)**

TX. O tumor principal não pode ser avaliado.

T0. Nenhum sinal de tumor foi detectado.

Tis. As células cancerosas estão apenas na camada superior da mucosa e não invadiram as camadas mais profundas do tecido. Este estágio é denominado in situ.

T1. O tumor se desenvolveu da parte superior da mucosa para as camadas inferiores, próximo a submucosa.

T1a. O tumor está se desenvolvendo na parte muscular da mucosa.

T1b. O tumor se desenvolveu na parte muscular da mucosa e na submucosa.

T2. O tumor está se desenvolvendo para dentro da camada muscular.

T4a. O tumor se desenvolveu da parede do estômago para a serosa (revestimento externo do estômago), mas não atingiu órgãos e estruturas adjacentes.

T4b. O tumor se desenvolveu na parede do estômago e já atingiu órgãos e estruturas vizinhas.

T3. O tumor está se desenvolvendo para dentro da camada subserosa.

T4. O tumor se desenvolveu na parede do estômago e na serosa, e já pode ter atingido outro órgão (como baço, intestinos, pâncreas, rim) ou outras estruturas como os vasos sanguíneos.

#### - **Linfonodos Regionais (N)**

NX. Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0. Os linfonodos estão livres.

N1. O câncer disseminou para 1 ou 2 linfonodos próximos.

N2. O câncer disseminou para 3 a 6 linfonodos.

N3. O câncer se disseminou para 7 ou mais linfonodos.

N3a. O câncer se disseminou para 7 a 15 linfonodos.

N3b. O câncer se disseminou para mais de 16 linfonodos.

**- Metástase à Distância (M)**

M0. Ausência de metástases à distância.

M1. Metástases à distância.

**-Estágios do Câncer**

Estágio 0. Tis, N0, M0.

Estágio IA. T1, N0, M0.

Estágio IB. T1, N1, M0; T2, N0, M0.

Estágio IIA. T1, N2, M0; T2, N1, M0; T3, N0, M0.

Estágio IIB. T1, N3, M0; T2, N2, M0; T3, N1, M0; T4a, N0, M0.

Estágio IIIA. T2, N3, M0; T3, N2, M0; T4a, N1, M0.

Estágio IIIB. T3, N3, M0; T4a, N2, M0; T4b, N0 ou N1, M0.

Estágio IIIC. T4a, N3, M0; T4b, N2 ou N3, M0.

Estágio IV. Qualquer T, qualquer N, M1.

A identificação de fatores de risco, da doença em seu estágio inicial e encaminhamento ágil e adequado para o atendimento especializado, são atribuições que devem ser realizadas em atenção básica um caráter essencial para um melhor resultado terapêutico e prognóstico do câncer gástrico.

## **1.2. Relação entre patógenos orais, lesões gástricas pré-cancerosas e câncer gástrico**

A boca humana abriga um dos microbiomas mais diversos do corpo humano, incluindo vírus, fungos, protozoários e bactérias. As bactérias são responsáveis pelas duas doenças bacterianas mais comuns do homem: cárie dentária e doenças periodontais (Salazar et al. 2012).

A saúde bucal tem um grande efeito na saúde geral, as doenças da cavidade oral têm sido implicadas em várias doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doença pulmonar obstrutiva crônica, endocardite e bacteremia (Crall 2009). A cavidade oral é uma parte do sistema gastrointestinal e estudos anteriores demonstraram a influência das condições de saúde bucal no início de doenças malignas gastrointestinais (Salazar et al. 2012).

Os conceitos etiológicos da cárie dentária evoluíram ao longo dos anos, passando desde uma doença iniciada por microorganismos inespecíficos, a ser considerada uma doença infecciosa causada por bactérias específicas, até os paradigmas atuais que enfatizam uma abordagem bacteriano-ecológica mista, sendo esta responsável pelo início e patogênese da lesão (Philip et al. 2018)

*Streptococcus mutans* (Sm) é uma espécie bacteriana essencial no processo de cárie, que afeta mais de 90% da população em todo o mundo. No entanto, outras espécies acidogênicas e acidúricas / acidofílicas podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Ericksson et al. 2018). No entanto, foi no final da década de 1950 que o Sm ganhou ampla atenção na comunidade científica e, em meados da década de 1960, pesquisas clínicas e estudos laboratoriais retrataram Sm como um importante agente etiológico da cárie dentária (Loesche 1986).

O habitat natural de Sm é a cavidade oral humana, tem sido amplamente aceito que o potencial cariogênico de Sm possui três atributos principais: capacidade de sintetizar

grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir da sacarose, o que ajuda na colonização permanente de superfícies duras e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular *in situ*; a capacidade de transportar e metabolizar uma ampla gama de carboidratos em ácidos orgânicos (acidogenicidade) e a capacidade de prosperar sob condições de estresse ambiental, particularmente baixo pH (acidúrico) (Lemos 2008). O Sm não atua sozinho no desenvolvimento de cárie dentária, estudos demonstraram de forma convincente que *S. mutans* pode alterar o ambiente local, formando polissacarídeos extracelulares com baixo pH, criando assim um nicho favorável para outras espécies acidúricas prosperar (Lemos et al. 2019).

Erickson et al. (2019) relataram que a presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (Sb) mostram um papel importante no desenvolvimento e progressão da cárie dentária, portanto, é importante estabelecer a colonização dessas bactérias para avaliar o risco de desenvolver a cárie dental.

As duas espécies de estreptococos, Sm e Sb, estão associadas a cárie dentária, a capacidade acidogênica e acidúrica está diretamente associado ao potencial cariogênico dessas bactérias. Para sobreviver no meio ácido e condições específicas da cavidade oral que possui centenas de outros colonizadores microbianos como concorrentes, ambas as espécies desenvolveram numerosos mecanismos de adaptação (Conrads et al.2014)

Em vários estudos clínicos, o papel de *S. sobrinus* na sugere-se que a relação com a cárie seja aditiva à *S. mutans*. Este último está fortemente associado à cárie, mas em situações de cárie mais grave, é frequentemente encontrado junto com *S. sobrinus* (Holbrook et. al 2012; Lindquist e Emilson 2004).

Colombo et al. (2017) avaliaram através de coleta salivar e análise quantitativa da expressão da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) a detecção e os níveis

quantitativos de *S. mutans* e *S. sobrinus*, seus resultados foram significativamente maiores em indivíduos com mais lesões de cárie comparados em indivíduos com menos lesões de cárie.

Nas últimas décadas, uma mudança de paradigma foi feita em compreender o papel fundamental do microbioma na saúde e doença. Estima-se que 20% de todos os cânceres tenham etiologia microbiana (Parkin, 2006). A acumulação de evidências mostrou que os micróbios têm um papel mais potente no câncer gástrico (CG) do que se pensava anteriormente (Fitzpatrick e Katz, 2010; Ahn et al, 2012a, b).

As bactérias periodontopatogênicas, de acordo com sua patogenicidade e propriedades, estão organizadas em complexos que estão intimamente interrelacionados (Socransky et al. 1998). As bactérias do são divididas em complexos verde, roxo e amarelo e são chamadas de "primeiros colonizadores" porque são capazes de aderir ao biofilme. As bactérias do complexo laranja, compreende patógenos periodontais putativos, como *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), que geralmente aparecem após o estabelecimento dos primeiros colonizadores (Carrouel et al. 2016). Essas bactérias, classificadas como moderadamente patogênicas, associa-se a outras bactérias periodontais para formar a base da colonização do sulco gengival. As bactérias altamente patogênicas do complexo vermelho, que incluem *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) e *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) são os patógenos mais importantes na doença periodontal (Suzuki et al. 2013). A recente "Hipótese Keystone- Patógeno" (KPH) considera que certas bactérias em pequenas quantidades, como *P. gingivalis*, podem atuar no sistema imunológico do hospedeiro e converter o microbiota de simbiótica em disbiótica e provocar doença inflamatória (AlJehani 2014).

A disbiose da microbiota periodontal está associada a várias doenças crônicas, como doenças do sistema gastrointestinal. Os avanços científicos aumentaram o nível de evidência de correlação entre doença periodontal e câncer gástrico (Gao et al. 2018). O risco de desenvolver lesões gástricas pré-cancerosas é aumentado na presença de fatores periodontais potencialmente virulentos e com a natureza complexa e diversa da microbiota oral (Sun et al. 2017). Na periodontite, níveis significativos de colonização de patógenos, do complexo vermelho de Socransky e *A. actinomycetemcomitans*, estão correlacionados com um risco aumentado de lesões pré-cancerosas gástricas. Um aumento no DNA de bactérias selecionadas (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* e *A. actinomycetemcomitans*) estão associados a níveis aumentados de índices de doença periodontal (Salazar et al. 2013).

No microbioma oral, os chamados periodontopatógenos, incluindo *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Tannerella forsythia* (Tf) estão recebendo crescente interesse no contexto da etiologia do câncer. Essas bactérias periodontais têm um papel importante na patogênese da periodontite, doença inflamatória crônica que causa destruição do tecido de sustentação do dente podendo levar a perda do dente (Nieminen et al. 2018). Estudos epidemiológicos associaram patógenos periodontais a cânceres pancreáticos e orais (Ahn et al., 2012a; Michaud, 2013).

Os microbiotas orais podem contribuir para a carcinogênese por diferentes mecanismos como inibição da apoptose, ativação da proliferação celular, promoção da invasão celular, indução de inflamação crônica, e produção de agentes cancerígenos (Gallimidi et al, 2015). Patógenos desenvolvem vários mecanismos que podem promover sua capacidade de colonizar o sistema gástrico: fortes propriedades adesivas; evasão

imune; perturbação da integridade epitelial e sobrevivência intercelular (Ribet e Cossart, 2015).

A infecção por patógenos é uma das principais causas de doenças crônicas inflamação, e os tipos mais comuns são bacterianos e infecções virais (Lauritano et al. 2017). Com o avanço da medicina ocorreu uma mudança fundamental no vínculo entre bactérias e câncer (Moss e Blasser 2005). A tumorigênese pode estar associada à inflamação, e a infecção bacteriana pode participar de todo o processo de carcinogênese, afetando direta ou indiretamente a ocorrência e o desenvolvimento da doença (Lauritano et al. 2017).

Bactérias orais, produtos bacterianos e moléculas inflamatórias podem invadir o corpo humano de duas principais formas: através da corrente sanguínea ou através do trato digestivo (figura 1), Bourgeois et al. (2019).

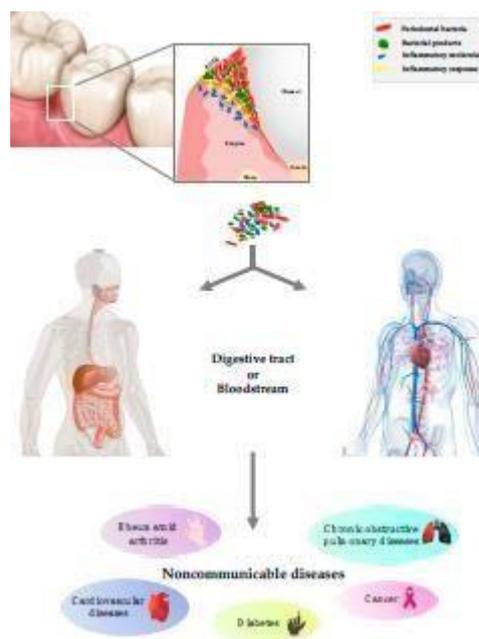


Figura 1. Processo de invasão de bactérias periodontais no corpo (Bourgeois et al. 2019).

A flora humana desempenha um papel importante nas atividades fisiológicas (Kaczmarczyk et al. 2012) e na carcinogênese (Schwabe e Jobin 2013). Existem 700 tipos de bactérias na cavidade oral normal, e incluem pelo menos 11 micobactérias e 70 gêneros (Ahn et al. 2012a), dentre os quais o complexo vermelho é um importante agente patogênico para doença periodontal (Bodet et al. 2007). O complexo vermelho consiste em *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) e *Tannerella forsythia* (Tf) (Bodet et al. 2007). Todos os três são bactérias anaeróbicas gram-negativas, podendo expressar fatores de virulência para interferir no sistema de defesa, invadir e destruir tecido periodontal e função imunológica do hospedeiro (Bodet et al. 2007).

Patógenos periodontais têm sido associados à carcinogênese oral e gastrointestinal, no entanto, os mecanismos exatos permanecem desconhecidos. *Treponema denticola* (Td) está associado a periodontite grave, uma doença inflamatória crônica que leva à perda

dentária. O espiroqueta anaeróbico Td é uma bactéria invasora devido ao seu principal fator de virulência, a proteinase semelhante à quimotripsina ligada à superfície celular (CTLP), também conhecida como dentilisina, que possui uma infinidade de funções (Nieminen 2018) como contribuir para a penetração de Td no epitélio e melhorar a adesão de Td no biofilme (Cogoni et al.2012; Fenno 2012). Além de sua associação com doença periodontal, o Td contribui para a formação de abscessos dentários e infecções do canal radicular, é um microorganismo altamente invasivo, no entanto, resultados relatando a associação de Td com malignidades é muito (Narikiyo et al, 2004).

*Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria patogênica importante que media a resposta inflamatória local da periodontite (Rafiei 2017), essa bactéria adere e invade células epiteliais gengivais, além de interferir com o metabolismo fisiológico normal e inibir apoptose, que é um fator de risco potencial para câncer (Sayehmiri et al.2015).

A microbiota oral representa uma parte importante da microbiota humana e inclui de centenas a milhares de espécies diversas, normal da flora bacteriana e tem uma função importante de proteção contra a colonização de bactérias extrínsecas que podem afetar a saúde sistêmica. Por outro lado, as doenças bucais mais comuns, gengivite e periodontite são baseadas em microrganismos. Sabe-se que os microrganismos orais se localizam preferencialmente no biofilme, quando o ecossistema sensível fica desequilibrado, por sobrecarga ou sistema imunológico debilitado ele se torna um desafio para a saúde local ou sistêmica. Portanto, a estratégia mais comum e o padrão-ouro para a prevenção de cárie, gengivite e periodontite é a remoção mecânica desses biofilmes dos dentes, restaurações ou próteses dentárias por escovação regular (Arweiler e Netuschil 2016).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Comparar quantitativamente a presença de patógenos orais em pacientes portadores de câncer gástrico (CG) e pacientes não portadores de câncer (AC) no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém/PA.

### 2.2. Objetivos específicos

a) Quantificar e comparar entre pacientes dos grupos (CG e AC) bactérias responsáveis pela doença periodontal. Dentre elas: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa); *Treponema denticola* (Td); *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Tannerella forsythia*.

b) Quantificar e comparar entre pacientes dos grupos (CG e AC) bactérias responsáveis pelo processo de cárie dental: *S. mutans* (Sm) e *S. sobrinus* (Sb).

c) Quantificar e comparar o grupo CG com os estágios de câncer gástrico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Pacientes e amostras

De acordo com a determinação da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Hospital Universitário João de Barros Barreto (10272913.8.3001.5550).

Este estudo avaliou 192 pacientes diagnosticados através de endoscopia com câncer gástrico (CG) e 192 pacientes com ausência câncer (AC), pareados metodologicamente em sexo e idade, oriundos do norte do Brasil. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido previamente. (Apêndice A). Os pacientes diagnosticados com câncer gástrico não haviam iniciado o tratamento, e ambos os grupos não haviam realizado antibioticoterapia nos últimos 3 meses.

Todos os indivíduos (CG e AC) responderam questionário realizado por um examinador qualificado, contendo perguntas e informações relacionadas no ANEXO 1. Os pacientes foram submetidos a exame clínico de saúde bucal, onde foram coletadas amostras de saliva e placa para análises microbiológicas por biologia molecular e receberam instruções de higiene oral.

#### 3.2. Detecção de *H. pylori* e *cagA* (citotoxina associada ao gene A)

*H. pylori* produz urease para converter ureia em amônia, e esta propriedade é explorada por um teste rápido de urease (Promedical, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil) para detectar a presença de *H. pylori* em amostras gástricas. Quando a urease foi detectada, o pH e a cor da solução foram alterados. A PCR foi usada para confirmar os resultados negativos e detectar a presença do gene *cagA* nas amostras positivas para *H. pylori* (*H.*

*pylori*+). Os oligonucleotídeos usados aqui foram descritos por Covacci et al. A metodologia foi realizada de acordo com de Souza et al.

### **3.3. Detecção de EBV (epstein barr vírus)**

O EBV foi detectado em amostras gástricas usando uma sonda biotinizada de 30 pb (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA-3') que é complementar ao produtoviral mais abundante em células infectadas de forma latente, o RNA-1 codificado por EBV (Eber1). O EBV é conhecido por infectar linfócitos, mas essas células não foram incluídas na presente análise. Para este ensaio, foi utilizada a hibridização in situ de RNA (ISH), de acordo com as instruções de Souza et al. As amostras foram consideradas positivas quando 5% ou mais das células epiteliais estavam coradas em marrom / vermelho.

### **3.4. Detecção de HPV (papilomavírus humano)**

Nested PCR foi usado para classificar as amostras como HPV positivas ou negativas. A primeira PCR utilizou os primers genéricos PGMY09 / 11 descritos por Gravitt et al., que amplificam a região L1 do HPV, e a segunda PCR utilizou os primers GP5 + / 6 + descritos por Jacobs et al.

Os produtos de PCR foram separados, identificados e genotipados por sequenciamento do produto de PCR com o primer GP5 +. Todas as sequências de nucleotídeos obtidas nessas análises foram comparadas com o banco de dados GenBank / NCBI usando a ferramenta de pesquisa de alinhamento BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV

16 e 18 foi investigada por RT-PCR conforme descrito por Chang et al.

### **3.5. Exame clínico periodontal**

A avaliação foi duplo cega, quanto ao diagnóstico dos pacientes envolvidos na pesquisa oral, foi realizada por dois dentistas calibrados.

O exame periodontal foi realizado por meio de sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte nº 15(Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA) em seis sítios dentários (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual) de todos os dentes presentes. Foram registrados níveis de perda de inserção clínica (PIC), definidos como a distância da junção cimento-esmalte à margem gengival livre em milímetros e profundidade de sondagem periodontal (PS), definida como a distância entre a margem gengival livre a porção mais coronal do epitélio juncional (fundo de sulco/ bolsa). O registro dicotômico para cada superfície dentária do teste de sangramento gengival foi considerado positivo se ocorresse dentro de 15 segundos após a avaliação da profundidade de sondagem.

### **3.6. Coleta salivar e biofilme dental**

Todos os indivíduos foram solicitados a mastigar um pedaço de parafina e depois expectorar suavemente de 2 a 5 ml de saliva diretamente em tubo de coleta refrigerado.

Foram coletadas seis amostras de biofilme dental de cada sujeito com curetas periodontais estéreis: quatro referentes a placa supragengival do 1º molar ou do dente mais posterior de cada quadrante e duas amostras de placa subgengival de dentes com bolsas periodontais mais profundos. As amostras de placa foram imediatamente transferidas para um tubo estéril pré-rotulado contendo 200 µl de tampão TE. Amostras de saliva e placas foram cuidadosamente agitadas por 30 segundos e imediatamente colocadas em caixa térmica contendo gelo e transferido para o laboratório dentro de 1 h para processamento adicional.

### 3.7. Análise quantitativa da expressão da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Realizou-se qPCR para detectar a presença / ausência e quantificar o DNA bacteriano nas amostras de saliva e placa. DNA genômico bacteriano foi isolado utilizando o kit de purificação de DNA MasterPure (Epicenter, Madison, WI), seguindo procedimentos previamente estabelecidos pelo fabricante. Posteriormente, a concentração total de DNA genômico de cada amostra foi quantificada utilizando um espectrofotômetro UV a 260 nm e 280 nm (NanoDrop 2000C, Thermo Scientific, Wilmington, DE). A concentração final de cada amostra de DNA foi ajustada para 10 ng / ml para ser submetida a metodologia da qPCR. A mistura de reação qPCR continha um volume total de 25 µl, que continha tampão diluído a 10 X, 2,5 mM de dNTPs/ea, 10 pmole / ml de iniciadores, 5U / ml de Taq, 50 mM MgCl<sub>2</sub> e 20 ng / ml de sonda de DNA. A reação amplificadora de DNA em um volume de 25 µl foi composta de uma diluição (1X) de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 10~100 ng de DNA total genômico e 0,4 mM de cada iniciador.

Diluições em série (de 10 vezes) das concentrações de DNA padrão de *P. gingivalis* (ATCC33277), *T. forsythensis* (ATCC43037), *T. denticola* (ATCC35404), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC29522), *S. mutans* (UA159) e *S. sobrinus* (OMZ176), foram utilizados em cada reação como controles externos para quantificação absoluta dos alvos bacterianos. Os níveis de DNA para todas as seis espécies bacterianas foram aferidos em amostras de saliva e quatro espécies bacterianas relevantes para a doença periodontal (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) foram medidos em cada amostra de placa. Testamos a colonização de *S. sobrinus* e *S. mutans* na saliva, ao invés de placa, porque as amostras da placa foram coletadas de locais

específicos de dentes exibindo bolsas periodontais mais profundas e podem não refletir verdadeiramente a prevalência geral desses microrganismos cariogênicos na cavidade oral. Uso da metodologia da qPCR envolvendo saliva total estimulada é uma metodologia cientificamente eficaz para avaliar a prevalência de *S. sobrinus* e *S. mutans* (Salazar *et al.*, 2013). A especificidade analítica do sinal fluorescente foi determinada com base na análise subsequente da curva de *melting*. Todas as reações foram realizadas em duplicata, e a análise final foi baseada na média das duas reações. Os dados foram analisados utilizando software Opticon Monitor 2 (MJ Research).

### **3.8. Análise estatística**

Primeiramente, foi realizada análises descritivas comparando os participantes com e sem lesões cancerígenas gástricas em termos sociodemográficos, estilo de vida e índices de doença periodontal, incluindo sangramento à sondagem, perda de inserção clínica e profundidade de sondagem. O teste do qui-quadrado foi utilizado para identificar as diferenças entre os estratos das variáveis categóricas. Nos casos de comparação de medianas, foi utilizado o teste t. Devido à distribuição não normal dos níveis de DNA bacteriano, esta variável foi descrita como a mediana e intervalo interquartil (IQR), enquanto o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi escolhido para avaliar as diferenças entre os níveis de DNA bacteriano em amostras de saliva e amostras de placa de pacientes e controles. As análises estatísticas dos dados foram processadas pelo software BioEstat, versão 5.0, considerando nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Distribuição dos participantes conforme características sociodemográficas.

Ao comparar a distribuição das características dos participantes conforme as lesões cancerosas gástricas, os participantes eram em sua maioria pardos (77.34%), do sexo masculino (61.98%) e tinham uma idade média de 52 anos. Teve uma maior prevalência de não fumantes nos grupos ( $p = 0,06$ ). Quando foi comparado níveis médios de índices periodontais nos grupos GC e AC, encontrou-se percentual médio mais alto no ISG estatisticamente significativo no grupo GC quando comparado ao grupo AC ( $p = 0,00001^2$ ) assim como quando comparado na profundidade de sondagem (PS) da bolsa periodontal ( $p = 0,00001^2$ ), contudo não houve diferença estatisticamente significativa quando a perda de inserção clínica (PIC) ( $p=0.1040^2$ ) (Tabela 2).

Abnet et al. (2005) relataram associações positivas entre falta de saúde bucal e perda dentária com câncer gástrico. Salazar et al. (2013) compararam níveis médios de índices periodontais em paciente sem lesão gástrica e com lesão gástrica, encontraram percentual médio mais alto de ISG nos casos com lesão do que os que não possuíam lesão, ainda em seus resultados, não houve outras diferenças significativas nos índices de doença periodontal por status do caso.

**Tabela 2.** Distribuições das características dos participantes por status de lesões cancerígenas gástricas

Características dos participantes	Lesões Gástricas		
	GC	AC	p-value <sup>1</sup>
<b>Sex, %</b>			
Men	61.98	61.98	1
Women	38.02	38.02	
<b>Age, years</b>			
Mean (SD)	52.57 (10.916)	51.20 (13.235)	0.2707 <sup>2</sup>
<b>Education, %</b>			
Less than high school	65.62	46.87	0.0281
High school	23.96	36.98	
Some college or graduate	10.42	16.15	
<b>Race, %</b>			
Black	5.21	1.56	0.0670
Brown	68.75	85.94	
Yellow	3.12	2.08	
White	18.23	8.34	
Amerindian	4.69	2.08	
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>			

Mean (SD)	23.46 (2.787)	25.25 (2.173)	0.0001 <sup>2</sup>
<b>Smoking Status, %</b>			
Positive	32.29	19.79	0.0639
Negative	67.71	80.21	
<b>Alcohol Consumption, %</b>			
Positive	41.15	37.50	0.7013
Negative	58.85	62.50	
<b>PCR urease, %</b>			
Positive	87.50	82.81	0.4630
Negative	12.50	17.19	
<b>cagA, %</b>			
Positive	67.71	55.73	0.1102
Negative	32.29	44.27	
<b>EBV, %</b>			
Positive	18.23	3.65	0.0021
Negative	81.77	96.35	
<b>HPV, %</b>			
Positive (HPV16)	2.08	0	0.1195
Positive (HPV18)	2.08	0	
Negative	95.84	100	
<b>% Bleeding sites</b>			
Mean (SD)	30.58 (4.157)	22.42 (6.990)	0.0001 <sup>2</sup>
<b>% sites with PD ≥ 3 mm</b>			
Mean (SD)	20.59 (3.879)	18.35 (6.468)	0.0001 <sup>2</sup>
<b>% sites with CAL ≥ 3 mm</b>			
Mean (SD)	32.01 (4.264)	31.06 (6.7413)	0.1040 <sup>2</sup>

PD = Pocket Depth, CAL = Clinical Attachment Loss. <sup>1</sup>p-value by chi-square test. <sup>2</sup>p-value for t-test.

## 4.2. DNA bacteriano

Com relação aos níveis de DNA bacteriano, foi observado que na saliva houveram diferenças estatisticamente significante entre os grupos GC e AC em todas as bactérias pesquisadas, entretanto, na placa dental, essas diferenças foram significantes estatisticamente somente no Pg e Tf (Tabela 3) e Gráfico 1.

O primeiro estudo a investigar associações entre os níveis de DNA bacteriano dos patógenos e presença de lesões gástricas, foi de Salazar et al. (2013) nesse estudo, não houve associação consistente entre DNA e níveis de espécies bacterianas selecionadas relacionados a doença periodontal e presença de lesões gástricas. Entre aqueles com níveis mais altos de doença periodontal, os periodontopatógenos medidos em placa foram positivamente relacionados à presença lesões gástricas, independentemente do

sexo, idade, raça, tabagismo, escolaridade, índice massa corporal (IMC), seus resultados confirmam o papel de manifestações específicas de doença periodontal e infecção periodontal no desenvolvimento de câncer gástrico.

Kuper e Adami (2000), propuseram que as infecções bacterianas estejam relacionadas a câncer gástrico através da indução de doenças crônicas sistêmicas ou inflamação gástricas.

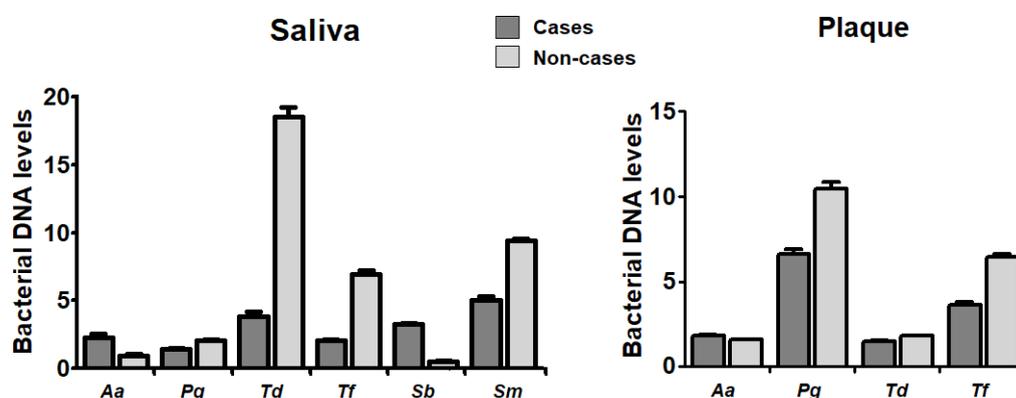


Gráfico 1. Nível médio de DNA bacteriano em relação ao GC.

**Tabela 3.** Adjusted means for bacterial DNA levels in relation to gastric cancerous lesions.

Bacterial DNA levels	Mean (SD) <sup>1</sup>		p-value <sup>2</sup>
	GC	AC	
<b>Saliva</b>			
<i>A. actinomycetemcomitans (Aa)</i>	2.2816 (0.25395)	0.9226 (0.16973)	< 0.0001
<i>P. gingivalis (Pg)</i>	1.4254 (0.06414)	2.0444 (0.08779)	< 0.0001
<i>T. denticola (Td)</i>	3.8566 (0.29879)	18.5204 (0.69393)	< 0.0001
<i>T. forsythia (Tf)</i>	2.0456 (0.11157)	6.9696 (0.26188)	< 0.0001
<i>S. sobrinus (Sb)</i>	3.2840 (0.07184)	0.5268 (0.01517)	< 0.0001
<i>S. mutans (Sm)</i>	5.0266 (0.30878)	9.4458 (0.14302)	< 0.0001
<b>Plaque</b>			
<i>A. actinomycetemcomitans (Aa)</i>	1.8086 (0.14362)	1.593 (0.06895)	0.0164
<i>P. gingivalis (Pg)</i>	6.6378 (0.63575)	10.488 (0.83665)	< 0.0001
<i>T. denticola (Td)</i>	1.5080 (0.07594)	1.809 (0.02002)	0.0010
<i>T. forsythia (Tf)</i>	3.6114 (0.39292)	6.4452 (0.34267)	< 0.0001

<sup>1</sup>Means of absolute bacterial counts (ng/ml) adjusted for age. <sup>2</sup>p-value for t-test.

Comparando as médias dos níveis de DNA bacteriano entre os grupos AC e os estágios das lesões de câncer gástrico, foi observado que na saliva relacionada a média das

bactérias Aa apresentou diferenças estatisticamente significantes em todos os estágios, assim também o mesmo ocorreu com as bactérias Td; Tf; Sb e Sm. Não houve diferença estatisticamente significativa com relação ao nível médio da bactéria Pg. Na placa, com relação ao Aa houve diferenças estatisticamente nos estágios IIIA e IIIB. Em relação as bactérias Pg; Td e Tf, apresentou diferenças estatisticamente significantes em todos os estágios quando comparados ao grupo AC (Tabela 4).

Salazar et al. (2013), observaram que na saliva, não havia evidências de que os níveis de bactérias relacionadas à cárie estavam relacionados a lesões gástricas. Parabactérias relacionadas à doença periodontal, os níveis de DNA de Tf foram significativamente associados a lesões gástricas. Não houve evidências de que níveis de outros distúrbios periodontais se relacionassem com bactérias na saliva estavam relacionadas a lesões gástricas. Na placa, no entanto, não observaram evidências de associação entre níveis de DNA de Tf; Aa e Td.

Há também algumas evidências para mostrar que níveis mais altos de patógenos periodontais estão associados a formas mais agressivas de periodontite (Casarin et al. 2010, Da Silva-Boghossian 2011). Se os resultados forem confirmados com mais pesquisas futuramente, os índices de doença periodontal e seus patógenos correspondentes podem ser considerados fatores de risco para lesões gástricas e câncer gástrico. Perfis bacterianos e condições de saúde bucal são modificáveis, identificação de fatores de risco bacteriano de malignidade podem ter importantes implicações para a prevenção do câncer. No presente estudo, as associações positivas entre os patógenos e câncer gástrico foram semelhantes entre espécies bacterianas com níveis mais altos de índices de doença periodontal. Os resultados sugerem um papel potencial que doenças periodontais podem estar relacionadas a doenças sistêmicas.

Em microbiologia, patogênese é a noção de que a comunidade funciona como um patógeno e contribui coletivamente para o desenvolvimento da doença, ao invés da ação de um membro específico sozinho (Blaser 2010). Estudos futuros são necessários para investigar exaustivamente a papel de outros patógenos orais ou microbiomas orais relacionados a inflamação e doença periodontal no desenvolvimento do câncer gástrico.

Nesse estudo, nenhuma relação aparente mostrou-se evidente entre bactérias relacionadas à cárie e câncer gástrico, esse fato é consistente com o estudo de Salazar et al. (2012) o qual não encontraram associação entre qualquer medida clínica de cárie (CPOD)

e câncer gástrico. Além disso, a associação entre bactérias periodontais e câncer gástrico eram mais evidentes para os níveis bacterianos medidos em placa em comparação com os níveis medidos na saliva total. Níveis de microrganismos na placa subgingival podem ser menos diluídos do que na saliva e, portanto, mais sensível à detecção em tempo real qPCR.

1. **Tabela 4.** Comparison of the means for bacterial DNA levels between non-cases and the stages of gastric cancer lesions.

	Non-case	Mean (p-value for t-test)							
		IA (n=3)	IB (n=9)	IIA (n=11)	IIB (n=7)	IIIA (n=29)	IIIB (n=19)	IIIC (n=6)	IV (n=108)
<b>Saliva</b>									
<i>A. actinomycetemcomitans (Aa)</i>	0.9226	2.4214 ( $< 0.0001$ )	1.9587 ( $< 0.0001$ )	2.2226 ( $< 0.0001$ )	2.2347 ( $< 0.0001$ )	2.2552 ( $< 0.0001$ )	2.2747 ( $< 0.0001$ )	2.3986 ( $< 0.0001$ )	2.4629 ( $< 0.0001$ )
<i>P. gingivalis (Pg)</i>	2.0444	1.5782 (0.0066)	1.3986 ( $< 0.0001$ )	1.3962 ( $< 0.0001$ )	1.2542 ( $< 0.0001$ )	1.3751 ( $< 0.0001$ )	1.3751 ( $< 0.0001$ )	1.4628 ( $< 0.0001$ )	1.4889 ( $< 0.0001$ )
<i>T. denticola (Td)</i>	18.5204	4.5412 ( $< 0.0001$ )	3.8583 ( $< 0.0001$ )	3.8146 ( $< 0.0001$ )	3.8651 ( $< 0.0001$ )	4.0730 ( $< 0.0001$ )	3.8196 ( $< 0.0001$ )	3.5000 ( $< 0.0001$ )	3.7445 ( $< 0.0001$ )
<i>T. forsythia (Tf)</i>	6.9696	2.1528 ( $< 0.0001$ )	1.8711 ( $< 0.0001$ )	2.0912 ( $< 0.0001$ )	2.2141 ( $< 0.0001$ )	1.9744 ( $< 0.0001$ )	2.0265 ( $< 0.0001$ )	2.1147 ( $< 0.0001$ )	2.1160 ( $< 0.0001$ )
<i>S. sobrinus (Sb)</i>	0.5268	3.1839 ( $< 0.0001$ )	3.2225 ( $< 0.0001$ )	3.3064 ( $< 0.0001$ )	3.1389 ( $< 0.0001$ )	3.2281 ( $< 0.0001$ )	3.3494 ( $< 0.0001$ )	3.1021 ( $< 0.0001$ )	3.3195 ( $< 0.0001$ )
<i>S. mutans (Sm)</i>	9.4458	4.8379 ( $< 0.0001$ )	4.9795 ( $< 0.0001$ )	5.0749 ( $< 0.0001$ )	5.0553 ( $< 0.0001$ )	5.0014 ( $< 0.0001$ )	4.9480 ( $< 0.0001$ )	5.5160 ( $< 0.0001$ )	5.1725 ( $< 0.0001$ )
<b>Plaque</b>									
<i>A. actinomycetemcomitans (Aa)</i>	1.593	1.7739 (0.0555)	1.7857 (0.0007)	1.7479 (0.0017)	1.7851 (0.0024)	1.7592 ( $< 0.0001$ )	1.7160 ( $< 0.0001$ )	1.7470 (0.0188)	1.8520 (0.0222)
<i>P. gingivalis (Pg)</i>	10.488	7.7878 (0.0069)	5.9467 ( $< 0.0001$ )	6.3421 ( $< 0.0001$ )	7.2155 ( $< 0.0001$ )	6.7047 ( $< 0.0001$ )	6.2379 ( $< 0.0001$ )	6.8111 ( $< 0.0001$ )	6.5070 ( $< 0.0001$ )
<i>T. denticola (Td)</i>	1.809	1.5064 (0.0011)	1.5586 ( $< 0.0001$ )	1.4896 ( $< 0.0001$ )	1.4279 ( $< 0.0001$ )	1.4814 ( $< 0.0001$ )	1.5077 ( $< 0.0001$ )	1.4538 ( $< 0.0001$ )	1.5074 ( $< 0.0001$ )
<i>T. forsythia (Tf)</i>	6.4452	3.1698 ( $< 0.0001$ )	3.1872 ( $< 0.0001$ )	3.4901 ( $< 0.0001$ )	3.5660 ( $< 0.0001$ )	3.6019 ( $< 0.0001$ )	3.5474 ( $< 0.0001$ )	3.3413 ( $< 0.0001$ )	3.9667 ( $< 0.0001$ )

n= number of patients with gastric cancer in each stage

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados por esta tese foram bastante consistentes, aumentando o conhecimento existente entre a relação de bactérias da cavidade oral e câncer gástrico. Sendo assim, concluiu-se que:

- a) Com relação ao nível médio de bactérias periodontais comparando o grupo GC e AC, na saliva, somente o Aa apresentou-se em maior quantidade no grupo GC comparado ao grupo AC, sendo esta diferença estatisticamente significativa.
- b) Com relação ao nível médio de bactérias cariogênicas, comparando o grupo GC e AC na saliva, tanto o Sm quanto o Sb estavam em maior quantidade no grupo AC, sendo esse resultado estatisticamente significativo.
- c) Comparando o grupo AC com os estágios de câncer gástrico não houve diferença significativa na saliva somente no estágio IA relacionada a bactéria Pg. Contudo a bactéria Aa foi a única que teve uma maior quantidade estatisticamente significativa em todos os estágios quando comparada ao grupo AC. Na placa, o Aa teve uma maior quantidade estatisticamente significativa em todos nos estágios IA, IB, IIA e IIB, quando comparada ao grupo AC.

Conforme observado, de acordo com os resultados, não se pode afirmar que bactérias da cavidade oral aumentam o risco de câncer gástrico, ou são fatores que agravam a doença, porém, vale ressaltar que devido a cavidade oral fazer parte do sistema digestivo, a falta de cuidados da saúde bucal pode interferir negativamente no tratamento do paciente portador de câncer.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abnet C, Kamangar F, Dawsey SM, Stolzenberg-Solomon RZ, Albanes D (2005) Tooth loss is associated with increased risk of gastric non-cardia adenocarcinoma in a cohort of Finnish smokers. *Scand J Gastroenterol* 40: 681–687.
- Ahn J, Chen CY, Hayes RB (2012a) Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer Causes Control* 23: 399–404.
- Ahn J, Segers S, Hayes RB (2012b) Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis* 33: 1055–1058.
- AlJehani Y (2014) Risk factors of periodontal disease: Review of the literature. *Int. J. Dent.* 182513. doi: 10.1155/2014/182513
- Ayres M, Ayres M Jr, Ayres DL, Santos AS (2007). *Bioestat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. ONG Mamirauá, Belém, PA. 364p.
- Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, Hinoue T, Laird PW, Curtis C, Shen H et al. (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513:202–209. doi: 10.1038/nature13480
- Blaser MJ (2010) Harnessing the power of the human microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 6125–6126. doi: 10.1073/pnas.1002112107. Epub 2010 Apr 1.
- Bodet C, Chandad F, Grenier D (2007) Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathologie Biologie* 55:154-162. doi: 10.1016/j.patbio.2006.07.045
- Bonequi P, Meneses-González F, Correa P, Rabkin CS e Camargo MC (2013) Risk factors for gastric cancer in Latin America: A meta-analysis. *Cancer Causes Control* 24:217– 231. doi: 10.1007/s10552-012-0110
- Bourgeois D, Inquimbert C, Ottolenghi L, Carrouel F (2019) Patógenos periodontais como fatores de risco de doenças cardiovasculares, diabetes, artrite reumatoide, câncer e doença pulmonar obstrutiva crônica - há motivos para consideração? *Microorganisms* 7(10), 424. doi.org/10.3390/microorganisms7100424
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA (2018) Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* doi: 10.3322/caac.21492. Available online at [cacancerjournal.com](http://cacancerjournal.com)
- Camargo MC, Murphy G, Koriyama C, Pfeiffer RM, Kim WH, Herrera-Goepfert R, Corvalan AH, Carrascal E, Abdirad A, Anwar M et al. (2011) Determinants of Epstein- Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer* 105:38– 43. doi: 10.1038/bjc.2011.215
- Carrouel F, Viennot S, Santamaria J, Veber P, Bourgeois D (2016) Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front. Microbiol.* 7: 840. [CrossRef] 22.

- Casarin RC, Ribeiro P, Mariano FS, Nociti FH Jr, Casati MZ (2010) Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontol Res* 45: 635–642. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01278.x. Epub 2010 Jun 10.
- Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S e Pérez-Fidalgo JA (2013) Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rev* 39:60–7. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.09.007
- Chen J e Xie J (2012) Progress on RNAi-based molecular medicines. *Int J Nanomedicine* 7:3971–3980. doi: 10.2147/IJN.S31897
- Cogoni V, Morgan-smith A, Fenno JC, Jenkinson HF, Dymock D (2012) *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase ( CTLP ) integrates spirochaetes within oral microbial communities. *Microbiology* 158:759–770.
- Colombo N, Kreling P, Ribas L, Pereira J, Kressirer C, Klein M, Tanner A, Duque C (2017) Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Arch Oral Biol*.83:282-288. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.08.006. Epub 2017 Aug 16
- Conrads G, Johannes J, Song L , Henne K, Sztajer H , Wagner-Do I, Zeng A (2014) Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome. *Journal of Oral Microbiology* 6:26189. doi.org/10.3402/jom.v6.26189
- Correa P (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 52(24):6735-40.
- Crall JJ (2009) Oral health policy development since the Surgeon General's Report on Oral Health. *Acad Pediatr.* 9:476–82. doi: 10.1016/j.acap.2009.09.017
- Da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP (2011) Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 56: 899–906. doi: 10.1016/j.archoralbio.2011.02.009. Epub 2011 Mar 12.
- De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D e Plummer M (2012) Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13:607–615. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7
- De Martel C, Forman D e Plummer M (2013) Gastric Cancer. *Epidemiology and Risk Factors.* *Gastroenterol Clin North Am* 42:219–240. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.003
- Eriksson L, Lif Holgerson P, Esberg A, Johansson I (2018) Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 97(3):275-282. doi.org/10.1177/0022034517731758
- Erickson D, Whealy R, Cocking J, Hepp C, Fofanov V (2019) Causative Agents of Early Childhood Caries: Challenges and Solutions in Culturing and Sequencing. *Microbiology Society abr*
- Fenno JC (2012) *Treponema denticola* interactions with host proteins. *J Oral Microbiol* 4: 9929.

- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F, Soerjomataram I I et al. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. doi: 10.1002/ijc.29210
- Fitzpatrick SG, Katz J (2010) The association between periodontal disease and cancer: a review of the literature. *J Dent* 38: 83–95.
- Gallimidi AB, Fischman S, Revach B, Bulvik R, Rubinstein AM, Nussbaum G, Elkin M (2015) Periodontal pathogens *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* promote tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model. *Oncotarget* 6: 22613–22623.
- Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F (2018) Oral microbiomes: More and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* 9: 488–500. doi: 10.1007/s13238-018-0548-1
- Grosse Y, Baan R, Straif K, Secretan B, El Ghissassi F e Cogliano V (2015) Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncol* 7:628–629. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70789-6
- Guimarães RM e Muzi CD (2012) Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). *Arq Gastroenterol* 49:184–188. doi: 10.1590/S0004-28032012000300003
- Hanahan D e Weinberg R a. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Holbrook WP, Magnusdottir MO (2012) Studies on strains of *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free individuals in Iceland. *J Oral Microbiol* 4: 10611. doi.org/10.3402/jom.v6.2658410611
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012a) Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 100:1–538.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012b) Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 100:1–441.
- Instituto Nacional do Câncer (2017). Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. URL: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>
- Jones KR, Whitmire JM e Merrell DS (2010) A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2010.00115
- Kaczmarczyk MM, Miller MJ, Freund GG (2012) The health benefits of dietary fiber: beyond the usual suspects of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease and colon cancer. *METABOLISM*. 61(8):1058–66. doi: 10.1016/j.metabol.2012.01.017. Epub 2012 Mar 7.

- Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, Freedman ND e Kamangar F (2014) Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23:700–713. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-13-1057
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D (2000) Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 248: 171–183.
- Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R e Lunet N (2008) Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of Yakicohort studies. *Cancer Causes Control* 19:689–701. doi: 10.1007/s10552-008-9132-y
- Lauren P (1965) the two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64:31–49.
- Lauritano D, Sbordone L, Nardone M, Iapichino A, Scapoli L, Carinci F (2017) Focus on periodontal disease and colorectal carcinoma. *Oral Implantol (Rome)*. 10(3):229–33.
- Lauwers G, Carneiro F e Graham DY (2010) WHO classification of tumours of the digestive system - 3rd chapter., 4th ed. IARC Press
- Lemos J, Burne R (2008) A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 154:3247–3255. [PubMed: 18957579]
- Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen T, Kajfasz J, Freires A, Abranches J, Brady L (2019) The Biology os *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 7(1). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018
- Lindquist B, Emilson CG (2004) Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *Caries Res* 38:95-10. doi.org/10.1159/000075932
- Loesche WJ (1986) Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50:353– 380. [PubMed: 3540569]
- McLean MH e El-Omar EM (2014) Genetics of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:664–674. doi: 10.1038/nrgastro.2014.143
- Michaud DS (2013) Role of bacterial infections in pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 34: 2193–2197.
- Moss SF, Blaser MJ (2005). Mechanisms of disease: inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2(2):90–7 1-113. doi: 10.1038/ncponc0081
- Narikiyo M, Tanabe C, Yamada Y, Igaki H, Tachimori Y, Kato H, Montesano R, Sakamoto H, Nakajima Y, Sasaki H (2004) Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers. *Cancer Sci* 95: 569–574.
- Nieminen M, Listyarifah D, Hagström J, Haglund C, Grenier D, Nordström D, Veli-Jukka U, Hernandez M, Yucel-Lindberg T, Tervahartiala T, Ainola M, Sorsa T (2018) *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive

- carcinogenesis through immunomodulation. *British Journal of Cancer* 118, 428–434 | doi: 10.1038/bjc.2017.409
- Orditura M, Galizia G, Sforza V, Gambardella V, Fabozzi A, Laterza MM, Andreozzi F, Ventriglia J, Savastano B, Mabilia A et al. (2014) Treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 20:1635–49. doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1635
- Parkin DM (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 3044: 3030–3044.
- Pelucchi C, Lunet N, Boccia S, Zhang Z-F, Praud D, Boffetta P, Levi F, Matsuo K, Ito H, Hu J et al. (2014) The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation. *Eur J Cancer Prev* 1–8. doi: 10.1097/CEJ.0000000000000170
- Philip, N, Suneja, B, Walsh, L (2018) Além do *Streptococcus mutans* : implicações clínicas dos paradigmas etiológicos da cárie dentária em evolução e seu microbioma associado. *Br Dent J* 224, 219–225. doi: 10.1038 / sj.bdj.2018.81
- Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri F, Sayehmiri K, Sheikhi A, Zamanian AM (2017). Study of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal diseases: a systematic review and meta- analysis. *Med J Islam Repub Iran*.31:62. doi: 10.18869/mjiri.31.62. eCollection 2017.
- Ramos MFKP, Ribeiro Júnior U, Viscondi JKY, Zilberstein B, Cecconello I, Eluf-Neto J (2018) Risk factors associated with the development of gastric cancer - case-control study. *Rev Assoc Med Bras*. 64(7):611-9. dx.doi.org/10.1590/1806-9282.64.07.611
- Ribet D, Cossart P (2015) How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect* 17: 173–183.
- Salazar CR, Francois F, Li Y, Corby P, Hays R, et al. (2012) Association between oral health and gastric precancerous lesions. *Carcinogenesis* 33: 399–403. doi: 10.1093/carcin/bgr284
- Salazar CR, Sun J, Li Y, Francois F, Corby P, Perez-Perez G, Dasanayake A, Pei Z, Chen Y (2013) Association between select oral pathogens and gastric precancerous lesions. *Plos One* 8(1):e51604.doi:10.1371/journal.pone.0051604. Epub 2013 jan 7
- Sayehmiri F, Sayehmiri K, Asadollahi K, Soroush S, Bogdanovic L, Jalilian FA, Emaneini M, Taherikalani M (2015) The prevalence rate of *Porphyromonas gingivalis* and its association with cancer: a systematic review and metaanalysis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 28(2):160–7. doi: 10.1177/0394632015586144. Epub 2015 May 22.
- Schwabe RF, Jobin C (2013) The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 13(11):800–12. doi: 10.1038/nrc3610. Epub 2013 Oct 17.
- Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent R (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol*. 25, 134–144. [CrossRef] 21.
- Sun J, Zhou M, Salazar CR, Hays R, Bedi S, Chen Y, Li Y (2017) Chronic Periodontal Disease, Periodontal Pathogen Colonization, and Increased Risk of Precancerous Gastric Lesions. *J. Periodontol*. 88: 1124–1134. doi: 10.1902/jop.2017.160829. Epub 2017 Jul 3.
- Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T (2013) Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int. J. Dent*. 587279. [CrossRef] .doi: 10.1155/2013/587279

Stewart BW e Wild CP (2014) World Cancer Report 2014.

Stiekema J, Cats A, Kuijpers A, van Coevorden F, Boot H, Jansen EPM, Verheij M, Balague Ponz O, Hauptmann M e van Sandick JW (2013) Surgical treatment results of intestinal and diffuse type gastric cancer. Implications for a differentiated therapeutic approach? *Eur J Surg Oncol* 39:686–93. doi: 10.1016/j.ejso.2013.02.026

Yakirevich E e Resnick MB (2013a) Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. *Gastroenterol Clin North Am* 42:261–84. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.004

Yakirevich E e Resnick MB (2013b) Pathology of Gastric Cancer and Its Precursor Lesions. *Gastroenterol Clin North Am* 42:261–284. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.004La



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

**Pesquisa: " Comparação Quantitativa da Presença de Patógenos Orais Entre Indivíduos Portadores de Câncer Gástrico e Indivíduos Não Portadores de Câncer"**

Você está sendo convidado a participar deste estudo experimental que tem como objetivo avaliar através de exame clínico oral, coleta de placa e salivar, a presença de bactérias responsáveis pela doença periodontal e cárie dental. Este estudo não apresenta benefícios diretos a você. Em qualquer etapa, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a doutoranda Gyselle Ribeiro de Carvalho Oliveira e do pesquisador Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano,. Em caso de dúvida sobre a ética da pesquisa pode-se entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), da Universidade Federal do Pará. É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, eu discuti com o pesquisador, sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu tratamento

**Nota: Este documento será assinado em duas vias, ficando uma em poder do paciente.**

\_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_\_  
 Assinatura do sujeito/Representante responsável

\_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ -  
 Assinatura da testemunha

**(Para caso de sujeitos menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).**

\_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Assinatura do sujeito que colheu o TCLE

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

REGISTRO NO CONSELHO: \_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
 ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

## QUESTIONÁRIO

GRUPO: ( ) GC ( ) AC

Nº: \_\_\_\_\_

PESO: \_\_\_\_\_kg ALTURA: \_\_\_\_\_cm IMC: \_\_\_\_\_

## 1. SEXO

- (A) Masculino.  
(B) Feminino.

## 2. IDADE

- (A) Até 24 anos.  
(B) De 25 a 29 anos.  
(C) De 30 a 39 anos.  
(D) De 40 a 49 anos.  
(E) De 50 a 54 anos.  
(F) 55 anos ou mais.

## 3. RAÇA

- (A) Branco(a).  
(B) Pardo(a).  
(C) Preto (a).  
(D) Amarelo(a).

## 4. NÍVEL DE ESCOLARIDADE

- (A) Menos que o Ensino Médio.  
(B) Ensino Médio.  
(C) Ensino Superior.

## 5. FUMANTE?

- (A) Sim.  
(B) Não.

## 6. CONSOME BEBIDA ALCOOLICA?

- (A) Sim  
(B) Não

## EXAME CLÍNICO PERIODONTAL

## Profundidade de sondagem:

	V	P	MV	DV		V	P	MV	DV
11					21				
12					22				
13					23				
14					24				
15					25				
16					26				

	V	P	MV	DV		V	P	MV	DV
31					41				
32					42				
33					43				
34					44				
35					45				
36					46				

## Perda de inserção clínica:

	V	P	MV	DV		V	P	MV	DV
11					21				
12					22				
13					23				
14					24				
15					25				
16					26				

	V	P	MV	DV		V	P	MV	DV
31					41				
32					42				
33					43				
34					44				
35					45				
36					46				

## Sangramento a sondagem:

	V	P	MV	DV		V	P	MV	DV
11					21				
12					22				
13					23				
14					24				
15					25				
16					26				

	V	P	MV	DV		V	P	MV	DV
31					41				
32					42				
33					43				
34					44				
35					45				
36					46				

## QUANTITATIVE DIFFERENCE OF ORAL PATHOGEN BETWEEN INDIVIDUALS WITH GASTRIC CANCER AND INDIVIDUALS WITHOUT CANCER

Running title: Oral pathogenes associated with gastric cancer.

Gyselle Ribeiro de C. Oliveira<sup>1</sup>; Carla de Castro Sant' Anna<sup>2,3\*</sup> <http://orcid.org/0000-0002-7171-7071>; Letícia Martins Lamarão<sup>4</sup> <http://orcid.org/0000-0002-6484-4988>; Adriana Costa Guimarães<sup>5</sup>; Carlos Machado da Rocha<sup>5</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3037-1323>; Marcelo de Oliveira Bahia<sup>6</sup> <https://orcid.org/0000-0001-6820-6521>; Carolina Rosal de Souza<sup>6</sup> <http://orcid.org/0000-0002-5123-9025>; Danielle Queiroz Calcagno<sup>2</sup> <http://orcid.org/0000-0002-4429-2573>; Paulo Pimentel de Assumpção<sup>2</sup> <http://orcid.org/0000-0003-3846-8445>; Rommel Rodriguez Burbano<sup>2,3,6</sup> <http://orcid.org/0000-0002-4872-234X>

<sup>1</sup>School of Dentistry, Federal University of Pará, R. Augusto Corrêa, 01 - Guamá, 66075-110, Belém, Pará, Brazil;

<sup>2</sup>High Complexity Oncology Unit, Federal University of Pará, Rua dos Mundurucus, Hospital Universitário João de Barros Barreto, 2º piso da UNACOM, 66.073.005, Belém, Pará, Brazil;

<sup>3</sup>Ophir Loyola Hospital, Av. Gov Magalhães Barata, nº 992 - São Brás, 66063-240, Belem, Pará, Brazil;

<sup>4</sup>Foundation Center for Hemotherapy and Hematology, Travessa Padre Eutíquio, 2109, Batista Campos, 66033-720, Belém, Pará, Brazil;

<sup>5</sup>Federal Institute of Pará, Av. Alm. Barroso, 1155 - Marco, 66093-020, Belém, Pará;

<sup>6</sup>Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará, R. Augusto Corrêa, 01 - Guamá, 66075-110, Belém, Pará, Brazil;

**\*Correspondence:** Carla de Castro Sant' Anna  
Tel +55 91 98011-8880  
Email: [santannacarla@yahoo.com.br](mailto:santannacarla@yahoo.com.br)

**Keywords:** Periodontal disease, microbiome, gastric cancer, oral pathogens.

### Abstract

The loss of teeth and lack of oral hygiene have been associated with the risk of developing gastric cancer in several populations evidenced in epidemiological studies. In this study, we quantitatively compared the proportion of oral pathogens in individuals

with gastric cancer and individuals without cancer in a referral hospital in the city of Belém, Brazil. This study evaluated 192 patients with gastric cancer and 192 patients without cancer. Periodontal clinical examination was performed, and all individuals were submitted to the collection of salivary and dental biofilms. When comparing the median periodontal indexes in the gastric and cancer-free groups, it was statistically significant in the gastric cancer group compared to the probing depth of the periodontal pocket. Levels of bacterial DNA were observed in saliva and dental plaque, with a statistically significant difference between individuals with cancer and without neoplasia in all the bacteria surveyed. Significant relationships between biological agents and gastric cancer have been found in bacterial species that cause high rates of periodontal pathology and caries. The results suggest a different quantitative association in the presence of oral pathogens between individuals without cancer and patients with gastric cancer. As noted, it cannot be said that the bacteria present in the oral cavity increase the risk of gastric cancer or are aggravating factors of the disease. However, it is worth mentioning that, as it is part of the digestive system, the lack of care for the oral cavity can negatively affect the treatment of patients with gastric cancer.

## **Introduction**

Sporadic gastric cancer is the result of several molecular changes induced by environmental factors, including admission of diets with high salt levels (mainly with high sodium concentrations); poor food preservation; increased N-nitros compounds in the gastric mucosa; antioxidant/vitamin deficiencies (e.g., vitamin C); *Helicobacter pylori* infection; proinflammatory cytokine gene polymorphism; and prolonged consumption of alcohol and tobacco [1,2]. The cumulative effect of these aggressions on the gastric epithelium over the years leads to the development of neoplasia, so gastric cancer usually has a high incidence in the sixth decade of life in individuals with

chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia [3]. Cancer is one of the major public health problems worldwide, and an estimated 19.3 million new cancer cases occurred in 2020 [4]. Among the different cancers that affect humans, gastric cancer (ICD-10 C16) is the third leading cause of cancer-related deaths in the world and the fifth most frequent malignant tumor [5].

In the northern region of Brazil, the state of Pará has mortality rates historically above the Brazilian average [6]. Gastric cancer has intrinsic resistance to radiotherapy and chemotherapy, and prevention is probably the most effective means of reducing mortality caused by this neoplasm [7]. Currently, despite some advances in the treatment of gastric neoplasia, surgery is still the main curative treatment [8,9]. These facts highlight the severity of this pathology and the need to develop new studies that may help in identifying the peculiar genetic characteristics of a tumor, increasing the ability to predict the behavior of this tumor, and allowing the establishment of more precise therapeutic approaches [10].

The human oral cavity is home to one of the most diverse microbiotas in the human body [11,12]. Bacterial cells are responsible for the two most common diseases in humans: tooth decay and periodontal disease. Human health is also influenced by oral hygiene, where pathologies of the mouth have been linked to various diseases, such as diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, cardiovascular disease, endocarditis, and the presence of bacteria in the blood [13]. The human mouth is part of the gastrointestinal system, and oral health is related to the gastrointestinal carcinogenic process [14]. Currently, the etiology of dental caries is considered an infectious disease caused by specific bacteria in which a mixed bacterial-ecological interaction is responsible for the appearance of the pathogenic lesion [15].

The imbalance of the oral microbiota is related to several chronic pathologies associated with gastrointestinal diseases. In addition, scientific advances have shown the correlation between periodontal diseases and the development of gastric cancer [16]. The risk of the appearance of precancerous gastric lesions increases in the presence of virulence of periodontal factors, in addition to the diversity of the oral microbial environment [17].

Periodontal pathogens are receiving growing interest in elucidating the etiology of cancer. The pathogenesis of periodontitis is related to important functions of

periodontal bacteria, causing destruction of dental support tissue, which can lead to tooth loss [18]. Thus, the association of periodontal pathogens and pancreatic and oral cancer has been observed in epidemiological research (Table 1) [19-23].

The invasion of oral bacteria in the human body and its products, including inflammatory molecules, can occur in two main ways: through the bloodstream or through the digestive tract [24]. To check the association between bacteria in the oral cavity and gastric cancer, this study aimed to quantify and compare between patients with gastric cancer and cancer-free (CF) patients and the bacteria responsible for periodontal disease, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), in addition to quantifying and comparing between patients from gastric cancer and CF groups in relation to the bacteria responsible for the dental caries process, such as *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*), and to quantify and compare the CF group with the stages of gastric cancer.

## **Material and methods**

### **Patients and samples**

This study evaluated 192 patients diagnosed by endoscopy with gastric cancer and 192 patients without cancer, methodologically matched in gender and age, from northern Brazil. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and all participants signed the Informed Consent Form in advance (CAAE 10272913.8.3001.5550) by the Ethics Committee of João de Barros Barreto University Hospital. Patients diagnosed with gastric cancer had not started treatment, and neither group had received antibiotic therapy in the last 3 months. The patients underwent oral health clinical examination, where saliva and plaque samples for microbiological analysis by molecular biology were collected and received oral hygiene instructions.

### **Detection of *H. pylori* and *cagA***

*H. pylori* produces urease to convert urea to ammonia, and this property is exploited by a rapid urease test (Promedical, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil) to detect the presence of *H. pylori* in gastric samples. When urease was detected, the pH and the

color of the solution were changed. PCR was used to confirm negative results and detect the presence of the *cagA* gene in the *H. pylori*-positive (*H. pylori*+) samples. The oligonucleotides used here were described by Covacci et al. [25]. The methodology was carried out according to de Souza et al. [26].

### **Detection of EBV**

EBV was detected in gastric samples by using a 30-bp biotinylated probe (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA-3') that is complementary to the most abundant viral product in latently infected cells, EBV-encoded small RNA-1 (Eber1) [27]. EBV is known to infect lymphocytes, but these cells were not included in the present analysis. For this assay, RNA in situ hybridization (ISH) was used, according to the instructions for Souza et al. [28]. Samples were considered positive when 5% or more of the epithelial cells were stained brown/red.

### **Detection of HPV**

Nested PCR was used to classify the samples as HPV positive or negative. The first PCR used the generic PGMY09/11 primers described by Gravitt et al [29], which amplify the L1 region of HPV, and the second PCR used the GP5+/6+ primers described by Jacobs et al [30]. The PCR products were separated, identified, and genotyped by sequencing the PCR product with the GP5+ primer. All the nucleotide sequences obtained in these analyses were compared with the GenBank/NCBI database using the BLAST alignment search tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The E6 and E7 oncoprotein expression of HPV 16 and 18 was investigated by RT-PCR as described by Chang et al. [31].

### **Periodontal clinical examination**

The assessment was double blind, as the diagnosis of patients involved in oral research was performed by two calibrated dentists.

Periodontal examination was performed using a North Carolina 15 millimeter periodontal (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA) probe at six dental sites (mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual, and mesioingual) of all teeth present. Clinical attachment level (CAL), defined as the distance from the cementum-enamel junction to

the free gingival margin in millimeters and pocket probing depth (PPD), was defined as the distance between the free gingival margin and the most coronal portion of the junctional epithelium (deep groove/pocket). The dichotomous record for each dental surface of the gingival bleeding test was considered positive if it occurred within 15 seconds after the assessment of the probing depth.

### **Salivary collection and dental biofilm**

All subjects were asked to chew a piece of paraffin and then gently sputter 2 to 5 ml of saliva directly into a refrigerated collection tube.

Six dental biofilm samples were collected from each subject with sterile periodontal curettes: four referring to the first molar supragingival plaque or to the most posterior tooth in each quadrant and two subgingival plaque samples from teeth with deeper periodontal pockets. Plaque samples were immediately transferred to a pre-labeled sterile tube containing 200 ml TE buffer. Saliva samples and plates were carefully shaken for 30 seconds, immediately placed in a cool box containing ice and transferred to the laboratory within 1 h for further processing.

### **Quantitative Analysis of Real-Time Polymerase Chain (qPCR) Expression**

qPCR was performed to detect presence/absence and quantify bacterial DNA in saliva and plaque samples. Bacterial samples were dissolved at 4°C and then washed in 1 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA buffer. The total genomic DNA of the bacterial samples was isolated with the MaterPure DNA purification kit (Epicenter, Madison, WI). An additional 10 µl proteinase K (Qiagen stock solution 10 mg/ml in TES buffer – 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl) and 2 µl mutanolysin [5000 U/ml in phosphate-buffered saline buffer (PBS)] were added to lysozyme stock solution (100 mg/ml in TES buffer) to ensure the release of DNA from all bacteria in the samples, followed by a phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction procedure. Subsequently, the total genomic DNA concentration of each sample was quantified using a 260 nm and 280 nm UV spectrophotometer (NanoDrop 2000C, ThermoScientific, Wilmington, DE). The final concentration of each DNA sample extracted from saliva was adjusted to 10 ng/ml to be subjected to qPCR methodology. The qPCR reaction mixture contained a total volume of 25 µl, which contained 10 X

diluted buffer, 2.5 mM DNTPs/ea, 10 pmole/ml primers, 5 U/ml Taq, 50 mM MgCl<sub>2</sub> and 20 ng/ml DNA probe. The 25 µl DNA amplification reaction was composed of a dilution (1X) of QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 10 ~ 100 ng of total genomic DNA, and 0.4 mM of each primer. The species-specific PCR primers used in this study are listed in Table 2.

Serial (10-fold) dilutions of *P. gingivalis* (ATCC33277), *T. forsythensis* (ATCC43037), *T. denticola* (ATCC35404), *A. actinomycetemcomitans* (ATCC29522), *S. mutans* (UA159) and *S. Sobrinus* (OMZ176) was used in each reaction as an external control for absolute quantification of bacterial targets. DNA levels for all six bacterial species were measured in saliva samples, and four bacterial species relevant to periodontal disease (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) were measured in each plaque sample. The colonies of *S. sobrinus* and *S. mutans* were tested in saliva instead of in plaques because plaque samples were collected from specific locations of teeth showing deeper periodontal pockets and may not truly reflect the overall prevalence of these cariogenic pathogens in saliva.

The use of qPCR methodology involving stimulated total saliva is a scientifically effective methodology for assessing the prevalence of *S. sobrinus* and *S. mutans* [17]. The analytical specificity of the fluorescent signal was determined based on subsequent melting curve analysis. All reactions were performed in duplicate, and the final analysis was based on the average of the two reactions. Data were analyzed using Opticon Monitor 2 software (MJ Research).

### **Statistical analysis**

First, we performed descriptive analyses comparing the participants with and without gastric cancerous lesions in sociodemographic terms, lifestyle and indexes of periodontal disease, including BOP (bleeding on probing), PPD and CAL. The chi-square test was used to identify the differences between the strata of categorical variables. In cases of comparison of medians, the t test was used. Due to the nonnormal distribution of bacterial DNA levels, this variable was described as the median and interquartile range (IQR), while the Mann-Whitney nonparametric test was chosen to assess differences between bacterial DNA levels in samples of saliva and plaque samples from patients and controls. The statistical analyses of the data were processed

by BioEstat software, version 5.0 [32], considering a significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

## Results and discussion

When comparing the distribution of the participants' characteristics by the status of gastric cancerous lesions, the participants were mostly brown (77.34%) and male (61.98%) and had an average age of 52 years. There was a higher prevalence of nonsmokers in the groups ( $p = 0.06$ ). A higher average body mass index (BMI) was significantly lower in the group with gastric cancer than in the FC group ( $p = 0.0001$ ), as well as when comparing the average number of bleeding sites and the average PPD ( $p = 0.00001$ ), but there was no statistically significant difference when we made the same comparison of sites with CAL ( $p = 0.1040$ ) (Table 3).

An etiological factor of gastric cancer is the presence of the bacterium *H. pylori*, which can be considered statistically a confounding factor, but the analysis shows that there is no difference between the two groups. It is difficult to find a group free of *H. pylori* bacteria in northern Brazil, since it is a public health problem [26]. HPV virus has a controversial role in gastric carcinogenesis, and there was no difference between the groups with gastric cancer and CF. On the other hand, EBV virus is a virus capable of inducing cancer in a subset of patients. This virus caused a significant difference between individuals with cancer ( $p = 0.0021$ ) and the CF group. In previous works by our research group, this difference was also revealed (26, 28).

Oral health problems and tooth loss had a positive correlation with gastric cancer. We also observed gingival bleeding rates with a higher median in cases with injury than in those without injury, and we did not find other significant differences in rates of periodontal disease. These asthma disorders have been previously reported [33].

Coker et al. [34] observed an overrepresentation of *T. forsythia* in gastric cancer compared to other precancerous stages. Other studies have not found an association of *T. forsythia* in patients with precancerous gastric lesions [14, 17]. In our study, *T. forsythia* had a low quantification in individuals with gastric cancer in relation to CF individuals ( $p < 0.0001$ ), which is probably a regional phenomenon, as we have not found similar studies in South America.

Ndegwa et al. [37] found no increased risk of gastric cancer for individuals with high levels of dental plaque. However, these authors agree that this is a conflicting result because periodontal disease, characterized by chronic inflammation and microbial dysbiosis, is a significant risk factor for orodigestive carcinogenesis.

One of the fundamental bacteria for the caries process that affects more than 90% of the world population is the species *S. mutans*. However, other species may contribute to the onset of the disease, such as acidogenic and aciduric/acidophilic species [35]. However, *S. mutans* gained attention from the scientific community in the late 1950s and clinical and laboratory research in the 1960s, where its etiological relevance in the process of tooth decay was observed [36].

Our research group decided to include *S. mutans* and *S. sobrinus* in this study with gastric cancer, since these two gram-positive bacteria, associated with dental caries, had no statistical association with patients with precancerous gastric lesions in relation to control subjects. However, it is known that an altered oral microbiota has been associated with the development of periodontal pathogenic bacteria/oral bacteria and oral, esophageal, and pancreatic cancer [21-23]. In the present study, *S. sobrinus* was more frequent in patients with gastric cancer than in CF individuals. On the other hand, there was a lower frequency of *S. mutans* in patients with gastric cancer than in CF individuals. To the best of our knowledge, this is the first time that these associations have been reported in the literature on gastric cancer.

*P. gingivalis* was found in abundance in patients with oral squamous cell carcinoma. Tumorigenesis models indicated a direct relationship between *P. gingivalis* and carcinogenesis [38]. *T. denticola* is also associated with severe periodontitis. This anaerobic spirochete is an invasive bacterium due to its main virulence factor, chymotrypsin-like proteinase. *T. denticola* was detected in samples of orodigestive tumors [18]; however, in our results, this phenomenon was not repeated in gastric cancer, where *P. gingivalis* and *T. denticola* were more abundant in CF individuals (Table 4). The fact that distant organs are not involved is an indication that increases the controversy that these two bacteria may not have systemic tumorigenic effects in addition to the local effects in their native territory, the oral cavity.

Regarding the levels of bacterial DNA, it was observed that in saliva, there were statistically significant differences between the gastric cancer and CF groups in all

bacteria surveyed; however, in dental plaque, these differences were statistically significant only in *P. gingivalis* and *T. forsythia* (Table 4).

Comparing the median bacterial DNA between CF individuals and the stages of gastric cancer lesions, it was observed that in the saliva, the median of all bacteria showed statistically significant differences in all stages. On the plaque, the same happened to the group of patients with gastric cancer, and all bacteria had different median values at all stages when compared to the group of individual CFs. We also observed that the largest number of patients had stage IV disease, which is consistent with the lack of oral care and prevention of the gastrointestinal tract (Table 5).

We found evidence that the levels of bacteria related to tooth decay are associated with gastric cancer in saliva. However, this has not been reported in precancerous gastric lesions [17]. For bacteria related to periodontal disease, the DNA levels of the bacteria studied here were significantly associated with gastric cancer. In the plaque, this association was also found in all bacteria analyzed (Table 4). In the subgingival plaque, the levels of microorganisms can be less diluted than in saliva and, therefore, the most sensitive qPCR in their detection.

There are indications that higher levels of periodontal pathogens are related to more aggressive forms of periodontitis [39]. Oral health conditions and bacterial profiles are changeable, and the bacterial risk factors identified for malignancy can have important implications for the prevention of cancerous processes. The characteristics of the oral microbiome in individuals with gastric cancer may allow the realization of a method of tracking gastric cancer through the detection of the oral microbiome. In addition, periodontal microbiota dysbiosis is associated with several chronic diseases. The association and role of *P. gingivalis* incursion in arterial cardiovascular disease has been demonstrated, for example [40].

The large size of our sample and the clinical information generated by the patients in this study, although only a start, may allow analysis of the oral microbiota to assist gastric cancer therapy and help develop individualized approaches to cancer prevention and treatment stomach. The results suggest a possible systemic disease related to or influenced by periodontal disease.

## **Conclusion**

The results found in this study were quite evident, increasing the existing knowledge on the relationship between bacteria in the oral cavity and gastric cancer. As noted, according to the results, it cannot be said that bacteria present in the oral cavity increase the risk of gastric cancer or are aggravating factors of the disease. However, it is worth mentioning that, as it is part of the digestive system, the lack of care for the oral cavity can negatively affect the treatment of patients with gastric cancer.

#### **Author contributions**

GRCO and CCS carried out the study design, development and review under the supervision of RMRB. LML, GRCO and ACG performed the bacterial identification and quantification methods. CMR and M.O. B performed the statistics. CRC, DQC, and PPA performed the selection of patients and the collection of clinical data. All authors read and approved the final manuscript.

#### **Funding**

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grants #305220/2013-6 and 402283/2013-9).

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### **Ethics**

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and all participants signed the Informed Consent Form in advance (CAAE 10272913.8.3001.5550) by the Ethics Committee of João de Barros Barreto University Hospital.

#### **References**

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 6:394-424.
2. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.* 1992; 52:6735-40.

3. Ramos MFKP, Ribeiro Júnior U, Viscondi JKY, Zilberstein B, Cecconello I, Eluf-Neto J. Risk factors associated with the development of gastric cancer - case-control study. *Rev Assoc Med Bras.* 2018; 64:611-9.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021. Online ahead of print.
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136:359-86.
6. Guimarães RM, Muzi CD. Trend of mortality rates for gastric cancer in Brazil and regions in the period of 30 years (1980-2009). *Arq Gastroenterol.* 2012; 49:184–88.
7. Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S, Pérez-Fidalgo JA. Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rev.* 2013; 39:60–7.
8. Stiekema J, Cats A, Kuijpers A, et al. Surgical treatment results of intestinal and diffuse type gastric cancer. Implications for a differentiated therapeutic approach? *Eur J Surg Oncol.* 2013; 39:686–93.
9. Oditura M, Galizia G, Sforza V, et al. Treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:1635–49.
10. McLean MH, El-Omar EM. Genetics of gastric cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014; 11:664–64.
11. Verma D, Pankaj KG, Ashok KD. Insights into the Human Oral Microbiome. *Archives of Microbiology.* 2018; 200: 525–40.
12. Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, et al. Deep Sequencing Reveals Specific Bacterial Signatures in the Subgingival Microbiota of Healthy Subjects. *Clinical Oral Investigations.* 2019; 23: 1489–93.
13. Crall JJ. Oral health policy development since the Surgeon General's Report on Oral Health. *Acad Pediatr.* 2009; 9: 476–82.
14. Salazar CR, Francois F, Li Y, et al. Association between oral health and gastric precancerous lesions. *Carcinogenesis.* 2012; 33: 399–403.

15. Philip N, Suneja, B, Walsh, L. Beyond *Streptococcus mutans*: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. *Br Dent J*. 2018; 224: 219–25.
16. Sun J, Zhou M, Salazar CR, et al. Chronic Periodontal Disease, Periodontal Pathogen Colonization, and Increased Risk of Precancerous Gastric Lesions. *J Periodontol*. 2017; 88: 1124–34.
17. Salazar CR, Sun J, Li Y, et al. Association between select oral pathogens and gastric precancerous lesions. *Plos One*. 2013; 81: e51604.
18. Nieminen M, Listyarifah D, Hagström J, et al. *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. *British Journal of Cancer*. 2018; 118: 428–34.
19. Ahn J, Chen CY, Hayes RB. Oral microbiome and oral and gastrointestinal cancer risk. *Cancer Causes Control*. 2012; 23: 399–404.
20. Michaud DS. Role of bacterial infections in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*. 2013; 34: 2193–97.
21. Kawasaki M, Ikeda Y, Ikeda E, et al. Oral Infectious Bacteria in Dental Plaque and Saliva as Risk Factors in Patients with Esophageal Cancer. *Cancer*. 2021; 127: 512–19.
22. Yuan, X, Liu Y, Kong J, et al. Different Frequencies of *Porphyromonas Gingivalis* Infection in Cancers of the Upper Digestive Tract. *Cancer Letters* 2017; 404: 1–7.
23. Kageyama S, Takeshita T, Takeuchi K, et al. Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients with Various Digestive Tract Cancers. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 1780.
24. Bourgeois D, Inquimbert C, Ottolenghi L, Carrouel F. Periodontal Pathogens as Risk Factors of Cardiovascular Diseases, Diabetes, Rheumatoid Arthritis, Cancer, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease—Is There Cause for Consideration? *Microorganisms*. 2019; 7: 424.
25. Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999; 284:1328-33.
26. de Souza CR, de Oliveira KS, Ferraz JJ, Leal MF, Calcagno DQ, Seabra AD, Khayat AS, Montenegro RC, Alves AP, Assumpção PP, Smith MC, Burbano

- RR. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14:179.
27. Bacchi CE, Bacchi MM, Rabenhorst SH, Soares FA, Fonseca LE, Jr, Barbosa HS, Weiss LMGA. AIDS-related lymphoma in Brazil: histopathology, immunophenotype, and association with Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol.* 1996; 105: 230–7.
28. de Souza CRT, Almeida MCA, Khayat AS, da Silva EL, Soares PC, Chaves LC, Burbano RMR. Association between *Helicobacter pylori*, Epstein-Barr virus, human papillomavirus and gastric adenocarcinomas. *World J Gastroenterol.* 2018; 24: 4928-38.
29. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:357-61.
30. Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 791-95.
31. Chang JT, Kuo TF, Chen YJ, Chiu CC, Lu YC, Li HF, Shen CR, Cheng AJ. Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers. *Cancer Gene Ther.* 2010; 17: 827-36.
32. Ayres M, Ayres MJR, Ayres DL and Dos santos AS. *Biostat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.* Sociedade Civil Mamirauá. 2007.
33. Lo CH, Kwon S, Wang L. Periodontal disease, tooth loss, and risk of oesophageal and gastric adenocarcinoma: a prospective study. *Gut.* 2021; 70: 620-21.
34. Coker OO, Dai Z, Nie Y, et al. Mucosal Microbiome Dysbiosis in Gastric Carcinogenesis. *Gut* 2018; 67: 1024–32.

35. Eriksson L, LifHolgerson P, Esberg A, Johansson I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*. 2018; 97:275-82.
36. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: More and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell*. 2018; 9: 488– 500.
37. Ndegwa, Nelson, Alexander Ploner, Zhiwei Liu, Ann Roosaar, Tony Axéll, and Weimin Ye. Association between Poor Oral Health and Gastric Cancer: A Prospective Cohort Study. *International Journal of Cancer*. 2018; 143: 2281–88.
38. Olsen, I, Özlem Y. Possible Role of *Porphyromonas Gingivalis* in Orodigestive Cancers. *Journal of Oral Microbiology* 2019; 11: 1563410.
39. Sun JH, Li XL, Yin J, et al. A screening method for gastric cancer by oral microbiome detection. *Oncology Reports*. 2018; 39: 2217-24.
40. Zhang Y, Wang X, Li H, et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. 2018; 99: 883–893.

**Table 1.** Main bacteria involved in oral pathogenesis studied in patients with gastric cancer.

<b>Bacterial species</b>	<b>Disease location</b>
<i>Streptococcus sobrinus</i> (Sb)	dental cavity
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)	periodontal disease
<i>Treponema denticola</i> (Td)	periodontal disease
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Aa)	periodontal disease
<i>Tannerella forsythia</i> (Tf)	periodontal disease
<i>Streptococcus mutans</i> (Sm)	dental cavity

**Table 2.** Species-specific primers that were utilized for real-time quantitative PCR (qPCR) (Salazar et al., 2013).

Selected oral pathogen	Primer pairs (5'~3')	bp <sup>a</sup>
<b>Periodontal disease pathogens</b>		
<i>P. gingivalis</i> Gram-negative anaerobe	AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404 <sup>b</sup>
<i>T. forsythensis</i> Gram-negative anaerobe	TAC AGG GGA ATA AAA TGA GAT ACG TTC ACC GCG GAC TTA ACA GC	250 <sup>c,d</sup>
<i>T. denticola</i> Gram-negative anaerobe	TAA TAC ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 <sup>b</sup>
<i>A. actinomycetemcomitans</i> Gram-negative anaerobe	ATT GGG GTT TAG CCC TGG T GGC ACA AAC CCA TCT CTG A	250 <sup>d</sup>
<b>Dental caries pathogens</b>		
<i>S. mutans</i> Gram-positive anaerobe	TCG CGA AAA AGA TAA ACA AAC A GCC CCT TCA CAG TTG GTT AG	479 <sup>e</sup>
<i>S. sobrinus</i> Gram-positive anaerobe	TTC AAA GCC AAG ACC AAG CTA GT CCA GCC TGA GAT TCA GCT TGT	88 <sup>f</sup>

\*base pairs of amplicon length

<sup>b</sup>Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, et al. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in subgingival plaque. Oral Microbiol Immunol 2009; 24: 469-77.

<sup>c</sup>Tran SD, Rudney JD. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides forsythus, and Porphyromonas gingivalis. J Clin Microbiol 1999; 37: 3504-08.

<sup>d</sup>Rudney JD, Chen R, Pan Y Endpoint quantitative PCR assays for Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis, and Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Periodontal Res. 38: 465-70.

<sup>e</sup>Chen Z, Saxena D, Caufield PW, et al. Development of species-specific primers for detection of Streptococcus mutans in mixed bacterial samples. FEMS Microbiol Lett. 2007; 272: 154-162.

<sup>f</sup>Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, et al. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. J Clin Microbiol 2003; 41:4438-41.

**Table 3.** Distribution of participant characteristics by gastric cancerous lesion status

Characteristics of the participants	Gastric Lesion		
	GC	CF	p-value <sup>1</sup>
<b>Sex (%)</b>			
Men	61.98	61.98	1
Women	38.02	38.02	
<b>Age, years</b>			
Mean (SD)	52.57 (10.916)	51.20 (13.235)	0.2707 <sup>2</sup>
<b>Education (%)</b>			
Less than high school	65.62	46.87	
High school	23.96	36.98	0.0281
Some college or graduate	10.42	16.15	
<b>Race (%)</b>			
Black	5.21	1.56	
Brown	68.75	85.94	
Yellow	3.12	2.08	0.0670
White	18.23	8.34	
Amerindian	4.69	2.08	
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>			
Mean (SD)	23.46 (2.787)	25.25 (2.173)	0.0001 <sup>2</sup>
<b>Smoking Status</b>			
Positive	32.29	19.79	
Negative	67.71	80.21	0.0639
<b>Alcohol Consumption (%)</b>			
Positive	32.29	19.79	
Negative	67.71	80.21	0.0639
<b>PCR urease (%)</b>			
Positive	87.50	82.81	

Negative	12.50	17.19	0.4630
<b>cagA (%)</b>			
Positive	67.71	55.73	
Negative	32.29	44.27	0.1102
<b>EBV (%)</b>			
Positive	18.23	3.65	
Negative	81.77	96.35	0.0021
<b>HPV (%)</b>			
Positive	2.08	0	
(HPV16)			
Positive	2.08	0	
(HPV18)			0.1195
Negative	95.84	100	
<b>Bleeding sites</b>			
(%)			
Mean (SD)	30.58 (4.157)	22.42 (6.990)	0.0001 <sup>2</sup>
<b>Sites with PPD</b>			
<b>≥ 3 mm (%)</b>			
Mean (SD)	20.59 (3.879)	18.35 (6.468)	0.0001 <sup>2</sup>
<b>Sites with CAL</b>			
<b>≥ 3 mm (%)</b>			
Mean (SD)	32.01 (4.264)	31.06(6.7413)	0.1040 <sup>2</sup>

BMI= Body Mass Index, GC= Gastric Cancer, CF= Cancer Free, PPD = Pocket Probing Depth, CAL = Clinical Attachment Level. <sup>1</sup>p-value by chi-square test. <sup>2</sup>p-value for t-test.

**Table 4.** Adjusted median s for bacterial DNA levels in relation to gastric cancerous lesions

Bacterial DNA levels	Median (IQR) <sup>1</sup>		p-value <sup>2</sup>
	GC	FC	
<b>Saliva</b>			
<i>A. actinomycetemcomitans (Aa)</i>	2.3594 (2.1367-2.5992)	0.9280 (0.8140-1.1065)	< 0.0001
<i>P. gingivalis (Pg)</i>	1.3808 (1.2485-1.6380)	2.0568 (1.8392-2.2436)	< 0.0001
<i>T. denticola (Td)</i>	3.6482 (3.2499-4.2853)	19.0366 (17.7566-19.5566)	< 0.0001
<i>T. forsythia (Tf)</i>	2.0492 (1.9708-2.1451)	7.0225 (6.7302-7.3446)	< 0.0001
<i>S. sobrinus (Sb)</i>	3.2498 (3.0548-3.4387)	0.5314 (0.5127-0.5517)	< 0.0001
<i>S. mutans (Sm)</i>	5.1746 (4.8102-5.4868)	9.4285 (9.2324-9.6245)	< 0.0001
<b>Dental Plaque</b>			
<i>A. actinomycetemcomitans (Aa)</i>	1.7214 (1.6410-1.8276)	1.5863 (1.4225-1.6838)	< 0.0001
<i>P. gingivalis (Pg)</i>	6.5364 (5.4225-7.3187)	10.5563 (8.7321-11.1147)	< 0.0001
<i>T. denticola (Td)</i>	1.5241 (1.4495-1.5873)	1.8279 (1.7559-1.9116)	< 0.0001
<i>T. forsythia (Tf)</i>	3.5175 (3.2131-3.9476)	6.2397 (5.8068-6.8193)	< 0.0001

GC= Gastric Cancer, CF= Cancer Free, IQR= interquartile range, <sup>1</sup>Medians of absolute bacterial counts (ng/ml) adjusted for age. <sup>2</sup>p-value for Mann-Whitney test, IQR= interquartile range.

**Table 5.** Comparison of the median s for bacterial DNA levels between non-cases and the stages of gastric cancer lesions

		<b>Median (p-value for Mann-Whitney test)</b>							
	<b>Non-case</b>	IA (n=3)	IB (n=9)	IIA (n=11)	IIB (n=7)	IIIA (n=29)	IIIB (n=19)	IIIC (n=6)	IV (n=108)
<b>Saliva</b>									
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (Aa)	0.9280	2.6027 (0.0007)	2.0648 (< 0.0001)	2.2591 (< 0.0001)	2.3052 (< 0.0001)	2.2635 (< 0.0001)	2.2482 (< 0.0001)	2.4598 (< 0.0001)	2.4425 (< 0.0001)
<i>P. gingivalis</i> (Pg)	2.0568	1.5840 (0.0061)	1.3652 (< 0.0001)	1.3757 (< 0.0001)	1.2080 (< 0.0001)	1.3358 (< 0.0001)	1.3113 (< 0.0001)	1.3711 (0.0003)	1.4472 (< 0.0001)
<i>T. denticola</i> (Td)	19.0366	4.4287 (0.0006)	3.8353 (< 0.0001)	3.5581 (< 0.0001)	3.7817 (< 0.0001)	4.0994 (< 0.0001)	3.6386 (< 0.0001)	3.1388 (< 0.0001)	3.6437 (< 0.0001)
<i>T. forsythia</i> (Tf)	7.0225	2.1872 (0.0006)	1.9866 (< 0.0001)	2.0532 (< 0.0001)	2.0947 (< 0.0001)	1.9911 (< 0.0001)	2.0538 (< 0.0001)	1.9860 (< 0.0001)	2.0551 (< 0.0001)
<i>S. sobrinus</i> (Sb)	0.5314	3.0582 (0.0006)	3.1276 (< 0.0001)	3.4207 (< 0.0001)	3.0464 (< 0.0001)	3.0885 (< 0.0001)	3.4207 (< 0.0001)	3.0265 (< 0.0001)	3.2912 (< 0.0001)
<i>S. mutans</i> (Sm)	9.4285	4.9918 (0.0006)	5.0705 (< 0.0001)	5.1590 (< 0.0001)	5.2186 (< 0.0001)	5.0729 (< 0.0001)	5.0771 (< 0.0001)	5.6576 (< 0.0001)	5.2480 (< 0.0001)
<b>Plaque</b>									
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (Aa)	1.5863	1.8021 (0.0150)	1.8276 (0.0011)	1.7256 (0.0013)	1.8058 (0.0014)	1.7469 (< 0.0001)	1.6996 (0.0005)	1.7489 (0.0068)	1.7056 (< 0.0001)
<i>P. gingivalis</i> (Pg)	10.5563	8.0431 (0.0008)	6.1636 (< 0.0001)	6.5555 (< 0.0001)	7.2602 (< 0.0001)	6.8336 (< 0.0001)	5.7006 (< 0.0001)	7.2513 (< 0.0001)	6.5161 (< 0.0001)
<i>T. denticola</i> (Td)	1.8279	1.5064 (0.0037)	1.5586 (< 0.0001)	1.4896 (< 0.0001)	1.4279 (< 0.0001)	1.4814 (< 0.0001)	1.5077 (< 0.0001)	1.4538 (0.0003)	1.5074 (< 0.0001)
<i>T. forsythia</i> (Tf)	6.2397	3.0745 (0.0006)	3.3550 (< 0.0001)	3.2835 (< 0.0001)	3.2500 (< 0.0001)	3.5000 (< 0.0001)	3.6156 (< 0.0001)	3.4892 (< 0.0001)	3.5950 (< 0.0001)

n= number of patients with gastric cancer in each stage