

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
“VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ DENTARĂ
DEPARTAMENTUL I**

COCHENȚIU ADRIANA



TEZĂ DE DOCTORAT

**FACTORI DE PROTECȚIE ȘI MANAGEMENTUL
COMPLICAȚIILOR ORO-DENTARE DUPĂ CHIMIOTERAPIE
LA PACIENȚI ADULȚI CU NEOPLASME SOLIDE**

– R E Z U M A T –

Coordonator științific:

PROF. UNIV. DR. LAURA-CRISTINA RUSU

**T i m i ș o a r a
2 0 2 4**

INTRODUCERE

Cancerul are un impact major asupra societății la nivel mondial. Statisticile ne spun că până în 2040, numărul de noi cazuri de cancer pe an va crește la 29,9 milioane, iar numărul de decese cauzate de cancer la 15,3 milioane [1]. În ultimele decenii, putem vedea progresul în terapia cancerului evident prin schimbarea ratelor de mortalitate, precum și prin concentrarea asupra calității vieții pacientului [2]. Pacienții care urmează terapii anti-cancer au o multitudine de efecte secundare care afectează calitatea vieții lor într-o măsură mai mare sau mai mică.

Starea de sănătate orală joacă un rol esențial în calitatea generală a vieții unei persoane. Starea de sănătate orală este grav afectată de efectele secundare ale terapiilor anti-cancer, cum ar fi chirurgia, chimioterapia, radioterapia și transplantul de celule stem [3]. Cavitata bucală este foarte sensibilă la efectele toxice ale chimioterapiei și radiațiilor ionizante, care au o acțiune asupra celulelor sau celulelor slab diferențiate, cu o rată mitotică ridicată, prin urmare, mucoasa orală, care reprezintă una dintre apărările organismului împotriva invaziei microbiene, este compromisă. Modificările țesuturilor pot varia de la a fi complet inofensive la modificări severe care pot provoca durere și sângerare și pot duce chiar la întreruperea tratamentului curent.

Răspunsul inflamator al mucoasei epiteliale la efectele citotoxice ale chimioterapiei și radioterapiei duce la mucozită, cel mai întâlnit și dureros efect secundar al tratamentelor antineoplazice [4]. Leziunile mucoasei orale tind să fie extrem de dureroase, afectează nutriția și igiena orală și cresc riscul de infecție locală și sistemică. Studiile epidemiologice au arătat că o parte din pacienții care primesc chimioterapie pentru tumori solide vor prezenta complicații orale.

Având în vedere progresele înregistrate în alte domenii ale tratamentului de susținere pentru pacienții cu chimioterapie, o nouă deschidere este creată pentru managementul oro-dentar, unde colaborarea interdisciplinară și o abordare centrată pe pacient sunt fundamentale pentru domeniul oncologic.

Scopul acestui studiu a fost de a investiga incidența complicațiilor oro-dentare în timpul chimioterapiei la pacienții adulți cu diferite forme de tumori maligne solide, altele decât cervico-faciale, în scopul evaluării necesității de a adera la un protocol de igienă orală în timpul tratamentului și identificarea factorilor potențiali determinanți cu impact asupra acestei patologii.

Prima parte a tezei constă în trei capitole principale care includ informațiile actuale existente referitoare la incidență, prevenție, epidemiologie, factori de risc și gestionarea curentă a complicațiilor dentare în urma chimioterapiei la pacienții adulți. Partea specială a tezei se bazează pe trei studii independente principale care completează subiectele discutate în partea generală care dezvăluie contribuția personală.

Primul studiu a fost o cercetare retrospectivă care a avut ca scop evaluarea nivelului de cunoștințe în rândul pacienților cu privire la importanța igienei orale și a stării dentare optime pentru a minimiza apariția efectelor adverse în timpul tratamentului cu chimioterapie într-o clinică oncologică din România.

Acest studiu clinic prospectiv, longitudinal, efectuat pe un grup de studiu inițial a înrolat 71 de pacienți după diagnosticarea cu cancer (altul decât cancerul de cap și gât) și admiși pentru chimioterapie la Oncocenter, o clinică privată de oncologie în partea de Vest a României, între 1 noiembrie 2022 și 30 iunie 2023. Perioada de urmărire a fost de șase luni (Figura 1).

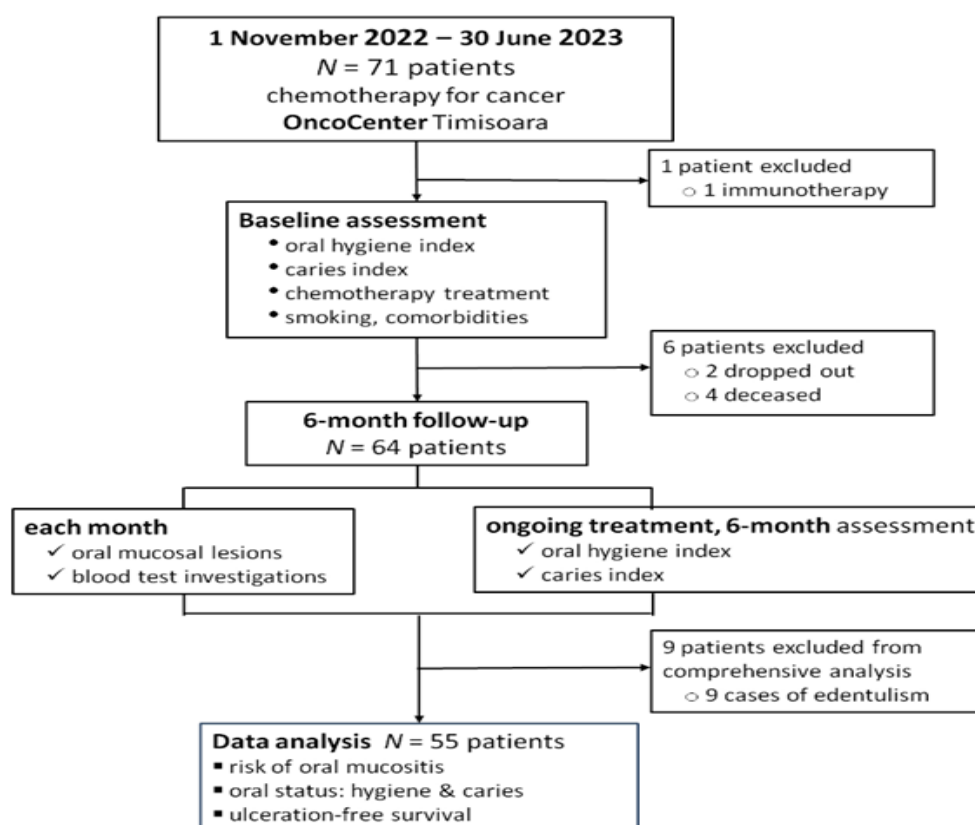


Figura 1. Schema studiului

Protocolul de studiu a fost revizuit și aprobat de Comisia de Etică al Universității de Medicină și Farmacie “Victor Babeș” din Timișoara, România (Aprobare nr.

76/16.11.2021 rev. 26.05.2023). Toți participanții la studiu și-au dat consimțământul scris în cunoștință de cauză.

Rezultate

Tabel 1. Rezultatele testelor de laborator în timpul perioadei de urmărire timp de șase luni (N = 64 pacienți în total)

	Blood test			
	Hemoglobin ^(a)	Leukocytes ^(a)	Thrombocytes ^(a)	NLR ^(a)
Month 1	13.10 ± 1.32	6926.41 ± 2510.28	284973.44 ± 92719.45	2.72 ± 1.86
Month 2	12.52 ± 1.48	6614.49 ± 3792.06	288952.38 ± 90300.11	3.17 ± 2.29
Month 3	12.33 ± 1.50	6629.37 ± 3078.35	278442.67 ± 113581.23	2.91 ± 1.82
Month 4	11.86 ± 1.55	5886.38 ± 3016.51	255515.63 ± 96240.60	2.72 ± 1.66
Month 5	11.57 ± 1.55	5850.30 ± 3835.29	248343.75 ± 95526.65	2.95 ± 1.89
Month 6	11.44 ± 1.43	5881.72 ± 2539.56	244873.44 ± 102850.65	2.92 ± 1.77

^(a) mean ± standard deviation

Abbreviation: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio

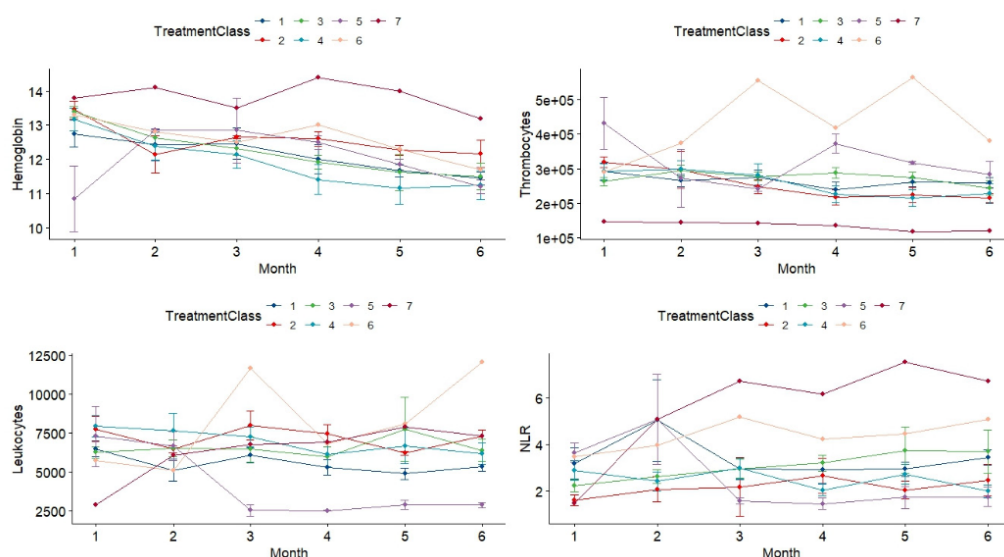


Figura 2. Rezultatele testelor lunare de laborator în timpul tratamentului cu chimioterapie

Tabel 2. Evaluarea caracteristicilor de bază și a modificărilor la șase luni

Variable	All patients N = 55	Complied with oral hygiene protocol		p-value ^{(a),(b)}
		Yes (N = 33)	No (N=22)	
Baseline hygiene index ^(a)	0.97 ± 0.81	0.60 ± 0.43	1.53 ± 0.93	< 0.001**
6-month hygiene index ^(a)	1.10 ± 0.88	0.69 ± 0.48	1.72 ± 0.98	< 0.001**
Change in hygiene index ^(a)	0.13 ± 0.12	0.09 ± 0.07	0.12 ± 0.15	0.003**
Baseline DFMT index ^(a)	18.65 ± 7.67	15.33 ± 6.33	23.64 ± 6.86	< 0.001**
6-month DFMT index ^(a)	19.15 ± 7.50	15.94 ± 6.14	23.95 ± 6.85	< 0.001**
Change in DFMT index ^(a)	0.49 ± 0.81	0.61 ± 0.93	0.32 ± 0.57	0.340
Mucositis grade 2 or more ^(b)	25 (45.5%)	11 (33.3%)	14 (63.5%)	0.027*

^(a) mean ± standard deviation; non-normal distribution; Mann-Whitney U test

^(b) observed frequency (percentage); asymptotic chi-square test

Statistical significance: *, p < 0.05; **, p < 0.001

Tabel 3. Analiza Cox de regresie a bolii, a supraviețuirii fără ulcerații în primele 6 luni ale pacienților cu chimioterapie, diagnostic de cancer (altul decât cancerul capului și gâtului), cu respectarea protocolului de igienă ca predictor independent.

Cox proportional-hazards model: first ulceration month ~ compliance with hygiene protocol			
Controlling for: age, sex, baseline hygiene index, class of treatment			
Predictor	B \pm Std. Err	p-value	HR (95% CI)
Compliance with hygiene protocol	-1.874 \pm 0.584	0.00134**	0.154 (0.049 – 0.483)

Abbreviations: B \pm Std. err, coefficient of regression \pm standard error; CI, confidence interval; HR, hazard ratio
Statistical significance: ** p < 0.01

Analizând rezultatele și comparându-le cu cele existente în literatura de specialitate, se pare că serviciile sunt axate în principal pe tratament, în timp ce beneficiile prevenției sunt adesea trecute cu vederea.

Studiul nostru, longitudinal, pe șase luni a confirmat incidența mucozitei orale la pacienții români, cu neoplasme și ar contribui la creșterea dovezilor care evaluează importanța respectării protocolului de igienă orală în timpul chimioterapiei la pacienții cu diferite forme de cancer, altele decât cancerul capului și gâtului. Analiza realizată a confirmat protocolul de igienă orală ca un factor de protecție independent și, de asemenea, a justificat riscul crescut de ulcerații orale din cauza nerespectării recomandărilor stricte de igienă orală de mai mult de șase ori la pacienții de aceeași vârstă, sex, indice de igienă inițial și clasă de tratament. Pacienții cu cancer au obligația de a-și controla sănătatea orală de-a lungul căii dificile a chimioterapiei, indiferent de vârstă, practicile anterioare de igienă orală sau tratamentul special.

Al doilea studiu de cercetare a fost un studiu longitudinal de șase luni între septembrie 2021 și mai 2023, un studiu observațional, retrospectiv, analizând înregistrările de la o clinică oncologică din Vestul României pentru pacienții diagnosticați cu tumori solide și tratați cu chimioterapie. Datele de diagnostic au fost obținute din dosarele medicale furnizate de clinica oncologică, în timp ce pacienții au contribuit cu date auto-raportate printr-un chestionar care acoperă detalii demografice, incidența complicațiilor dentare ca efecte adverse ale tratamentului citostatic, precum și obiceiurile, atitudinile și cunoștințele legate de aceste complicații și sănătatea orală. Protocolul de studiu a fost revizuit și aprobat de Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie, "Victor Babeș" din Timișoara, România (Numărul de Aprobare 76/16.11.2021 rev 26.05.2023).

Pacienții au fost 22 de bărbați și 49 de femei, cu vârste cuprinse între 25 și 90 de ani (Tabelul 4).

Tuturor pacienților li s-a cerut să răspundă la un chestionar autoadministrat care a inclus informații despre complicațiile orale care au apărut în timpul tratamentului chimioterapic, gradul de cunoaștere și aplicare a metodelor de prevenție pentru

sănătatea orală. În prima parte a chestionarului, au fost colectate date despre vârstă, sex, zonă de proveniență, nivelul de educație, indicele de masă corporală, consumul de alcool și dulciuri, prezența unei proteze detașabile și frecvența igienei dentare.

Tabel 4. Profilul sociodemografic și al obiceiurilor pacienților adulți cu cancer

Variables	N	%
<i>Gender</i>		
male	22	30.9%
female	49	69.0%
<i>Age (in years)</i>		
25-50	12	16.9%
50-90	59	83.0%
<i>Education</i>		
eight classes	7	9.85%
ten classes	6	8.45%
twelve classes	11	15.4%
vocational school	10	14.0%
high school	18	25.3%
university	19	26.7%
<i>Body mass index</i>		
normal (18.5-24.9)	26	36.6%
high	44	61.9%
low	1	1.4%
<i>Alcohol consumption</i>		
yes	5	7.04%
no	66	92.9%
<i>Smoking (years)</i>		
0	40	56.3%
5-20	16	22.5%
25-40	14	19.7%
40-90	1	1.4%
<i>Sweets consumption</i>		
yes	22	30.9%
no	49	69.0%
<i>Origin</i>		
country	15	21.1%
city	56	78.8%
<i>Oral hygiene (frequency/day)</i>		
once	34	47.8%
two	31	43.6%
three	6	8.4%
<i>Prosthesis mobile</i>		
yes	27	38.0%
no	44	61.9%

Informațiile legate de diagnosticul și localizarea cancerului au fost extrase din dosarele medicale ale fiecărui pacient. Conținutul chestionarului a fost validat în două etape. În procesul de validare al conținutului, personalul medical al clinicii de oncologie unde au fost colectate datele pentru studiu a fost rugat să evalueze conținutul și să ofere sugestii pentru modificări dacă există.

Rezultate

În acest studiu, au fost evaluați 71 de pacienți cu vârsta cuprinsă între 25-92 de ani, 49 au fost femei (69,0%) și 22 de bărbați (30,9 %). În rândul participanților, proporția de cancer de sân a fost de 38,0%, cancer pulmonar 19,7%, cancer de tract genital 14,08% și 27,5% alte tipuri de neoplasme. În ceea ce privește nivelul de educație, 26,7% au absolvit o universitate, 25,3% au absolvit liceul, 14,0% au urmat o școală profesională, 15,4% au absolvit 12 clase, 8,45% au terminat 10 clase și 9,85% au terminat 8 clase. Aproximativ 43,6% dintre pacienți consumau tutun, în timp ce 7,04% consumau alcool și 30,9% consumau dulciuri în mod regulat la momentul diagnosticării (Figura 3).

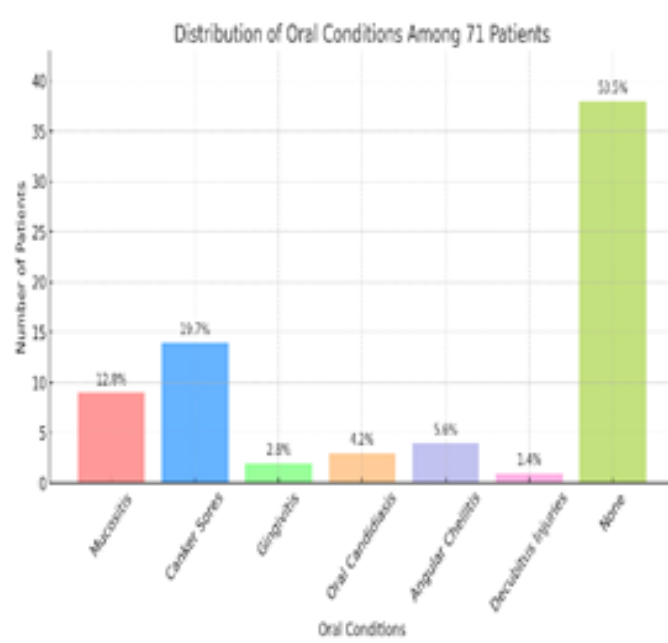


Figura 3. Complicațiile mucoasei orale

Rezultatele indică faptul că majoritatea persoanelor din toate categoriile de diagnostic se abțin de la alcool, sugerând că nu există o corelație semnificativă între consumul de alcool și diagnostice. În ceea ce privește consumul de dulce, au fost observate modele diferite, unele grupuri de diagnostic prezentând atât consumatori ($y=1$), cât și non-consumatori ($y=0$). În plus, obiceiurile de fumat au fost diferite între diagnostice, anumite grupuri având rate mai mari de fumat, în timp ce altele au fost predominant nefumători; în special, ultimele două diagnostice au constatat exclusiv din fumători, fără nefumători prezenți (Figura 4).

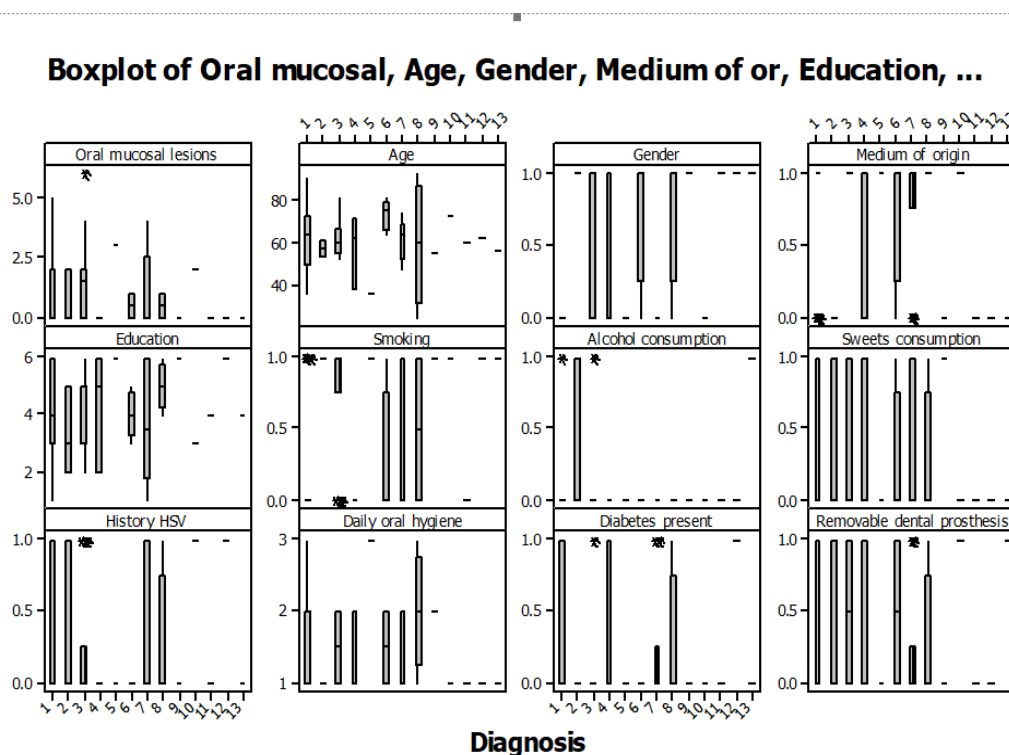


Figura 4. Corelația dintre diagnostic și caracteristicile grupului

Concluziile acestui studiu au confirmat incidența mucozitei orale în rândul pacienților români cu cancer și ar contribui la creșterea numărului de dovezi care evaluează importanța respectării protocolului de igienă orală în timpul chimioterapiei la pacienți cu diferite forme de cancer, altele decât cancerul capului și gâtului. Dovezile în creștere sugerează că modificările microbiomului oral apar dincolo de infecția oportunistă, cu o apreciere tot mai mare pentru rolul potențial al microbiomului în dezvoltarea și severitatea reacțiilor adverse orale după tratamentul cu chimioterapie.

Astfel, **ultima cercetare (Capitolul 6)** din teza de doctorat reprezintă un studiu pilot care a reușit să identifice și să analizeze speciile microbiene relevante din cavitatea bucală înainte și în timpul tratamentului cu chimioterapie prin tehnici metagenomice din mostre de ADN salivar folosind tehnologia Oxford Nanopore cu dispozitivul MiniON. Studiul a fost realizat în conformitate cu Declarația de la Helsinki și a obținut aprobarea Comisiei de Etică a Universității de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara (76/16.11.2021 rev 26.05.2023). Toți pacienții și-au dat consimțământul informat și scris cu privire la prelevarea de probe, terapia și investigațiile efectuate.

Grupul de studiu inițial a constatat din 28 de pacienți consecutiv diagnosticării cu cancer (cu excepția cancerului capului și gâtului) și admiși pentru chimioterapie. Din

cauza calității sau cantității insuficiente de probe de salivă, doar 22 de pacienți au fost incluși în analiza finală.

Studiul pilot longitudinal prospectiv a cuprins 22 de pacienți cu neoplasme solide, și anume 8 pacienți cu cancer de sân, 5 pacienți cu cancer pulmonar, 2 pacienți cu melanom, 2 pacienți cu cancer de col uterin, câte un pacient cu cancer gastric, colecistic și liposarcom.

Probele orale de la participanți au fost dublu colectate: înainte și după 3 luni de la începerea ciclului 3 de tratament.

Probele de salivă nestimulate au fost colectate fiecărui pacient. Saliva va fi colectată conform metodei scuipării.

Probele de salivă au fost colectate cu ajutorul kitului de colectare SafeCollect Saliva pentru ADN/ARN Shield (ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit) înainte de inițierea tratamentului și după 3 luni. Toate probele au fost stocate la -20°C , până la utilizarea ulterioară.

Rezultate

Pentru investigarea beta-diversității, am făcut analiza principală a componentelor (PCoA) pentru a explora diferențele în comunitățile microbiene dintre pacienți înainte și după tratament, ca și distanțele Bray-Curtis și Jaccard (Figurile 5-8).

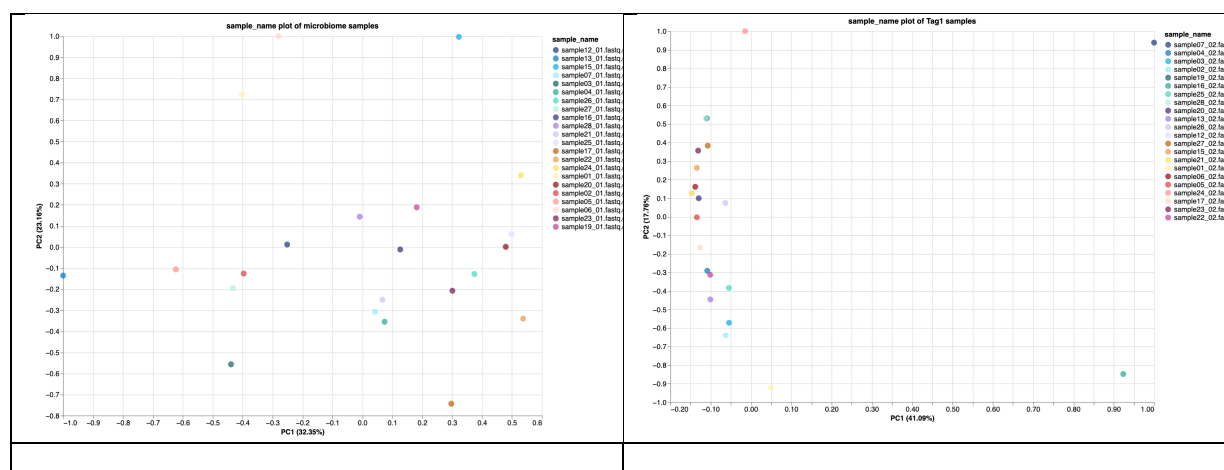


Figura 5. Analiza Diversității Beta: Complot PCoA Bazat pe Distanța Bray-Curtis la Nivelul Genului

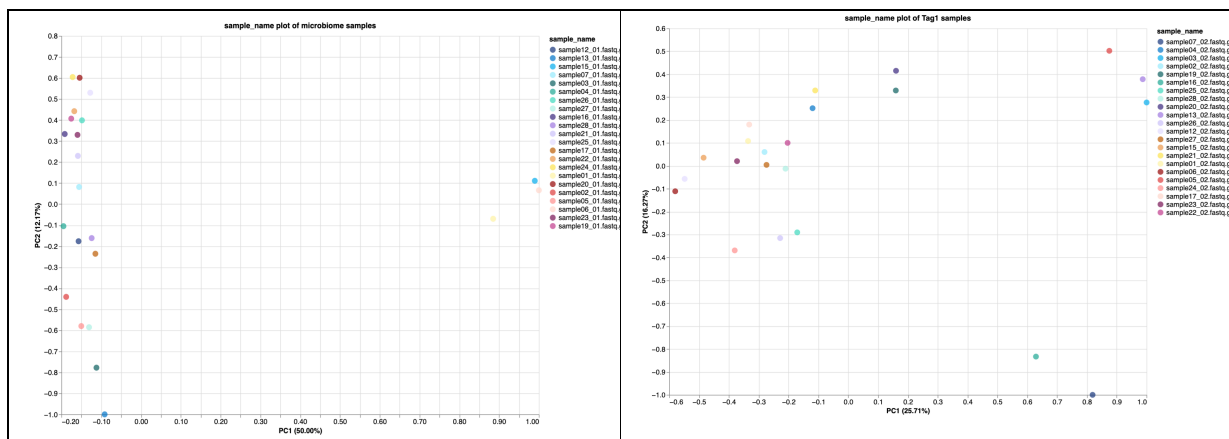


Figura 6. Beta Analiza diversității: PCot Bazat pe Distanța Bray-Curtis la Nivelul Speciilor

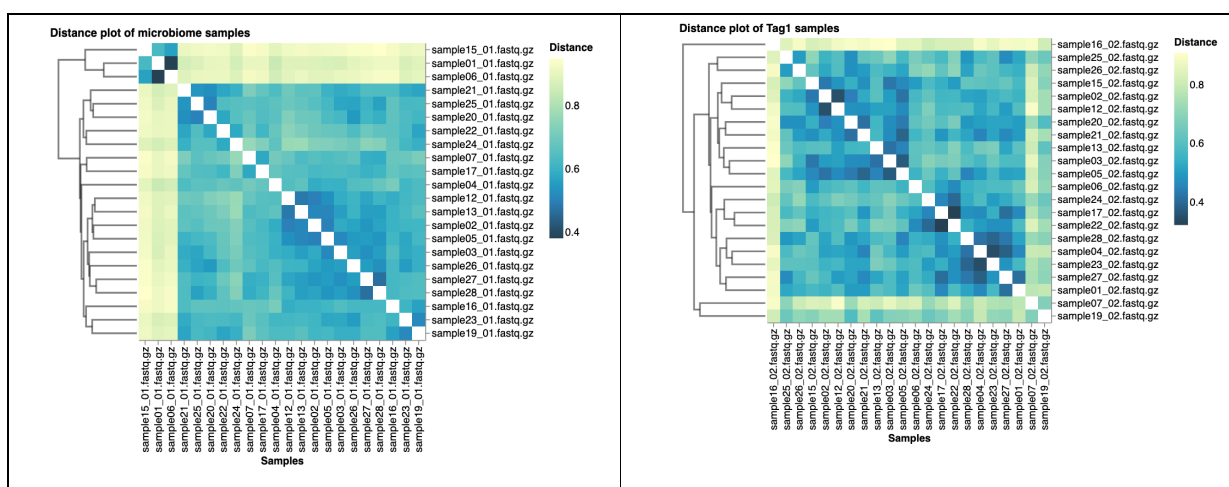


Figura 7. Analiza Diversității Beta: Distanța de Jaccard Bazată pe PCot la Nivelul Genului

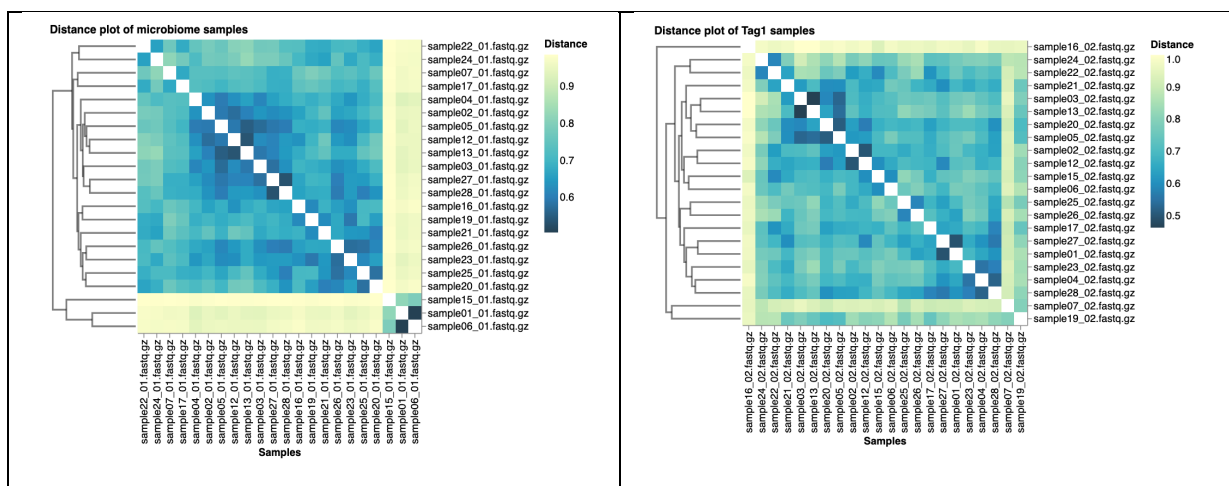


Figura 8. Analiza Diversității Beta: Distanța Bazată pe PCot la Nivelul Speciilor

După stratificarea pacientului, grupul tratat cu chimioterapie a avut încrengătura cu cele mai multe citiri de Firmicutes, urmată de Proteobacterii. Același model este păstrat înainte și după tratament. La nivel de gen, Streptococcus a fost cel mai frecvent taxon din toate grupurile. Înainte de tratament, Neisseria, Veillonella și Lactobacillus se

găesc în cantități mari; cu toate acestea, după tratament, cele mai abundente taxoni au fost Streptococcus, Granulicatella, Gemella, Burkholderia (Figurile 9-11).

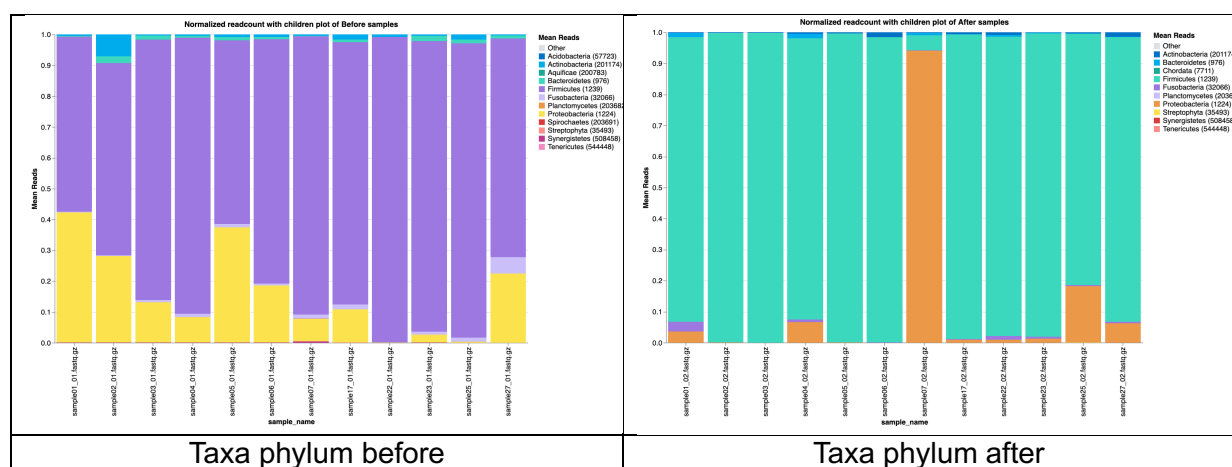


Figura 9. Distribuția Taxanomică la Nivelul de Încrângătură

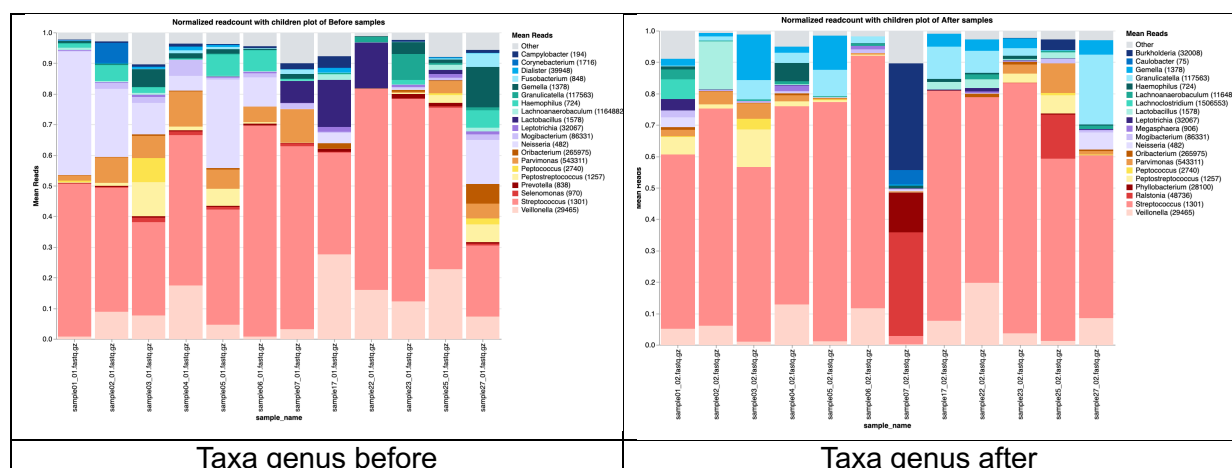


Figura 10. Distribuția Taxanomică la Nivelul Genului

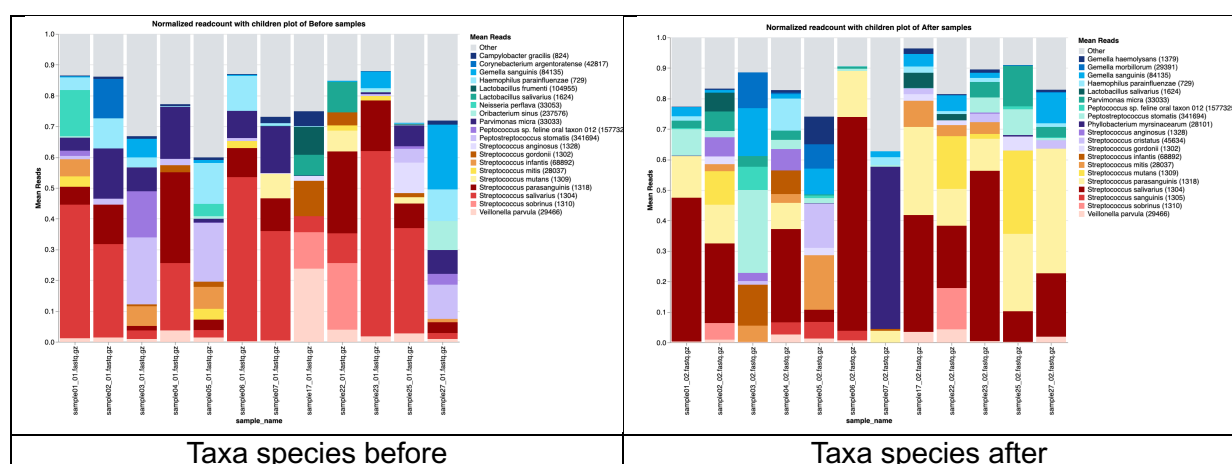


Figura 11. Distribuția taxonomică la Nivelul Speciilor

În ceea ce privește diversitatea alfa, există diferențe semnificative statistic între cele 2 grupuri. Indicii de diversitate au fost semnificativ mai mici pentru toți pacienții

după tratament. La nivel de specie, indicele Shannon ($P=0.041$), precum și indicele Simpson ($P=0.025$) au fost semnificativ mai mici în cazul pacienților după 3 luni de tratament comparativ cu starea inițială. Aceleași rezultate au fost obținute și la nivel de specie ($p=0.001$ Shannon și $p=0.007$ Simpson) (Figura 12, 13).

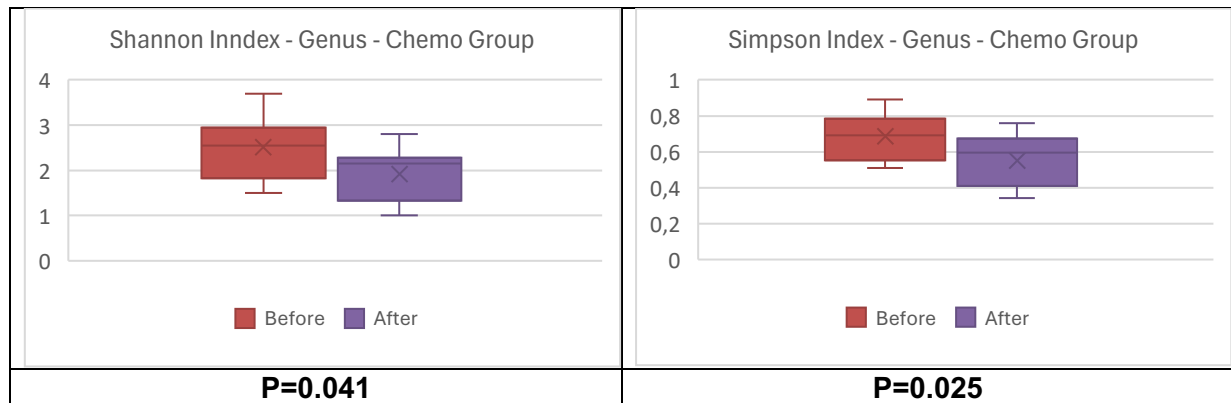


Figura 12. Analiza Diversității Alpha la Nivelul Genului

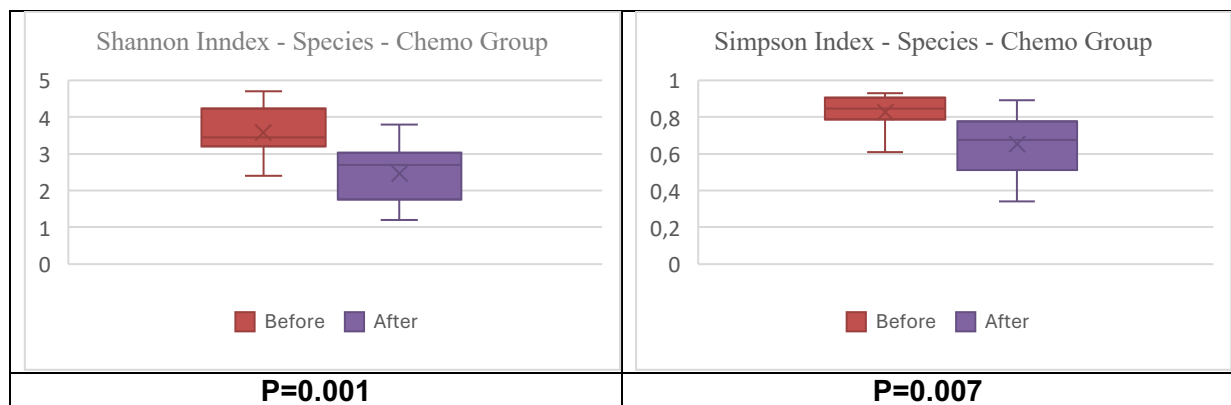


Figura 13. Diversitatea alfa la nivelul Speciilor

La pacienții tratați cu imunoterapie combinată cu chimioterapie, numai 3 probe au avut taxoni abundenți mari, eșantionul 12 cu *Streptococcus parasanguinis*, care a fost prezent numai înainte de tratament, după tratament a devenit abundent mediu. În eșantionul 15 și 24 *Streptococcus salivarius* a avut o abundență mare, care a fost păstrată numai în cazul eșantionului 15.

După începerea chimioterapiei, 11/22 pacienți au dezvoltat mucozită ulcerativă orală de gradul 1 și 2. Leziunile mucoasei au fost, de asemenea, clasificate în conformitate cu clasificarea OMS. (1-durere orală, eritem; 2- eritem, ulcere, pacientul poate înghiți alimente solide; 3- ulcere cu eritem extins pacientul nu poate înghiți alimente; 4- mucozită în măsura în care alimentația nu este posibilă). Nu a fost practicat niciun protocol de îngrijire orală, iar clasificarea mucozitei a fost efectuată de un medic dentist care a participat la studiu.

A doua recoltare de probe de salivă a fost efectuată între săptămânile 11 și 12, în timpul căreia microbiota orală caracteristică a fost identificată la 5 din 11 pacienți.

Acest lucru sugerează un potențial dezechilibru al microbiotei orale, speciile oportuniste patogene putând contribui la apariția și exacerbară mucozitei orale (Tabelul 5).

Tabel 5. Bacterial Abundance in the Second Saliva Sample of Patients with Oral Mucositis

Medium abundance	Low abundance
Streptococcus salivarius, Streptococcus <u>parasanguinis</u>	<u>Peptostreptococcus stomatis</u> <u>Gemella sanguinis</u> <u>Lachnoanaerobaculum orale</u> <u>Parvimonas micra</u> <u>Stomatobaculum longum</u>
Streptococcus salivarius <u>Streptococcus parasanguinis</u> Streptococcus mutans	<u>Parvimonas micra</u> <u>Streptococcus anginosus</u> <u>Lactobacillus salivarius</u> <u>Streptococcus sobrinus</u> <u>Lactobacillus vaginalis</u> <u>Lactobacillus gasseri</u> <u>Streptococcus gordonii</u> <u>Lactobacillus crispatus</u> <u>Streptococcus mitis</u> <u>Peptostreptococcus stomatis</u> <u>Lactobacillus acidophilus</u>
Streptococcus salivarius <u>Streptococcus parasanguinis</u>	<u>Streptococcus mitis</u> <u>Lactobacillus salivarius</u> <u>Gemella sanguinis</u> <u>Veillonella parvula</u>
Streptococcus salivarius	<u>Granulicatella elegans</u> <u>Streptococcus parasanguinis</u> <u>Streptococcus mitis</u> <u>Parvimonas micra</u> <u>Peptostreptococcus stomatis</u> <u>Gemella haemolysans</u> <u>Streptococcus sanguinis</u> <u>Streptococcus gordonii</u> <u>Streptococcus cristatus</u>
Streptococcus salivarius	<u>Streptococcus parasanguinis</u> <u>Gemella sanguinis</u> <u>Streptococcus cristatus</u> <u>Streptococcus gordonii</u> <u>Veillonella parvula</u> <u>Streptococcus mitis</u> <u>Abiotrophia defectiva</u> <u>Streptococcus infantis</u>

Concluzii

Acest studiu pilot a relevat modificări semnificative în microbiota orală a pacienților cu cancer supuși chimioterapiei sau chimio-imunoterapiei combinate. O reducere semnificativă a diversității microbiene după tratament evidențiază impactul acestor terapii asupra microbiomului oral și rolul său în complicații cum ar fi mucozita

orală. Înțelegerea acestor schimbări deschide căi pentru dezvoltarea intervențiilor orientate spre microbiom pentru a atenua efectele secundare legate de tratament.

CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Sănătatea orală joacă un rol critic în calitatea vieții pacienților oncologici. Terapia oncologică, prin efectele sale adverse sistemice și locale, poate compromite în mod semnificativ cavitatea bucală, ducând la complicații cum ar fi mucozita, infecțiile și disfuncțiile dentare.
2. S-a demonstrat că respectarea unui protocol riguros de igienă orală în timpul chimioterapiei atenuează severitatea mucozitei orale și a altor complicații asociate.
3. Chimioterapia și imunoterapia induc disbioza microbiotei orale, promovând proliferarea bacteriilor patogene și crescând riscul de infecții. Analiza metagenomică (Oxford Nanopore) a microbiotei salivare a evidențiat modificări semnificative ale diversității bacteriene în timpul tratamentului.
4. În ciuda educației precare a pacienților români cu diverse forme de neoplasme sub tratament, asupra rolului cheie al igienei orale și al îngrijirii dentare, aceste aspecte sunt deosebit de importante în orice tip de terapie de succes.
5. Rezultatele au indicat că mucozita orală a afectat 43,75% pacienți, evidențiind o incidență ridicată a acestei complicații în cazurile de tumori solide non-cefalice.
6. Un indice de igienă dentară inițial mai mare și neaderența la protocolul de igienă orală au fost semnificativ asociate cu o progresie mai mare a scorurilor, indicând o corelație cu incidența și progresia mucozitei orale.
7. În viitor, rolul abordărilor preventive și interdisciplinare este esențial pentru reducerea sarcinii complicațiilor orale asociate chimioterapiei. Trebuie subliniată de asemenea, necesitatea de a încorpora tehnologii avansate și protocoale standardizate de igienă orală în managementul tratamentului oncologic. Aceste constatări reprezintă contribuții semnificative la îngrijirea dentară pentru pacienții oncologici, prezentând noi strategii ale îmbunătățirii rezultatelor tratamentului și a calității vieții pentru pacienți.

**“VICTOR BABEȘ” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
FROM TIMIȘOARA
FACULTY OF DENTAL MEDICINE
DEPARTMENT I**

COCHENȚIU ADRIANA



PhD THESIS

**PROTECTIVE FACTORS AND MANAGEMENT OF ORO-
DENTAL COMPLICATIONS FOLLOWING CHEMOTHERAPY
IN ADULT PATIENTS WITH SOLID NEOPLASMS**

– A B S T R A C T –

Scientific Coordinator:

PROF. UNIV. DR. LAURA-CRISTINA RUSU

**T i m i ș o a r a
2 0 2 4**

INTRODUCTION

Cancer has a major impact on society worldwide. Statistics tell us that by 2040, the number of new cancer cases per year will increase to 29.9 million and the number of deaths caused by cancer to 15.3 million [1]. In the last decades, we can see the progress in cancer therapy evident by changing mortality rates as well as by focusing on the patient's quality of life [2]. Patients following anti-cancer therapies have a multitude of side effects that affect their quality of life to a greater or lesser extent.

Oral health status plays an essential role in the overall quality of life of a person. Oral health status happens to be seriously affected by the side effects of anti-cancer therapies such as surgery, chemotherapy, radiotherapy and stem cell transplantation [3]. The oral cavity is very sensitive to the toxic effects of chemotherapy and ionizing radiation, that have an action upon the poorly differentiated cells or cells with a high mitotic rate, therefore the oral mucosa, which represents one of the body's defenses against microbial invasion, is compromised. Tissue modifications can range from being completely harmless to severe changes that can cause pain and bleeding and can even lead to discontinuation of cancer treatment.

The inflammatory response of the epithelial mucosa to the cytotoxic effects of chemotherapy and radiotherapy leads to mucositis, the most encountered and painful side effect of antineoplastic treatments [4]. Oral mucositis lesions tend to be extremely painful, affect nutrition and oral hygiene, and increase the risk of local and systemic infection. Epidemiological studies have shown that a part of the patients receiving chemotherapy for solid tumors will experience oral complications.

Given the advances in other areas of supportive care for chemotherapy patients, a new opening is being created for oral-dental management where interdisciplinary collaboration and a patient-centered approach are fundamental to the oncology pathway.

The aim of this study was to investigate the incidence of oro-dental complications during chemotherapy in adult patients with different forms of solid malignant tumor, other than cervico-facial, with the aim of evaluating the need to adhere to an oral hygiene protocol during treatment and identifying potential determining factors with impact on this pathology. The first part of the thesis consists of three main chapters that include the current existing information related to the incidence, prevention, epidemiology, risk factors and current management of dental complications following chemotherapy in adult patients. The special part of the thesis is based on three main

independent studies that complement the topics discussed in the general part revealing personal contribution.

The first study was a retrospective research that aimed to evaluate the level of knowledge among the patients regarding the importance of oral hygiene and optimal dental condition in order to minimize the occurrence of adverse effects during chemotherapy treatment in an oncology clinic in Romania.

This clinical prospective, longitudinal study carried out an initial study group consisted of 71 consecutive patients diagnosed with cancer (other than head and neck cancer) and admitted for chemotherapy at Oncocenter, a private oncology clinic in the Western part of Romania, between 1 November 2022 and 30 June 2023. The follow-up period was six months.

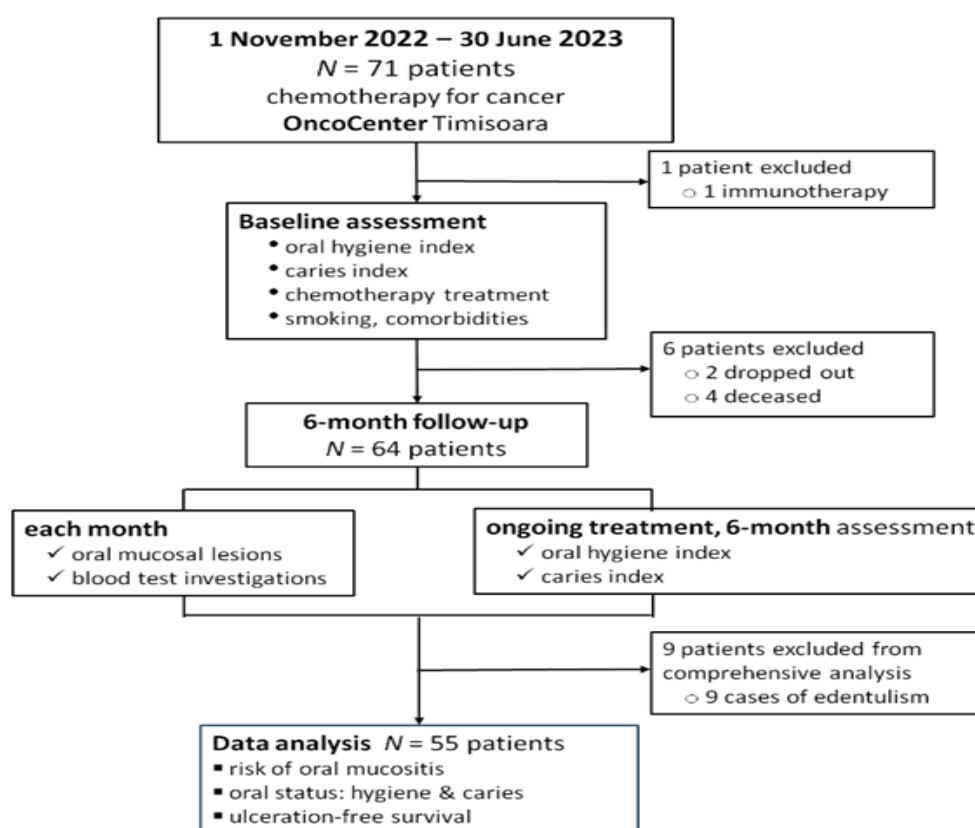


Figure1. Study flowchart

The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of “Victor Babes” University of Medicine and Pharmacy in Timisoara, Romania Approval (Nr. 76/16.11.2021 rev 26.05.2023). All participants in the study gave their written informed consent.

Results

Table 1. Laboratory test results during the six-month follow-up (N = 64 patients in total)

	Blood test			
	Hemoglobin ^(a)	Leukocytes ^(a)	Thrombocytes ^(a)	NLR ^(a)
Month 1	13.10 ± 1.32	6926.41 ± 2510.28	284973.44 ± 92719.45	2.72 ± 1.86
Month 2	12.52 ± 1.48	6614.49 ± 3792.06	288952.38 ± 90300.11	3.17 ± 2.29
Month 3	12.33 ± 1.50	6629.37 ± 3078.35	278442.67 ± 113581.23	2.91 ± 1.82
Month 4	11.86 ± 1.55	5886.38 ± 3016.51	255515.63 ± 96240.60	2.72 ± 1.66
Month 5	11.57 ± 1.55	5850.30 ± 3835.29	248343.75 ± 95526.65	2.95 ± 1.89
Month 6	11.44 ± 1.43	5881.72 ± 2539.56	244873.44 ± 102850.65	2.92 ± 1.77

^(a) mean ± standard deviation

Abbreviation: NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio

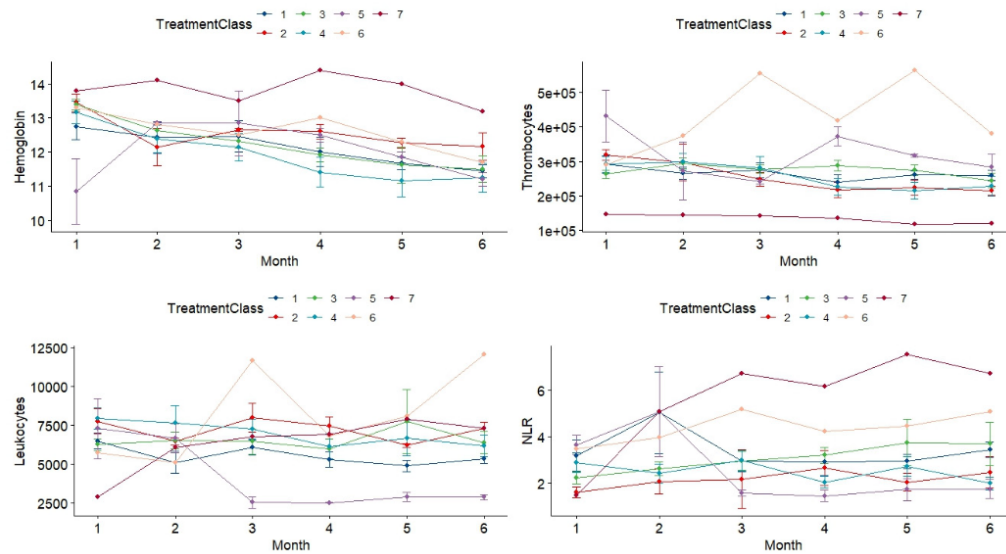


Figure 2. Results of monthly laboratory tests during chemotherapy treatment

Table 2. Assessment of baseline characteristics and six-month changes

Variable	All patients N = 55	Complied with oral hygiene protocol		p-value ^{(a),(b)}
		Yes (N = 33)	No (N=22)	
Baseline hygiene index ^(a)	0.97 ± 0.81	0.60 ± 0.43	1.53 ± 0.93	< 0.001**
6-month hygiene index ^(a)	1.10 ± 0.88	0.69 ± 0.48	1.72 ± 0.98	< 0.001**
Change in hygiene index ^(a)	0.13 ± 0.12	0.09 ± 0.07	0.12 ± 0.15	0.003**
Baseline DFMT index ^(a)	18.65 ± 7.67	15.33 ± 6.33	23.64 ± 6.86	< 0.001**
6-month DFMT index ^(a)	19.15 ± 7.50	15.94 ± 6.14	23.95 ± 6.85	< 0.001**
Change in DFMT index ^(a)	0.49 ± 0.81	0.61 ± 0.93	0.32 ± 0.57	0.340
Mucositis grade 2 or more ^(b)	25 (45.5%)	11 (33.3%)	14 (63.5%)	0.027*

^(a) mean ± standard deviation; non-normal distribution; Mann-Whitney U test

^(b) observed frequency (percentage); asymptotic chi-square test

Statistical significance: *, p < 0.05; **, p < 0.001

Table 3. Cox regression analysis of ulceration-free survival during the first 6 months of chemotherapeutic patients with cancer (other than head and neck cancer), with adherence to the hygiene protocol as an independent predictor.

Cox proportional-hazards model: first ulceration month – compliance with hygiene protocol			
Controlling for: age, sex, baseline hygiene index, class of treatment			
Predictor	B ± Std. Err	p-value	HR (95% CI)
Compliance with hygiene protocol	-1.874 ± 0.584	0.00134**	0.154 (0.049 – 0.483)

Abbreviations: B ± Std. err, coefficient of regression ± standard error; CI, confidence interval; HR, hazard ratio

Statistical significance: ** p < 0.01

By analyzing the results and comparing them to those existing in the specialized literature, it appears that the services are mainly focused on the treatment while the benefits of prevention are often overlooked.

Our six-month longitudinal study confirmed the incidence of oral mucositis in Romanian cancer patients and would contribute to the growing body of evidence appraising the importance of adherence to oral hygiene protocol during chemotherapy in patients with various forms of cancer other than head and neck cancer. Our analysis confirmed the oral hygiene protocol as an independent protective factor and also substantiated the increased risk of oral ulceration due to non-adherence to strict oral hygiene recommendations by more than six times in patients of the same age, sex, baseline hygiene index, and treatment class. Cancer patients have the agency to control their oral health along the difficult path of chemotherapy, regardless of their age, previous oral hygiene practices, or particular treatment.

The second research study was a six-month longitudinal study between September 2021 and May 2023, an observational, retrospective study, analyzing records from an oncology clinic in Western Romania for patients diagnosed with solid tumors and treated with chemotherapy regimens. Diagnostic data were obtained from medical records provided by the oncology clinic, while patients contributed self-reported data through a questionnaire covering demographic details, the incidence of dental complications as adverse effects of cytostatic treatment, as well as their habits, attitudes, and knowledge related to these complications and oral health. The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy, “Victor Babes”, Timisoara, Romania (Approval Number Nr. 76/16.11.2021 rev 26.05.2023).

The patients were 22 males and 49 females, aged between 25 and 90 years (Table 4).

All patients were asked to answer a self-administered questionnaire that included information about the oral complications that occurred during the chemotherapy treatment and the degree of knowledge and application of prevention methods for oral health. In the first part of the questionnaire, data were collected about age, sex, place of origin, education level, body mass index, consumption of alcohol and sweets, the presence of a removable prosthesis and the frequency of dental hygiene.

Table 4. Sociodemographic and habits profile of the adult cancer patients

Variables	N	%
<i>Gender</i>		
male	22	30.9%
female	49	69.0%
<i>Age (in years)</i>		
25-50	12	16.9%
50-90	59	83.0%
<i>Education</i>		
eight classes	7	9.85%
ten classes	6	8.45%
twelve classes	11	15.4%
vocational school	10	14.0%
high school	18	25.3%
university	19	26.7%
<i>Body mass index</i>		
normal (18.5-24.9)	26	36.6%
high	44	61.9%
low	1	1.4%
<i>Alcohol consumption</i>		
yes	5	7.04%
no	66	92.9%
<i>Smoking (years)</i>		
0	40	56.3%
5-20	16	22.5%
25-40	14	19.7%
40-90	1	1.4%
<i>Sweets consumption</i>		
yes	22	30.9%
no	49	69.0%
<i>Origin</i>		
country	15	21.1%
city	56	78.8%
<i>Oral hygiene (frequency/day)</i>		
once	34	47.8%
two	31	43.6%
three	6	8.4%
<i>Prosthesis mobile</i>		
yes	27	38.0%
no	44	61.9%

The information related to the diagnosis and location of the cancer was extracted from the medical records of each patient. The content of the questionnaire was validated through two steps. In the content validation process, the medical staff of the oncology clinic where the data for the study were collected were asked to evaluate the content and offer suggestions for changes if they had any.

Results

In this study, 71 patients with age between 25-92 years were evaluated, 49 were women (69,0%) and 22 men (30,9 %). Among the participants, the proportion of breast

cancer was 38.0%, lung cancer 19.7%, genital tract cancer 14.08% and 27.5% other types of neoplasms. Regarding the level of education, 26.7% have completed a university, 25.3% have completed high school, 14.0% have attended a vocational school, 15.4% have completed 12 classes, 8.45% have finished 10 classes and 9.85% finished 8 classes. Around 43.6% of patients consumed tobacco, while 7.04% consumed alcohol and 30.9% consumed sweets regularly at the time of diagnosis (Figure 3).

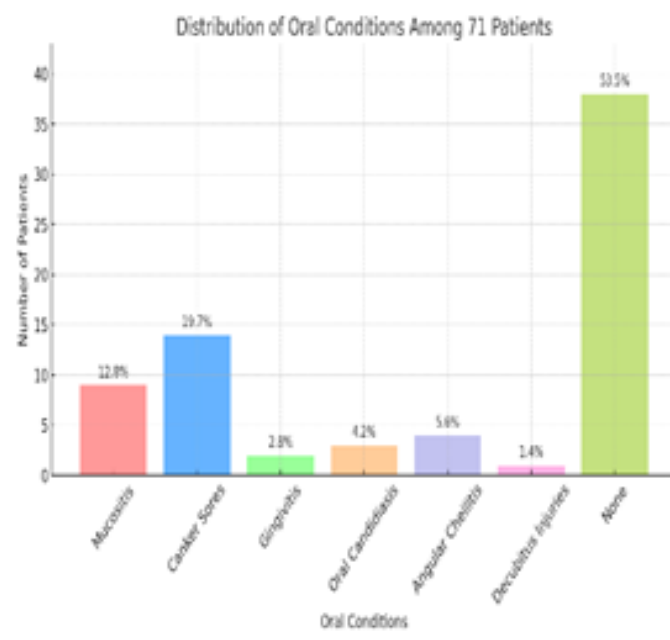


Figure 3. Oral mucosal complications

The results indicate that most individuals across all diagnostic categories abstain from alcohol, suggesting no significant correlation between alcohol consumption and the diagnoses. Regarding sweet consumption, varying patterns were observed, with some diagnostic groups showing both consumers ($y=1$) and non-consumers ($y=0$). Additionally, smoking habits differed across diagnoses, with certain groups having higher rates of smoking, while others were predominantly non-smokers; notably, the last two diagnoses consisted exclusively of smokers, with no non-smokers present (Figure 4).

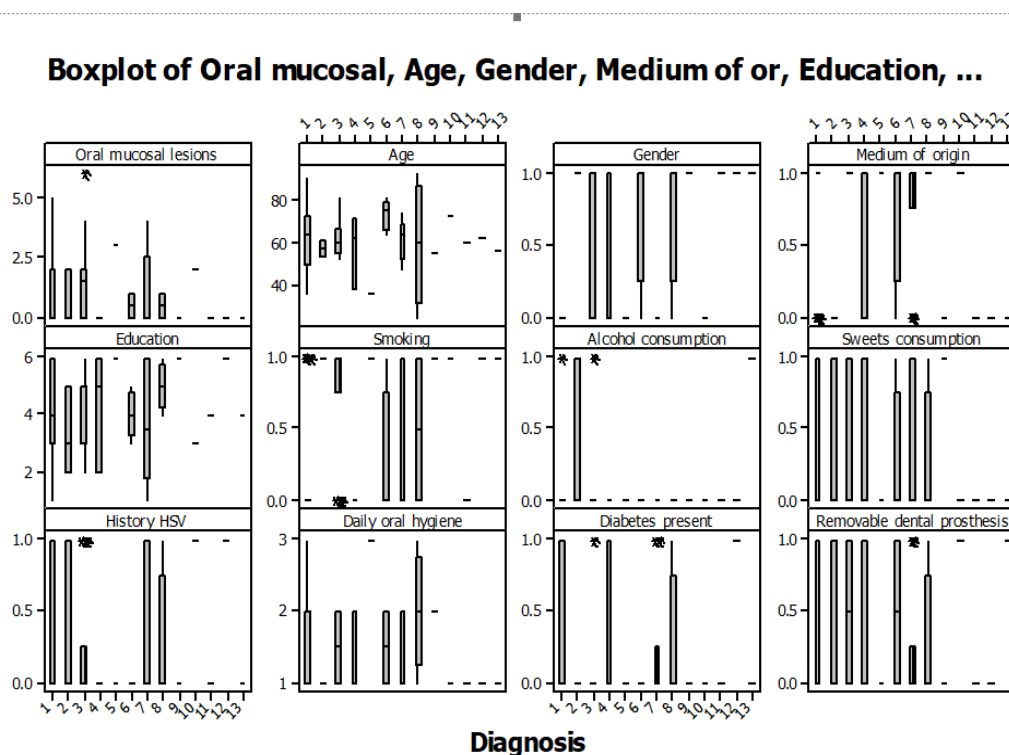


Figure 4. Correlations between diagnosis and group characteristics

Conclusions of this study confirmed the incidence of oral mucositis in Romanian cancer patients and would contribute to the growing body of evidence appraising the importance of adherence to oral hygiene protocol during chemotherapy in patients with various forms of cancers, other than head and neck cancer. Growing evidence suggests that changes in the oral microbiome occur beyond opportunistic infection, with a growing appreciation for the potential role of the microbiome in the development and severity of oral side effects following chemotherapy treatment.

Thus, ***the last research (Chapter 6)*** in the doctoral thesis represents a pilot study that managed to identify and analyze relevant microbial species in the oral cavity before and during chemotherapy treatment through metagenomics techniques from salivary DNA samples using Oxford Nanopore technology with the MinION device.

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki and obtained the approval of the Ethics Committee of Victor Babes University of Medicine and Pharmacy, Timisoara (76/16.11.2021 rev 26.05.2023). All patients provided informed, written consent regarding the sampling, therapy, and investigations performed.

The initial study group consisted of 28 consecutive patients diagnosed with cancer (excluding head and neck cancer) and admitted for chemotherapy. Due to insufficient quality or quantity of saliva samples, only 22 patients were included in the final analysis.

The prospective, longitudinal pilot study involved 22 patients with solid neoplasms, namely, 8 patients with breast cancer, 5 patients with lung cancer, 2 patients with melanoma, 2 patients with cervical cancer, one patient each with gastric cancer, cholecystic and liposarcoma.

Oral samples from the participants were collected twice: before and after 3 months of starting when they completed the 3rd cycle of treatment.

Unstimulated saliva samples were collected from each patient. Saliva will be collected according to the spit method (Navazesh,1993; Bosch et al., 1996).

Saliva samples were collected in a DNA/RNA Shield SafeCollect Saliva Collection Kit (ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit) before treatment initiation and after 3 months. All samples were stored anonymized at -20 C, until further use.

Results

For investigating beta-diversity, we made principal component analysis (PCoA) to explore dissimilarities in the microbial communities between the patients before and after treatment, as also Bray-Curtis and Jaccard distances (*Figure 5-8*).

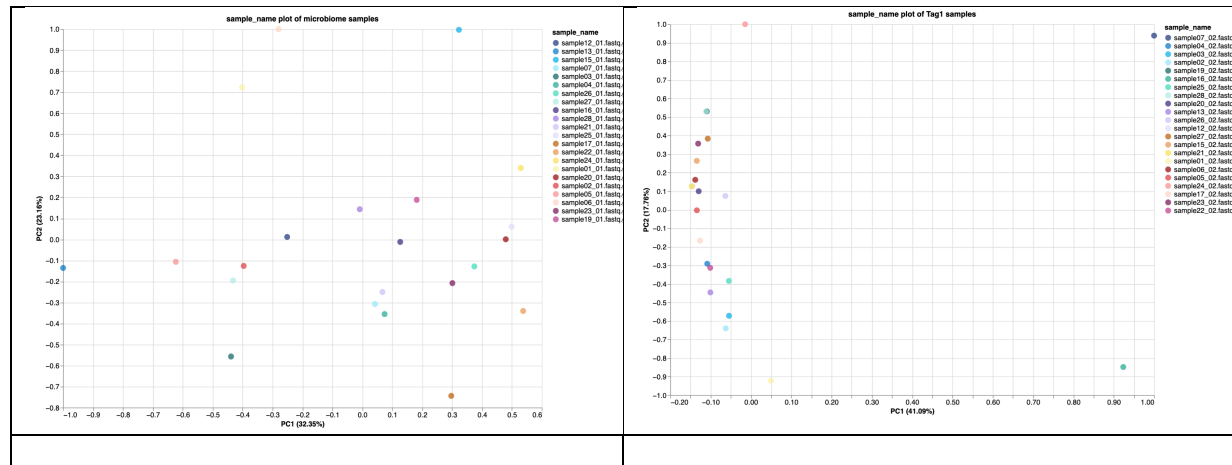


Figure 5. Beta Diversity Analysis: PCoA Plot Based on Bray-Curtis Distance at the Genus Level

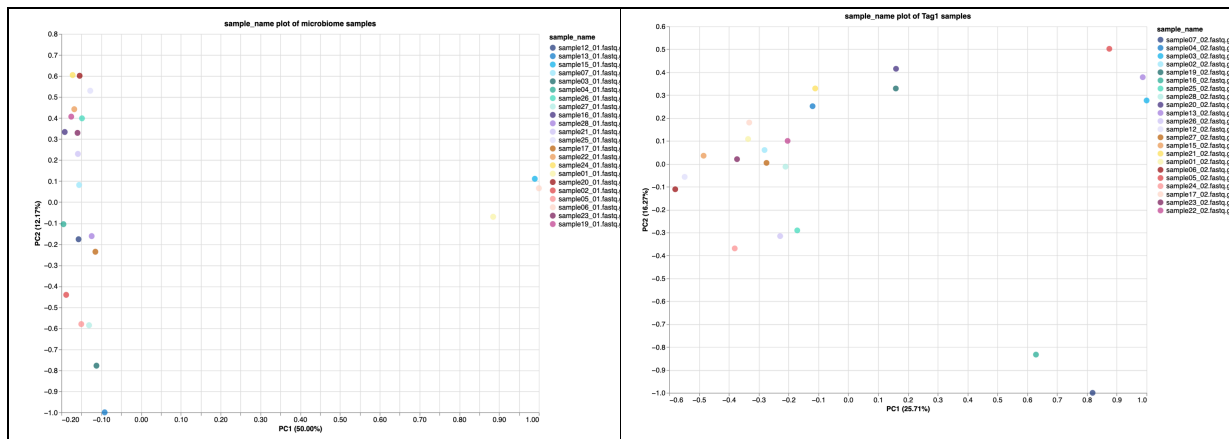


Figure 6. Beta Diversity Analysis: PCot Based on Bray-Curtis Distance at the Species Level

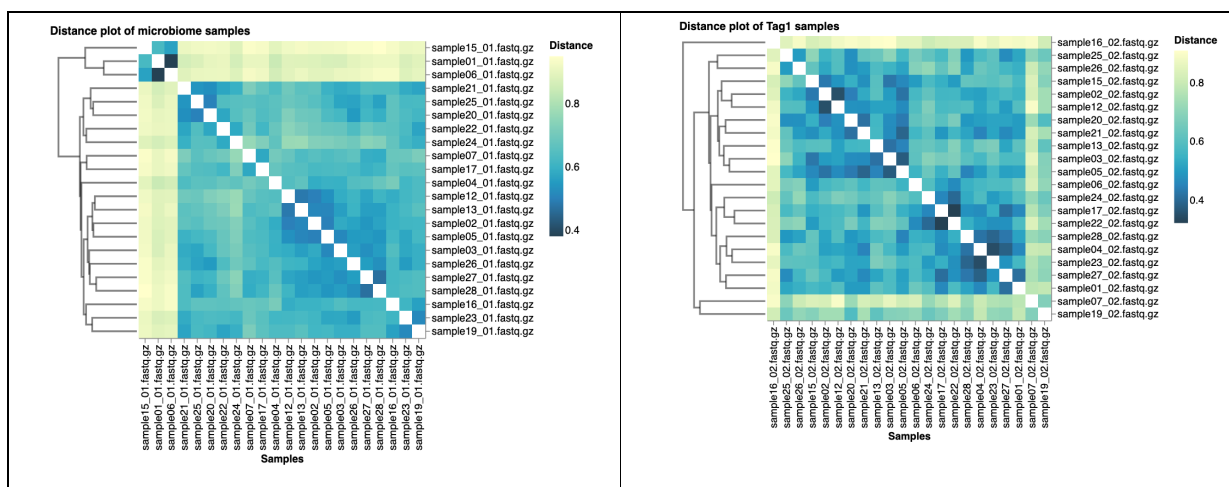


Figure 7. Beta Diversity Analysis : PCot Based Jaccard Distance at the Genus Level

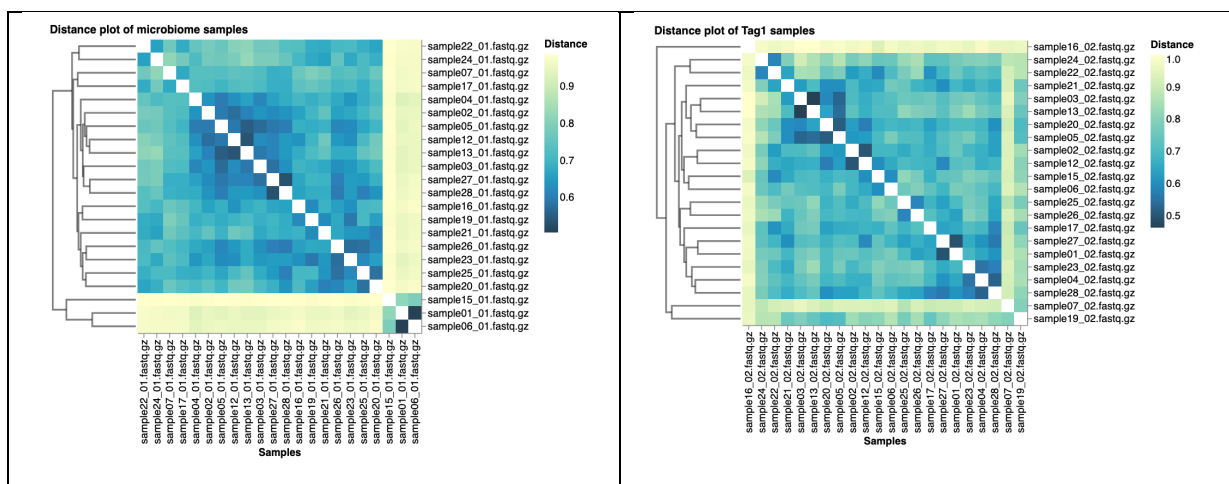


Figure 8. Beta Diversity Analysis: PCot Based Distance at the Species Level

After patient stratification, the group treated with chemotherapy had the phylum with the most reads of Firmicutes, followed by Proteobacteria. The same pattern is kept before and after treatment. At the genus level, Streptococcus was the most common taxon in all groups. Before treatment, Neisseria, Veionella and Lactobacillus are found

in high abundances; however, after treatment, the most abundant taxa were *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Burkholderia* (Figure 9-11).

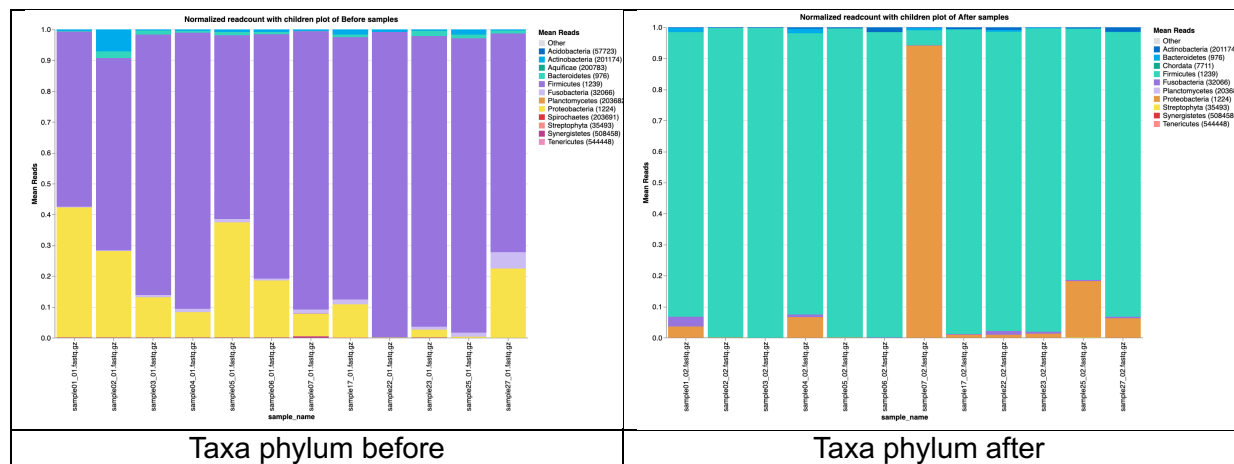


Figure 9. Taxonomic Distribution at the Phylum Level

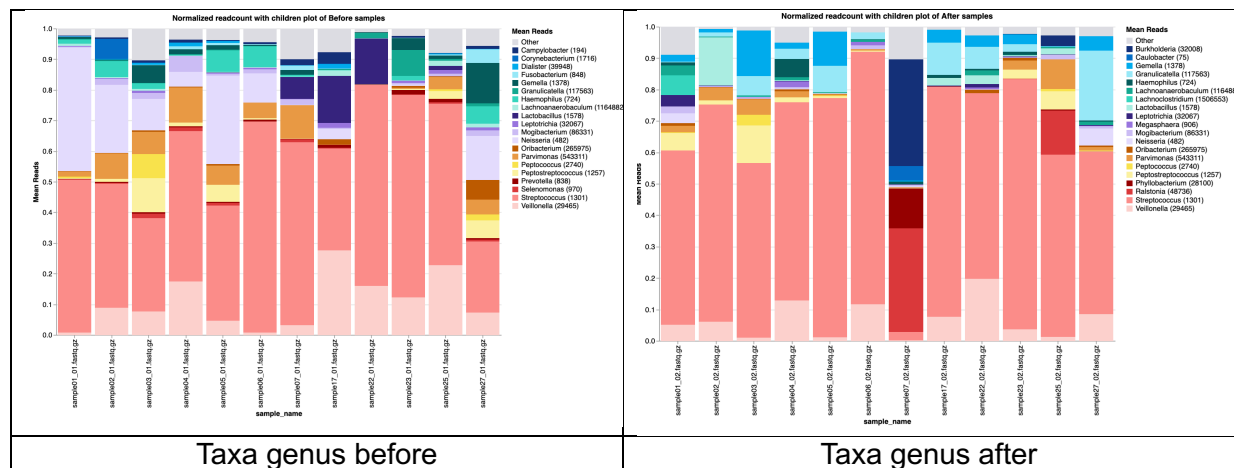


Figure 10. Taxonomic Distribution at the Genus Level

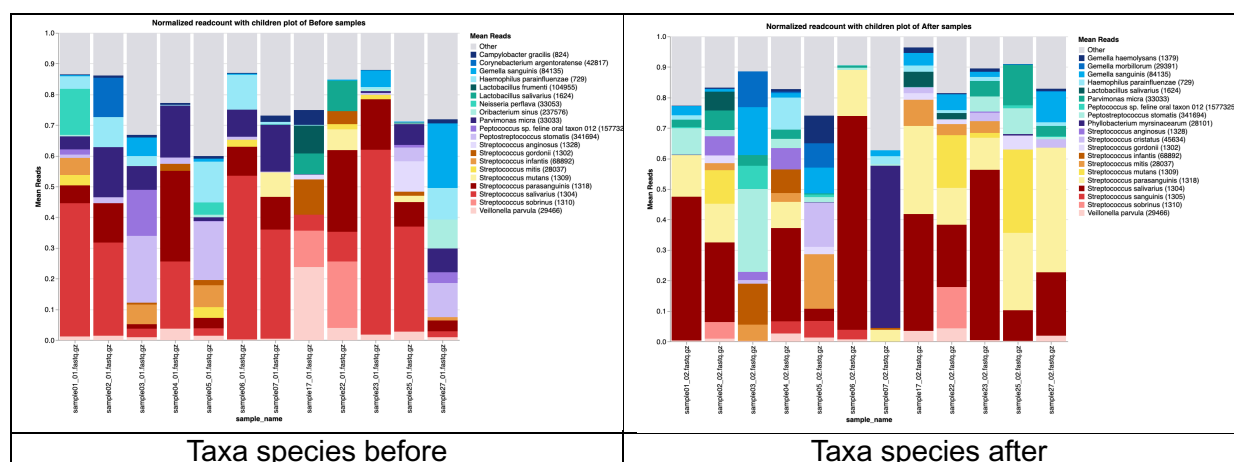


Figure 11. Taxonomic Distribution at the Species Level

In terms of alpha diversity, there are statistically significant differences between the 2 groups. The α -diversity indexes were significantly lower for all patients after

treatment. At the species level, Shannon index ($P=0.041$), as well as Simpson index ($P=0.025$) were significantly lower in the case of the patients after 3 months of treatment compared to the initial status. Same results were obtained also at the species level ($p=0.001$ Shannon and $p=0.007$ Simpson) (Figure 12, 13).

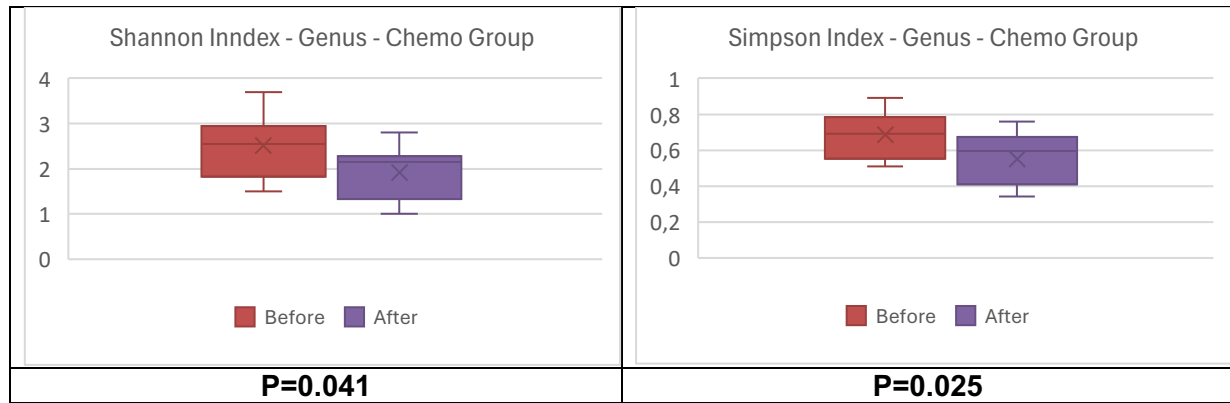


Figure 12. Alpha Diversity Analysis at the Genus Level

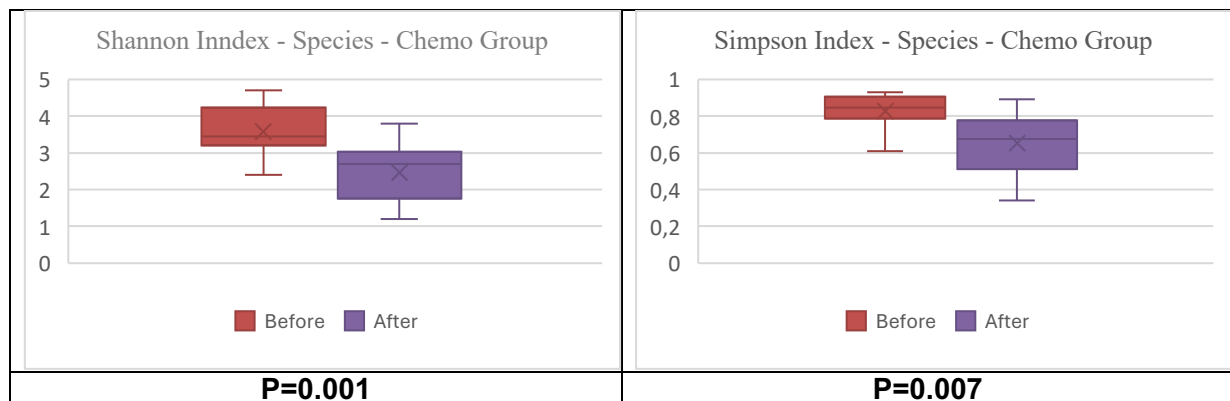


Figure 13. Alpha diversity at the Species Level

In patients treated with immunotherapy combined with chemotherapy, only 3 samples had high abundant taxa, sample 12 with *Streptococcus parasanguinis* which was present only before treatment, after treatment it became medium abundant. In sample 15 and 24 *Streptococcus salivarius* had a high abundance, which was kept only in the case of sample 15.

After the start of chemotherapy, 11/22 patients developed ulcerative oral mucositis grade 1 and 2 oral. The mucosal lesions were also classified according to the WHO classification. (1- oral soreness, erythema; 2- erythema, ulcers, patient can swallow solid food; 3- ulcers with extensive erythema patient cannot swallow food; 4- mucositis to the extent that alimentation not possible). No oral care protocol was

practiced and the classification of mucositis was performed by a dentist participating in the study.

The second saliva sample collection was conducted between weeks 11 and 12, during which the characteristic oral microbiota was identified in 5 out of 11 patients.

This suggests a potential imbalance in the oral microbiota, with opportunistic pathogenic species potentially contributing to the onset and exacerbation of oral mucositis (*Table 5*).

Table 5. Bacterial Abundance in the Second Saliva Sample of Patients with Oral Mucositis

Medium abundance	Low abundance
Streptococcus salivarius, Streptococcus <u>parasanguinis</u>	<u>Peptostreptococcus stomatis</u> <u>Gemella sanguinis</u> <u>Lachnoanaerobaculum orale</u> <u>Parvimonas micra</u> <u>Stomatobaculum longum</u>
Streptococcus salivarius <u>Streptococcus parasanguinis</u> Streptococcus mutans	<u>Parvimonas micra</u> <u>Streptococcus anginosus</u> <u>Lactobacillus salivarius</u> <u>Streptococcus sobrinus</u> <u>Lactobacillus vaginalis</u> <u>Lactobacillus gasseri</u> <u>Streptococcus gordonii</u> <u>Lactobacillus crispatus</u> <u>Streptococcus mitis</u> <u>Peptostreptococcus stomatis</u> <u>Lactobacillus acidophilus</u>
Streptococcus salivarius <u>Streptococcus parasanguinis</u>	<u>Streptococcus mitis</u> <u>Lactobacillus salivarius</u> <u>Gemella sanguinis</u> <u>Veillonella parvula</u>
Streptococcus salivarius	<u>Granulicatella elegans</u> <u>Streptococcus parasanguinis</u> <u>Streptococcus mitis</u> <u>Parvimonas micra</u> <u>Peptostreptococcus stomatis</u> <u>Gemella haemolysans</u> <u>Streptococcus sanguinis</u> <u>Streptococcus gordonii</u> <u>Streptococcus cristatus</u>
Streptococcus salivarius	<u>Streptococcus parasanguinis</u> <u>Gemella sanguinis</u> <u>Streptococcus cristatus</u> <u>Streptococcus gordonii</u> <u>Veillonella parvula</u> <u>Streptococcus mitis</u> <u>Abiotrophia defectiva</u> <u>Streptococcus infantis</u>

Conclusions

This pilot study revealed significant changes in the oral microbiota of cancer patients undergoing chemotherapy or combined chemo-immunotherapy. A marked reduction in microbial diversity post-treatment highlights the impact of these therapies

on the oral microbiome and its role in complications such as oral mucositis. Understanding these shifts opens avenues for developing microbiome-targeted interventions to mitigate treatment-related side effects.

CONCLUSIONS AND FINAL CONSIDERATIONS

1. Oral health plays a critical role in the quality of life of oncology patients. Oncological therapy, through its systemic and local adverse effects, can significantly compromise the oral cavity, leading to complications such as mucositis, infections, and dental dysfunctions.
2. Adherence to a rigorous oral hygiene protocol during chemotherapy has been shown to mitigate the severity of oral mucositis and other associated complications.
3. Chemotherapy and immunotherapy induce dysbiosis of the oral microbiota, promoting the proliferation of pathogenic bacteria and increasing the risk of infections. Metagenomic analysis (Oxford Nanopore) of salivary microbiota has revealed significant alterations in bacterial diversity during treatment.
4. Despite the not very good education of Romanian patients with various forms of neoplasms under treatment, on the key role of oral hygiene and dental care, these aspects are particularly important in the any type of success therapy.
5. The results indicated that oral mucositis affected 43.75% of the study included patients, highlighting a high incidence of this complication in cases of non-cephalic solid tumors.
6. A higher baseline dental hygiene index and non-adherence to the oral hygiene protocol were significantly associated with a greater progression in scores, indicating a correlation with the incidence and progression of oral mucositis.
7. In the future, the role of preventive and interdisciplinary approaches is critical to reducing the burden of oral complications associated with chemotherapy. They also stress the need to incorporate advanced technologies and standardized oral hygiene protocols into oncology treatment frameworks. These findings represent significant contributions to dental care for oncology patients, presenting new strategies to improve treatment outcomes and quality of life for patients.