



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

JULIANA MARIA SOUZA DE OLIVEIRA

MANAUS

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

JULIANA MARIA SOUZA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientador (a): Profa. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura.

Co-orientadora: Profa. Dra. Juliana Vianna Pereira.

MANAUS

2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Juliana Maria Souza de
O48a Análise da microbiota bucal de pacientes com leucemia
linfoblástica aguda / Juliana Maria Souza de Oliveira. 2015
121 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Tatiana Nayara Libório Kimura
Coorientadora: Juliana Vianna Pereira
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Leucemia linfóide aguda. 2. Mucosite bucal. 3. Herpesvirus
humano tipo 1. 4. Herpesvirus humano tipo 2. 5. Reação em cadeia
polimerase. I. Kimura, Tatiana Nayara Libório II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Oliveira, J. M. S. Análise da microbiota bucal de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda [Dissertação de Mestrado] Amazonas; Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas; 2015.

Manaus, ___/___/___.

Banca Examinadora

1) Prof.^a Dr.^a Tatiana Nayara Libório Kimura.

Titulação: Membro Titular e Presidente.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.^a Dr.^a Cristina Motta Ferreira.

Titulação: Membro Titular.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.^a Dr.^a Nikeila Chacon de Oliveira Conde.

Titulação: Membro Titular.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe, que a mim dá muito amor e muito me ensinou. Toda sua determinação e força me serve como exemplo para superar todos os obstáculos e ir mais além do que sou capaz, cada vez mais. Retribuir é o mínimo que posso fazer.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dávida da vida, pelas oportunidades e conquistas concedidas, pela força e determinação para enfrentar as dificuldades e por ter colocado pessoas benevolentes no meu caminho para a concretização de mais essa etapa.

A minha família por todo o amor, afago, dedicação, incentivo e apoio incondicional durante toda a minha vida e caminhada.

Aos meus amigos pela compreensão e incentivo.

A minha orientadora, Tatiana Nayara Libório Kimura, por toda a confiança depositada, dedicação e por servir como exemplo e inspiração. Sua orientação foi imprescindível para a concretização do trabalho.

À minha co-orientadora, Juliana Vianna Pereira, também pela sua dedicação, apoio e incentivo. Sua contribuição também foi fundamental.

Aos meus colegas do mestrado, em especial Antônio Jorge Araújo de Vasconcelos II, pelo companheirismo, apoio e incentivo nas horas difíceis.

Aos professores da Pós-graduação em Odontologia da FAO/UFAM, pela confiança empregada e conhecimento transmitido para o aprimoramento da minha vida na docência.

Aos demais professores da FAO/UFAM, responsáveis diretamente pela minha formação na Odontologia, atualmente colegas de profissão, aos quais sigo como exemplo.

Aos funcionários da FAO/UFAM, que sempre me acolheram e me respeitaram desde a graduação com muito carinho.

Ao HEMOAM, por ter concedido gentilmente o espaço para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do HEMOAM, por terem se disponibilizado em me receber e ajudar durante o período das avaliações dos pacientes.

A Dr.^a Cristina Motta Ferreira, por ter dividido o espaço do Laboratório de Microbiologia do HEMOAM, e muitas vezes ter orientado para a melhoria do trabalho. Sua ajuda também foi fundamental.

A Dr.^a Célia Maria Ferreira Bologneses, por ter me acolhido e ter simplificado minha aproximação aos funcionários e pacientes do HEMOAM.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia do HEMOAM, em especial Denise de Almeida Cristo, pela ajuda na realização de etapas importantes do trabalho.

A Évelyn Costa Lira e Pamella Suely Santa Rosa Pimentel, pessoas que conheci que se tornaram imprescindíveis para a concretização do trabalho. Obrigada por toda a ajuda, conhecimento transmitido, paciência e tempo despendido nessa etapa.

Ao laboratório de Diagnóstico Molecular e Centro de Apoio Molecular da UFAM, por ter concedido gentilmente o espaço para a realização deste trabalho.

A Fundação de Medicina Tropical, pela contribuição dada para a realização do trabalho.

Ao CNPq pelo incentivo financeiro concedido.

Aos pacientes, pela confiança depositada durante essa etapa. Obrigada por terem me proporcionado essa grandiosa experiência pessoal. A força e determinação de vocês me serviram de inspiração em muitos momentos.

RESUMO

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comum na infância. A aplicação de regimes quimioterápicos pode alcançar uma taxa de sobrevivência livre de eventos em cerca de 90% dos pacientes em longo prazo, entretanto a gestão das drogas antineoplásicas pode estar associada a alterações relevantes na cavidade bucal dos pacientes com LLA devido seus efeitos tóxicos. A reativação do herpesvírus humano simples (HHV) é extremamente frequente em pacientes com câncer, tanto com ou sem mucosite, e estas infecções tendem a ser mais recorrentes, duradouras e graves, representando uma ameaça a pacientes imunossuprimidos. Este trabalho avaliou as alterações clínicas e microbiológicas que ocorreram na mucosa bucal de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA, submetidos a tratamento na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, de acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI-2009). Foram avaliados nove pacientes, com idade entre 2 e 14 anos de idade que foram incluídos no estudo no período de setembro a novembro de 2014. Estes pacientes foram submetidos a exame clínico da mucosa bucal para identificação de lesões bucais, assim como a coleta de células da mucosa bucal em diferentes momentos das fases de indução e consolidação do tratamento quimioterápico. Foram ainda avaliados, em momento único, três pacientes saudáveis. Para a detecção quanto a presença do HSV-1, HSV-2, EBV e CMV foi utilizado PCR convencional. Observou-se uma prevalência maior de crianças com 2 anos de idade, distribuídos uniformemente em relação ao sexo. O diagnóstico de LLA B-derivada foi o mais encontrado. As alterações bucais se manifestaram em torno da 2^a, 3^a e 4^a semana da fase de indução, dentre as quais estavam presentes eritema, xerostomia e lábios ressecados. Nenhum dos pacientes apresentou mucosite bucal. Nenhuma das amostras avaliadas foi positiva para HSV-1, HSV-2 e CMV. Somente três amostras de pacientes com LLA e uma de paciente saudável apresentaram amplificação do DNA do vírus EBV. Quanto a identificação de agentes bacterianos, a presença do *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. sanguinis* foi observada. Diante dos resultados encontrados, poucas foram as alterações bucais encontradas nos pacientes que receberam regime terapêutico de acordo a estratificação nos subgrupos preconizados pelo protocolo GBTLI LLA-2009. Sugere-se que os vírus avaliados que não positivaram podem estar em estado de latência, uma vez que a mucosa avaliada encontrava-se em estado íntegro. Infere-se que avaliações periódicas realizadas pelos cirurgiões-dentistas e o acompanhamento das alterações bucais, associada a melhor compreensão da microbiota bucal poderá contribuir na melhoria da qualidade de vida nestes pacientes.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide; Microbiota Bucal; Herpesviridae; Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignancy in childhood. The application of chemotherapy protocols can achieve an event-free survival rate of approximately 90% of patients in long term, however administration of antineoplastic drugs may be associated with significant alterations in the oral cavity of patients with ALL due to its toxic effects. The reactivation of human herpesvirus simple (HSV) is extremely common in cancer patients, both with or without mucositis, and these infections tends to be more likely, lasting and severe, posing a threat in cases of immunosuppression. This study evaluated the clinical and microbiological changes that occurred in the oral mucosa of pediatrics with ALL undergoing treatment in the Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, according to the Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI- 2009). Nine patients, aged 2 to 14 years old, were evaluated, and included in the study from September to November 2014. These patients underwent clinical examination of the oral mucosa to identify oral lesions, as well as the analysis of buccal mucosa cells during different times according to stages of induction and consolidation. Three healthy patients were also evaluated in a just one moment. Conventional PCR was performed to detect presence of HSV-1, HSV-2, CMV and EBV. There was a higher prevalence of children of 2 years old, distributed uniformly by gender. The diagnosis of ALL B-derivative was the most frequent. Oral diseases appeared around the 2nd, 3rd and 4th week of inductions' stage, including erythema, dry mouth and dry lips. None of the patients presented oral mucositis. None of the samples tested showed positivity for HSV-1, HSV-2 and CMV. Only three samples of ALL patients and a healthy patient showed DNA amplification for EBV. On the bacterial subject, it was detected the presence of *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* and *S. sanguinis*. Results showed that there were few oral abnormalities found in patients receiving therapeutic protocols according to stratification in subgroups recommended by GBTLI-ALL-2009. Negative results suggested that the virus may be in a state of latency since the assessed mucosa was healthy. Probably, periodic evaluation by dentists and follow-up of oral alterations, associated with better understanding of the oral microbiota may contribute to improve the quality of life in these patients.

Keywords: Lymphoid Leukemia; Oral Microbiota; Herpesviridae; Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Fluxograma representando as etapas das avaliações clínicas, coletas do material e análise laboratorial após admissão do paciente..... | 64 |
| Figura 2 – Distribuição das coletas dos pacientes com LLA nas diferentes fases e grupo controle..... | 69 |
| Figura 3 – Nomenclatura das amostras de acordo com o paciente e dias das fases de tratamento..... | 70 |
| Figura 4 - Mini kit <i>PureLink® Genomic DNA</i> | 71 |
| Figura 5 - Mini kit <i>QIAamp DNA®</i> | 71 |
| Figura 6 - <i>Swab</i> com meio de cultura Stuart..... | 82 |
| Figura 7 - Computador e câmera incubadora do Vitek® 2 Compact..... | 84 |
| Figura 8 - Semi-mucosa labial ressecada durante avaliação da cavidade bucal..... | 87 |
| Figura 9 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando amplificação de um fragmento de 123 pb da β-globina nas amostras 1 a 13..... | 88 |
| Figura 10 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando amplificação de um fragmento de 123 pb da β-globina nas amostras 14 a 26..... | 88 |
| Figura 11- Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do HSV-1 nas amostras 1 a 4 (o mesmo ocorreu para o | 89 |

| | |
|--|-----|
| restante das amostras)..... | |
| Figura 12 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do HSV-2 nas amostras 1 a 7 (o mesmo ocorreu para o restante das amostras)..... | 89 |
| Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do CMV nas amostras 1 a 13..... | 90 |
| Figura 14 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do CMV nas amostras 14 a 26..... | 90 |
| Figura 15 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando amplificação do DNA do EBV somente na amostra 13 (paciente 5 do estudo)..... | 91 |
| Figura 16 - Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando amplificação do DNA do EBV somente na amostra 14 (paciente 5 do estudo) e amostra 23 (paciente A)..... | 92 |
| Figura 17 - Representando os cartões (A) e solução salina (B)..... | 117 |
| Figura 18 - Calibração do Densicheck..... | 118 |
| Figura 19 - Preparo da suspensão nos tubos de identificação..... | 119 |
| Figura 20 - Transferência de 145 µL de suspensão preparada no tubo de ID para o tubo de TSA..... | 120 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Classificação da OMS para Leucemias Linfoblásticas Agudas | 23 |
| Quadro 2 - Esquema das estratégias de tratamentos para os diferentes diagnósticos, de acordo com o protocolo GBTLI LLA-2009... | 29 |
| Quadro 3 - Escala de Toxicidade Oral da Organização Mundial de Saúde | 32 |
| Quadro 4 - Subdivisão da família <i>Herpesviridae</i> , células-alvo que acometem e localização do estado de latência..... | 48 |
| Quadro 5 - Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia B-Derivada do grupo de baixo risco de recaída..... | 66 |
| Quadro 6 - Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia B-Derivada do grupo de alto risco de recaída..... | 67 |
| Quadro 7 - Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda T-Derivada..... | 67 |
| Quadro 8 - Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo..... | 67 |
| Quadro 9 - Renomeação e identificação dos microtubos das amostras de acordo com as coletas dos pacientes..... | 72 |
| Quadro 10 - Sequência dos oligonucleotídeos da β -globina..... | 75 |
| Quadro 11 - Sequência dos oligonucleotídeos para o HSV-1..... | 76 |
| Quadro 12 – Sequência dos oligonucleotídeos para o HSV-2..... | 78 |
| Quadro 13– Sequência dos oligonucleotídeos para os vírus do EBV e CMV..... | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Quantificação da concentração de DNA nas amostras..... | 74 |
| Tabela 2 – Preparação do Mix para a β -globina..... | 75 |
| Tabela 3 – Sequência do ciclo de amplificação da reação da β -globina | 76 |
| Tabela 4 - Preparação do Mix para o HSV-1..... | 77 |
| Tabela 5 - Sequência do ciclo de amplificação da reação do HSV-1..... | 77 |
| Tabela 6 - Preparação do Mix para o HSV-2..... | 78 |
| Tabela 7 - Sequência do ciclo de amplificação da reação do HSV-2..... | 79 |
| Tabela 8 - Preparação do Mix para o EBV..... | 80 |
| Tabela 9 - Preparação do Mix para o CMV..... | 80 |
| Tabela 10 - Sequência do ciclo de amplificação da reação para EBV e CMV..... | 81 |
| Tabela 11 - Perfil clínico dos pacientes estudados..... | 86 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1- Distribuição dos pacientes quanto o diagnóstico da LLA..... | 86 |
| Gráfico 2 - Distribuição dos pacientes quanto as alterações bucais apresentadas durante as avaliações nas diferentes fases..... | 87 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| CMV | Citomegalovírus |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP | Conjunto de quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos |
| DRM | Doença Residual Mínima |
| EBV | Epstein–Barr virus |
| FAO/UFAM | Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas |
| GBTLI LLA-99 | Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância de 1999 |
| GBTLI LLA-2009 | Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância de 2009 |
| HEMOAM | Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas |
| HHV | Herpesvírus Humano |
| HSV | Herpesvírus humano simples |
| HSV-1 | Herpesvírus humano simples tipo 1 |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| LLA | Leucemia Linfoblástica Aguda |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| Pb | Pares de bases nitrogenadas |
| PBS | Tampão fosfato |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| Ph+ | Cromossomo Filadélfia positivo |

| | |
|---------|--------------------------------|
| BCR/ABL | Translocação dos genes BCR-ABL |
| RC | Radiação craniana |
| SG | Sobrevida Global |
| SLE | Sobrevida Livre de Eventos |
| TBE | Tris/ácido bórico/EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TSA | Teste de susceptibilidade |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) | 21 |
| 2.2 Protocolos terapêuticos do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda | 25 |
| 2.2.1 Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (GBTLI LLA-99) | 25 |
| 2.2.2 Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (GBTLI LLA-2009) | 26 |
| 2.3 Mucosite bucal | 31 |
| 2.4 Agentes fúngicos e bacterianos envolvidos na mucosite bucal | 37 |
| 2.5 Herpesvírus Humano (HHV) | 47 |
| 2.5.1 HSV | 49 |
| 2.5.2 EBV e CMV | 54 |
| 3 OBJETIVOS | 60 |
| 3.1 Geral | 60 |
| 3.2 Específicos | 60 |
| 4 PACIENTES E MÉTODOS | 61 |
| 4.1 Comitê de Ética em Pesquisa | 61 |
| 4.2 Desenho do estudo | 61 |
| 4.3 População do estudo | 62 |
| 4.4 Critérios de Inclusão | 62 |
| 4.5 Critérios de Exclusão..... | 62 |
| 4.6 Procedimentos da pesquisa clínica | 63 |
| 4.6.1 Avaliação da condição bucal dos pacientes e graduação da mucosite | 65 |
| 4.6.2 Coleta de células epiteliais da mucosa bucal e preparo das amostras..... | 66 |
| 4.6.3 Otimização do método de extração do DNA | 70 |
| 4.6.4 Extração do DNA..... | 72 |
| 4.6.5 Verificação da qualidade do DNA | 74 |
| 4.6.6 Verificação da presença do DNA homólogo dos vírus da família HHV através da amplificação do DNA..... | 76 |
| 4.6.7 Eletroforese em gel de agarose 2,0% | 81 |
| 4.6.8 Coleta das amostras para identificação dos fungos e bactérias | 82 |
| 5 RESULTADOS | 85 |
| 6 DISCUSSÃO | 93 |
| 6.1 LLA e Quimioterapia | 94 |
| 6.2 Complicações bucais e Quimioterapia | 96 |
| 6.3 Mucosite e microbiota bucal | 97 |
| 6.3.1 Mucosite e agentes virais da família HHV..... | 97 |
| 6.3.2 Mucosite e agentes fúngicos e bacterianos | 101 |
| 7 CONCLUSÕES | 103 |
| 8 REFERÊNCIAS | 104 |
| APÊNDICE A | 109 |
| APÊNDICE B | 111 |

| | |
|-------------------------|------------|
| APÊNDICE C | 112 |
| APÊNDICE D | 113 |
| ANEXO A | 115 |
| ANEXO B | 116 |
| ANEXO C | 117 |

1 INTRODUÇÃO

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna do sistema hematopoiético, caracterizada por um aumento na produção das células imaturas chamadas blastos, que podem se acumular em numerosos órgãos e tecidos, preferencialmente na medula óssea (GUIMARÃES & ROSA, 2008).

É a neoplasia maligna mais comum na infância e adolescência, apresentando-se frequentemente quimiossensível, alcançando uma taxa de sobrevida livre de eventos em cerca de 90% quando implementado o regime terapêutico ideal baseado na estratificação dos subgrupos (PUI et al., 2012).

No protocolo definido pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância de 1999 (GBTLI LLA-99), os pacientes são distribuídos em grupos de baixo e alto risco, de acordo com os achados clínico-laboratoriais ao diagnóstico e fatores de prognóstico, adaptando a intensidade da quimioterapia aos diferentes grupos (CAZÉ, BUENO e SANTOS, 2010). O conceito do Protocolo GBTLI LLA-2009 foi baseado nos resultados dos estudos GBTLI LLA-93 e LLA-99, que exclui do grupo de baixo risco os pacientes portadores de LLA T-derivada e aqueles com LLA Ph+/BCR/ABL positivos, que têm protocolos específicos (GBTLI LLA-2009).

A gestão das doenças malignas frequentemente está associada com efeitos tóxicos significativos podendo causar alterações relevantes na cavidade bucal dos pacientes com LLA e imunossupressão grave (EPSTEIN et al. 2002; SONIS, 2004; NISCOLA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; MENDONÇA, 2008; MORAIS et al., 2014).

Mucosite é um efeito colateral comum entre as complicações secundárias resultantes da quimioterapia, sendo identificada como um fator de risco importante para infecções (MENDONÇA, 2008). Sua gravidade pode ser avaliada através da Escala de Toxicidade Bucal da Organização Mundial de Saúde. Esta escala é dividida em cinco graus classificatórios, que variam de sem alterações (0); dor e eritema localizados na mucosa bucal (1); eritemas e úlceras (2); eritema difuso, lesões erosivas e ulcerações que requerem dieta líquida (3) e, úlceras difusas que tornam a alimentação impossível (4) (WHO, 1979).

Infecções por Cândida podem se apresentar sobrepostas, necessitando de tratamento com agentes antifúngicos locais e sistêmicos eficazes. Para a redução da carga bacteriana no interior da cavidade bucal podem ser utilizados bochechos antissépticos bucais de Digluconato de Clorexidina (0,12%), bem como, terapias antivirais contra a reativação do HSV na cavidade bucal (SADASIVAN, 2010).

Há estudos que sugerem que a presença do HSV-1 desempenha um papel importante e pode estar relacionado à severidade da mucosite bucal induzida por quimioterapia em pacientes com neoplasias hematológicas (CHEN et al., 2011; RÜPING et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012). A reativação do HSV bucal é extremamente frequente em pacientes com câncer, independente da presença de mucosite (DJURIC et al., 2009).

O EBV está presente em cerca de 90% da população mundial (BRAS-SILVA, 2009), ao passo que o CMV pode acometer até 99% da população adulta dependendo da etnia e condições socioeconômicas (HALENIUS; HENGEL, 2014). Ambos representam uma ameaça a pacientes imunossuprimidos (SCHUSTER & KRETH, 1992; SLOTS et al., 2006; HALENIUS & HENGEL, 2014; CHEN et al., 2015).

A utilização preventiva de protocolos de higiene bucal aplicado sistematicamente em pacientes pediátricos com câncer durante a quimioterapia se demonstrou estatisticamente eficiente quando comparado a grupos que não receberam cuidados, reduzindo na incidência e gravidade da mucosite bucal, bem como a dor relacionada (CHENG et al., 2001).

Embora a profilaxia com aciclovir tenha se tornado padrão para pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas, o papel do HSV na ocorrência de danos na mucosa bucal de pacientes submetidos à quimioterapia permanece incerto, sendo necessárias mais pesquisas em busca da determinação da relação entre a microbiota bucal e a presença e exacerbação da mucosite bucal, permitindo uma avaliação do risco potencial infeccioso dominante (NAPEÑAS et al., 2007; DJURIC et al., 2009; RÜPING et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações clínicas e microbiológicas na mucosa bucal de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA, submetidos a tratamento na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, de acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI-2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A leucemia é subdividida clínica e patologicamente em grandes grupos, dentre os quais, estão suas formas agudas e crônicas, em que a forma aguda caracteriza-se por um aumento rápido no número de células imaturas do sangue, que faz com que a medula óssea seja incapaz de reproduzir células sanguíneas saudáveis, enquanto que, a forma crônica caracteriza-se pelo aumento excessivo no número de células maduras anormais da série branca do sangue. Pode ainda ser classificada de acordo com o tipo de célula afetada pela desordem, como por exemplo, os linfoblastos, resultando em uma doença denominada leucemia linfoblástica, ao passo que, quando afeta as células granulocíticas e monocíticas, são denominadas leucemias mieloides (INCA, 2014).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima cerca de 5050 novos casos de leucemia em homens e 4320 em mulheres, para o Brasil no ano de 2014, correspondendo a um risco estimado de 5,20 novos casos para cada 100 mil homens e 4,24 para cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Leucemia Linfoblástica Aguda é uma neoplasia maligna derivada das células hematopoiéticas, caracterizada por um aumento na produção maligna de linfoblastos, preferencialmente na medula óssea, porém podendo se acumular em numerosos órgãos e tecidos (GUIMARÃES & ROSA, 2008). É a neoplasia maligna mais comum na infância e adolescência, responsável por cerca de 25% de todos os cânceres infantis e 80% das leucemias infantis, com pico de prevalência entre 2 e 5 anos de idade, apresentando-se frequentemente quimiossensível. A aplicação de

regimes quimioterápicos pode alcançar uma taxa de sobrevida livre de eventos em cerca de 80% dos pacientes em longo prazo (PUI, ROBISON & LOOK, 2008; STANULLA & SCHRAPPE, 2009; SILVERMAN et al., 2010), e quando implementado o regime terapêutico ideal, baseado na estratificação dos subgrupos, classificados de acordo com as características das células leucêmicas do paciente, as taxas de cura podem alcançar cerca de 90% para LLA (PUI et al., 2012).

As causas precisas do desenvolvimento desta patologia são desconhecidas, porém há hipóteses que sugerem um mecanismo infeccioso, exposição a um agente ainda não reconhecido, mutações, predisposição genética e susceptibilidade à leucemia, como por exemplo, crianças com certas doenças genéticas, como síndrome de *down*, neurofibromatose tipo I, imunodeficiência hereditária. O desenvolvimento de qualquer leucemia da infância, sempre vai envolver a quebra inicial do DNA e imprecisa reparação, em resposta à infecção, produtos químicos, baixo nível de radiação, exposições ambientais ou de outros, ainda desconhecidos. Suscetibilidade genética é cada vez mais provável em termos de não somente resposta à infecção, mas também ao reconhecimento e reparação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (McNALLY & EDEN, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em colaboração com a Sociedade de Hematopatologia e a Associação Europeia de Hematopatologia, publicou uma classificação dos tumores dos tecidos hematopoiéticos e tecidos linfoides, que incorpora novas informações que surgiram a partir de estudos científicos e clínicos, classificando as neoplasias dos tecidos hematopoiéticos e linfoblásticos de acordo com a combinação da morfologia, imunofenotipagem, genética e características clínicas das distintas doenças, na qual, estas são estratificadas de acordo com sua linhagem de células e sua derivação a partir do precursor ou células linfoblásticas

maduras (VARDIMAN et al., 2009; CAMPO et al., 2011). O quadro 1 apresenta os principais subgrupos das leucemias agudas conforme a classificação da OMS, e as entidades específicas que são compostas (VARDIMAN et al., 2009).

Quadro 1 – Classificação da OMS para Leucemias Linfoblásticas Agudas.

| Leucemias agudas de linhagem ambígua |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia aguda indiferenciada • Leucemia aguda de fenótipo misto com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1 • Leucemia aguda de fenótipo misto t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranjado • Leucemia aguda de fenótipo misto B-mieloide não especificado • Leucemia aguda de fenótipo misto T-mieloide não especificado <p>Leucemia/linfoma de células blásticas NK</p> |
| Leucemia linfoblástica/Linfoma B |
| <ul style="list-style-type: none"> • Leucemia/Linfoma linfoblástico B não especificado • Leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes • Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL 1 • Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranjado • Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1(<i>ETV6-RUNX1</i>) • Leucemia/linfoma linfoblástico B com hiperdiploidia • Leucemia/linfoma linfoblástico B com hipodiploidia • Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH • Leucemia/linfoma linfoblástico B t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i> |
| Leucemia/Linfoma Linfoblástica T |

Fonte: Adaptado de VARDIMAN et al., 2009.

As leucemias agudas de linhagem ambígua, na nova classificação da OMS de 2008, são distribuídas em separado e altera os critérios diagnósticos. Os casos sem marcadores de linhagem específicos são denominados leucemia aguda

indiferenciada, expressando na maioria das vezes CD34, HLA-Dr, e/ou CD38 e, por vezes, TdT, mas não expressam antígenos mieloide ou linfoide específicos, enquanto que, são denominadas de leucemia aguda de fenótipo misto, as leucemias cujos blastos expressam concomitantemente na mesma célula, antígenos de mais de uma linhagem ou que têm populações distintas de blastos que são de linhagens diferentes. Uma entidade provisória foi criada, a leucemia/linfoma linfoblástico de célula NK. Ainda que o fenótipo de neoplasia de precursores de células NK verdadeiras não esteja claro, o diagnóstico deve ser considerado quando os blastos expressam CD56 com antígenos associados à célula T imatura, como CD7 e CD2, na ausência de qualquer antígeno de expressão B ou mieloide e sem rearranjo de gene do receptor de célula T (VARDIMAN et al., 2009; CAMPO et al., 2011).

As anormalidades cromossômicas são consideradas como entidades distintas, como por exemplo, LLA/linfoma com t(1;19)(q23;p13.3), TCRF3/ PBX1 etc. Os casos de LLA diagnosticados com cariótipo normal devem ser investigados para verificação da t(12;21)(p13;q22) por hibridização *in situ* por fluorescência ou o rearranjo ETV6/RUNX1 não detectável pela citogenética clássica, pois essa anormalidade apresenta prognóstico favorável, bem como, realizar avaliação para a presença de cromossomo Filadélfia e/ou rearranjo BCR/ABL por possuírem prognóstico desfavorável. Após análise, os casos de LLA que não apresentam alteração citogenética ou molecular são classificados como leucemia/linfoma linfoblástico B sem outra especificação. A leucemia/linfoma linfoblástico T podem apresentar rearranjos cromossômicos envolvendo 14q11.2, 7q35, 7p14-15, que são locos de receptores de célula T α , β e γ , respectivamente. O significado patogênico dessas anormalidades ainda não é claro, e esse subtipo de leucemia

não é subclassificado de acordo com a alteração genética (VARDIMAN et al., 2009; CAMPO et al., 2011).

2.2 Protocolos terapêuticos do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda

2.2.1 Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (GBTLI LLA-99)

No protocolo definido pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância de 1999, os pacientes são distribuídos em grupos de baixo e alto risco, de acordo com achados clínico-laboratoriais ao diagnóstico e a resposta precoce à terapia de indução (7º, 14º e 28º dias), adaptando a intensidade da quimioterapia aos diferentes grupos de risco, ou seja, a terapia mais agressiva é permitida aos pacientes com maiores riscos de recaída e a menos agressiva para os com menor risco (GBTLI LLA-99).

O grupo de risco básico verdadeiro é representado pelos pacientes que se apresentam com idade ≥ 1 ano e ≤ 10 anos e glóbulos brancos $\leq 10000/\text{mm}^3$, ausência de massa mediastinal, ausência de envolvimento em sistema nervoso central e hepatoesplenomegalia < 5 cm da RC (Radiação craniana), sendo recomendáveis imunofenotipagem não-T, antígeno CD10 $> 20\%$, hiperdiploidia > 50 cromossomos e ausências do Cromossomo Filadélfia ou translocação Filadélfia positivo (Ph+) (GBTLI LLA-99).

O grupo risco básico é representado pelos pacientes com idade $\geq 1 \leq 10$ anos, contagem de glóbulos brancos $> 10000 \leq 50000/\text{mm}^3$ e/ou presença de massa mediastinal e/ou fígado ou baço ≥ 5 cm da RC, sendo recomendáveis imunofenotipagem não-T, hiperdiploidia de 47 a 50 cromossomos e ausência do Cromossomo Filadélfia ou translocação Filadélfia positivo (Ph+) (GBTLI LLA-99).

O grupo classificado como alto risco de recaída é caracterizado por pacientes com idade < 1 ano ou > 9 anos ou glóbulos brancos $> 50000/\text{mm}^3$ ou leucometria no 8º dia (D₈) $> 5000/\text{mm}^3$ ou presença de blastos no sangue periférico no 14º dia (D₁₄) ou medula M₃ no D₁₄ ou medula M₂/M₃ no 28º dia (D₂₈), sendo recomendáveis imunofenotipagem T ou achados desfavoráveis da citogenética – hipodiploidia < 46 , pseudodiploidia, cromossomo Ph+ (GBTLI LLA-99).

As estratégias de tratamento para os pacientes com leucemia linfoblástica aguda na infância compreendem algumas fases de tratamento, incluindo uma fase de indução que objetiva uma remissão inicial dentro de um mês através do uso de múltiplos agentes quimioterápicos; fase de consolidação para erradicação de blastos residuais nos pacientes que se encontram em remissão e, fase de manutenção para estabilização da remissão, suprimindo o ressurgimento de um clone droga-resistente, mantendo uma redução contínua de células leucêmicas residuais (FARIAS, 2010).

2.2.2 Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (GBTLI LLA-2009)

O conceito do Protocolo GBTLI LLA-2009 foi baseado nos resultados dos estudos GBTLI LLA-93 e LLA-99.

Algumas características da fenotipagem e da citogenética desfavorável da célula blástica influenciam sensivelmente os resultados terapêuticos, principalmente aqueles avaliados no início do tratamento e final da fase de indução e, em longo prazo nas taxas de sobrevida global e sobrevida livre de eventos (GBTLI LLA-2009).

No protocolo GBTLI LLA-2009 foi implementado a Doença Residual Mínima (DRM), em que sua determinação é necessária para a definição dos grupos de risco e terapias ajustadas aos referentes grupos, conduzindo a terapia do protocolo. Além da avaliação dos critérios clínicos, as características da fenotipagem e citogenética das células blásticas influenciam nos resultados terapêuticos, sendo estes avaliados no início do tratamento, nos dias 8 (D8) e 15 (D15), e no final da indução, dia 35 (D35) e a longo prazo nas taxas de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Eventos (SLE). O conhecimento deste valores juntamente com o tipo de célula leucêmica, acrescido a resposta do paciente à terapia, medida morfologicamente pela porcentagem dos blastos leucêmicos identificados no sangue periférico no D8 ou na medula óssea nos dias 15 e 35, permite a identificação do grupo de pacientes com alto risco de falha indutória e recidiva (GBTLI LLA-2009).

Neste protocolo, a estratificação dos pacientes nos grupos de baixo e alto risco de recaída torna-se exclusivamente para as leucemias B-derivadas, em que os pacientes com excelente sensibilidade à terapia tem o esquema quimioterápico reduzido, enquanto que os pacientes portadores de LLA T-derivada e aqueles com LLA Ph+/BCR/ABL (proteína BCR-ABL é uma tirosina-quinase constitutivamente ativa, expressa nas leucemias positivas para o cromossomo Ph) positivos foram excluídos do grupo de baixo risco, sendo introduzidos protocolos específicos (GBTLI LLA-2009).

Os lactentes < 12 meses e os portadores de Síndrome de Down requerem abordagens terapêuticas específicas por constituírem subgrupos especiais de pacientes (GBTLI LLA-2009).

Os pacientes portadores de LLA B-derivada com idade $\geq 1 < 9$ anos e glóbulos brancos $< 50000/\text{mm}^3$, sem acometimento do Sistema Nervoso Central, sem citogenética de mau prognóstico (BCR-ABL, rearranjo do gene MLL e hipodiploidia < 46 cromossomos) são classificados inicialmente no grupo de baixo risco de recaída (GBTLI LLA-2009).

Os critérios de elegibilidade dos pacientes com diagnóstico de LLA B-derivada classificados no grupo de alto risco são idade > 9 anos, leucometria inicial $\geq 50000/\text{mm}^3$, acometimento do Sistema Nervoso Central ao diagnóstico, citogenética desfavoráveis ou respondedores lentos/refratários à prefase e terapia da indução (GBTLI LLA-2009).

No quadro 2 a seguir, segue o esquema da estratégia de tratamento para os pacientes com LLA na infância, compreendendo as fases de tratamento de acordo com seu diagnóstico:

Quadro 2 – Esquema das estratégias de tratamentos para os diferentes diagnósticos, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-2009

| PLANO GERAL DE TRATAMENTO | | | | | | | |
|------------------------------|--|---------------------------|--------------------------|----------------|---------------------|---------------------|------------|
| GRUPOS E FASES DE TRATAMENTO | LLA B DERIVADA Baixo risco de recaída | PREFASE + FASE DE INDUÇÃO | CONSOLIDAÇÃO DA REMISSÃO | INTENSIFICAÇÃO | CONSOLIDAÇÃO TARDIA | | MANUTENÇÃO |
| | LLA B DERIVADA Alto risco de recaída | | | | INTERFASE | CONSOLIDAÇÃO TARDIA | MANUTENÇÃO |
| | LLA T DERIVADA | | | | INTERFASE | CONSOLIDAÇÃO TARDIA | MANUTENÇÃO |
| | LLA PH+ | | | | CONSOLIDAÇÃO TARDIA | | MANUTENÇÃO |

Para o grupo de pacientes portadores de LLA B-derivada com baixo risco de recaída, o tratamento é composto por uma prefase e fase de indução, fase de consolidação da remissão, fase de intensificação, interfase, consolidação tardia e terapia de manutenção, e o protocolo para este grupo preconiza a realização de uma **prefase** com Prednisona 60 mg/m²/dia durante 7 dias e uma injeção intratecal no 1º dia do tratamento de Metotrexato; **fase de indução** por 4 semanas com Dexametasona, Vincristina, Daunoblastina, L-Asparaginose e MADIT (Metotrexato, Citarabine e Dexametasona); **fase de consolidação da remissão** com a administração de 6-Mercaptopurina, Citarabine e MADIT; **intensificação** em 8 semanas com Metotrexato 2g/m² x 4, 6-Mercaptopurina, MADIT; **consolidação tardia** em 8 semanas com Dexametasona, Vincristina, Doxorubicina, L-Asparaginose, 6-Tioguanina, Citarabine, MADIT; a **terapia de manutenção** está alicerçada nas drogas 6-Mercaptopurina e Metotrexato que serão de uso

intermitente por 18 meses; injeções intratecais com MADIT serão administradas a cada 8 semanas durante toda a terapia de manutenção (GBTLI LLA-2009).

Para o grupo de pacientes portadores de LLA B-derivada alto risco de recaída, o tratamento é composto por uma **prefase** que utiliza a monoterapia com Prednisona 60 mg/m²/dia x 7, juntamente com uma injeção intratecal de Metotrexato no 1º dia; a **fase de indução** objetiva alcançar a remissão clínica completa em 4 semanas, utilizando Prednisona, Vincristina, Daunorrubicina, L-Asparaginase, Ciclofosfamida (preconizada a pacientes respondedores lentos a terapia da prefase e indução), MADIT; **fase da consolidação da remissão** por 8 semanas é basicamente composta por duas doses intermediárias do Metotrexato adicionalmente a Etoposide, Citarabine, 6-Tioguanina e Vincristina, Prednisona, 6-Mercaptopurina, Metotrexato; **fase de intensificação** com duração de 8 semanas, composta por um bloco com Vincristina, Doxorrubicina, L-Asparaginase, Dexametasona e outro bloco com Etoposide, Citarabina, 6-Tioguanina; uma **interfase** por 8 semanas, com doses mais elevadas de Metotrexato e uso de L-Asparaginase, 6-Mercaptopurina, Vincristina, Prednisona; **consolidação tardia** por 8 semanas, composta por 2 blocos terapêuticos, um com Vincristina, Daunorrubicina, L-Asparaginase, Prednisona e outro, com Ciclofosfamida, Citarabina, 6-Tioguanina e, **terapia de manutenção** por 18 meses, preconizado doses de Metotrexato, 6-Mercaptopurina, Vincristina, Prednisona, MADIT.

2.3 Mucosite bucal

A gestão de drogas antineoplásicas para tratamento de doenças hematológicas malignas frequentemente está associada com efeitos tóxicos significativos. Estes efeitos podem afetar diretamente a mucosa pela circulação sistêmica e estar relacionado com quadro de xerostomia e mudança nos constituintes da saliva, afetando a manutenção e reparação do epitélio, assim como, a fisiologia da microbiota bucal e a interação desta microbiota com o epitélio (MCCARTHY et al., 1998; EPSTEIN et al., 2002).

A mucosite é uma alteração comum entre as complicações secundárias, sendo identificada como um fator de risco importante para infecções (SONIS, 2004; NISCOLA et al., 2007; MENDONÇA, 2008).

O desenvolvimento da mucosite é um processo biológico dinâmico que pode ser dividido em cinco estágios, iniciação, sinalização, amplificação, ulceração e cicatrização. A fase de iniciação ocorre rapidamente após a administração da radiação ou quimioterapia que causam lesão direta às células epiteliais basais e do tecido subjacente e, simultaneamente, espécies reativas de oxigênio são geradas. A fase de sinalização é caracterizada pela ativação de vias de transdução, de forma direta pela radioterapia ou quimioterapia ou, indiretamente pelos radicais oxidativos, que ativam fatores de transcrição como p53 e o fator nuclear-kb (NF-kb), levando à sobre-regulação dos genes que modulam a resposta ao dano. Na fase de amplificação, a ativação do fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) no epitélio e endotélio, e a ativação de macrófagos, ocasiona na produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais amplificam o sinal primário ou podem ativar NF-kB em outras células. Estas moléculas de sinalização também participam de um ciclo de *feedback*

positivo que amplificam os efeitos originais de radiação e quimioterapia, provocando ainda mais lesão tecidual. Os danos diretos e indiretos para as células-tronco epiteliais resultam em uma perda da capacidade de renovação. A fase ulcerativa é representada pelo rompimento da integridade da mucosa, ocasionando lesões ulceradas extremamente dolorosas propensas à colonização de microrganismos. Estas manifestações aparecem em cerca de 10 dias após o início do tratamento quimioterápico ou do efeito acumulativo das doses de radiação. A fase de cicatrização e cura, na maioria dos casos, inicia-se cerca de 2-3 semanas após a cessação da radioterapia ou 3 semanas após a administração da quimioterapia, caracterizada pela proliferação, diferenciação e migração de células epiteliais com a restauração da integridade da mucosa (SONIS, 2004).

A gravidade da mucosite bucal pode ser avaliada através da Escala de Toxicidade Oral da OMS. Esta escala é dividida em cinco graus classificatórios (Quadro 3) (WHO, 1979).

Quadro 3 – Escala de Toxicidade Oral da Organização Mundial de Saúde

| | |
|---------------|---|
| Grau 0 | Sem alterações |
| Grau 1 | Dor e eritema |
| Grau 2 | Eritemas e úlceras |
| Grau 3 | Eritema difuso, lesões ulcerativas, dieta líquida |
| Grau 4 | Úlceras difusas que tornam a alimentação impossível |

Fonte: Adaptado da escala de toxicidade oral da OMS, 1979.

Por não haver um tratamento determinante para a mucosite, este é exclusivamente paliativo, concentrado principalmente na gestão dos sintomas e controle da dor (STONE, FLIEDNER, SMIET, 2005; EILERS, MILLION, 2007). Porém, a utilização preventiva de protocolos de higiene bucal aplicado

sistematicamente em pacientes pediátricos com câncer durante a quimioterapia se demonstrou estatisticamente eficiente quando comparado a grupos que não receberam cuidados, reduzindo a incidência e gravidade da mucosite bucal, bem como a dor relacionada (CHENG et al., 2001).

Epstein e colaboradores (2002) realizaram uma revisão da literatura para analisar o papel da função salivar na modulação da mucosite orofaríngea induzida por quimioterapia. As drogas quimioterápicas podem apresentar efeitos tóxicos nas células da mucosa bucal e em elementos celulares do tecido conjuntivo. A secreção destas drogas na saliva pode resultar na exposição tóxica para o ambiente bucal levando à redução do volume e mudança de constituintes da saliva que podem afetar a manutenção e reparação do epitélio, a fisiologia da microbiota bucal e a interação entre a flora bucal e o epitélio. Os autores concluíram que uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais os agentes quimioterápicos específicos causam mucosite pode levar a abordagens de gestão que reduzem a incidência e severidade desta, melhorando a qualidade de vida e assegurando a quimioterapia necessária para melhorar as taxas de cura do câncer.

Costa e colaboradores (2003) avaliaram a eficácia de um protocolo bucal preventivo usando bochechos de clorexidina na prevenção de complicações da mucosa bucal induzida por quimioterapia em crianças tratadas com quimioterapia intensiva para leucemia linfoblástica aguda (LLA). Quatorze crianças, com idade de 2 a 10 anos (média = 7 anos), recebendo quimioterapia intensiva para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda participaram do estudo. Estas crianças receberam o mesmo regime quimioterápico em um período de seis semanas e nenhuma apresentava quaisquer sinais clínicos de candidíase bucal ou esofágica, nem quaisquer outras complicações bucais sobre a mucosa antes de iniciar o protocolo

bucal preventivo e a quimioterapia intensiva. As crianças mais novas foram incluídas no grupo controle. O protocolo bucal preventivo foi iniciado pelo menos um dia antes de se iniciar a quimioterapia intensiva e terminava dez dias após o final deste período, com um tempo médio de oito semanas. No grupo experimental, sete pacientes receberam um protocolo preventivo diário que consistia nos cuidados de higiene bucal, incluindo escovação supervisionada duas vezes ao dia e bochechos com digluconato de clorexidina a 0,12%. As sete crianças do grupo controle receberam uma higiene bucal diária e bochechos com um enxaguatório placebo. Ambos os grupos foram avaliados diariamente. Durante o período experimental, todos mantiveram uma boa higiene bucal e uma redução significativa foi observada na incidência de mucosite e ulceração nas crianças que receberam o protocolo bucal preventivo usando bochechos de digluconato de clorexidina a 0,12% ($p < 0,05$; teste exato de Fisher). Uma criança (14,3%) do grupo experimental e cinco (71,4%) do grupo controle desenvolveram mucosite bucal e ulceração. Nenhuma outra complicação na mucosa bucal foi observada. As mucosites se desenvolveram entre dois e quatro dias após a administração inicial da dose intravenosa de metotrexato, e esta foi mais frequente na mucosa labial e jugal. O tempo médio de duração das mucosites e ulcerações foram de 10 e 16 dias, respectivamente no grupo controle. A gravidade das lesões bucais e duração na criança que recebeu bochechos de digluconato de clorexidina foram menores em comparação com o grupo controle. Nenhuma toxicidade foi observada neste estudo, somente a criança que desenvolveu mucosite no grupo experimental relatou a sensação de queimação na boca associado ao bochecho de clorexidina. Os autores concluíram que o protocolo bucal preventivo aplicado no presente estudo pode ser utilizado como profilaxia para as complicações bucais nas crianças com leucemia que estão recebendo

quimioterapia intensiva. Além disso, pode ser justificado para obter e manter a melhor saúde bucal possível em pacientes em estado grave, pois uma melhoria das condições bucais podem diminuir seu sofrimento e evitar a propagação de infecções graves a partir da cavidade bucal.

Oliveira Lula e colaboradores (2007) compararam a frequência de lesões bucais em pacientes com leucemia submetidos a dois protocolos de quimioterapia. Foram avaliados 28 pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda com idades entre 2 e 13 anos tratados no Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Belo, São Luís, Maranhão. Oito pacientes foram excluídos por lesões bucais presentes resultantes da progressão da leucemia antes do início da quimioterapia. A amostra final foi composta por 20 pacientes, que foram divididos em Grupo I (n = 10) que consistiu de pacientes tratados de acordo com o protocolo GTBLI-93 e Grupo II (n = 10) que consistiu de pacientes tratados de acordo com o protocolo BFM. Todas as crianças incluídas no estudo estavam na fase de indução da quimioterapia. Os pacientes receberam instruções de higiene bucal e atendimento odontológico durante o período de acompanhamento. Os pacientes foram examinados clinicamente por meio de inspeção visual e tátil das estruturas de suporte dos dentes e tecidos moles no dia da admissão no hospital, assim como, na primeira, segunda e terceira semana após a fase de indução da quimioterapia. Realizaram uma avaliação qualitativa com base na aparência clínica das lesões. As complicações registradas foram ulcerações, petéquias, equimoses, eritema, sangramento gengival, xerostomia, candidíase, herpes simples, palidez das mucosas e infiltração leucêmica gengival. O teste qui-quadrado (nível de 5% de significância) foi utilizado considerando-se como a hipótese nula (H₀) que a proporção de pacientes que apresentam alterações não depende do protocolo utilizado. A frequência de cada

alteração observada para os dois protocolos durante o período de estudo foi registrada. Como resultados, a comparação dos dois protocolos de quimioterapia não revelou nenhuma diferença significativa na primeira, segunda ou terceira semana (teste de qui-quadrado, $p = 0,65$ para a primeira semana e $p = 1,00$ para a segunda e terceira semana). O presente estudo demonstrou que os agentes quimioterápicos causam alterações relevantes na cavidade bucal dos pacientes com leucemia, independentemente do protocolo utilizado, e que essas complicações são mais frequentes imediatamente após a administração dos fármacos, com um declínio gradual através das seguintes duas semanas, porém sugerem mais estudos para avaliar o efeito a longo prazo desta terapia na cavidade bucal destes pacientes.

Morais e colaboradores (2014) realizaram uma revisão sistemática da literatura sobre as complicações bucais secundárias à quimioterapia realizada em crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda (LLA). Foi realizada uma busca sistemática de artigos publicados entre janeiro de 1992 e abril de 2013 nas bases de dados Pubmed/Medline, Science Direct, Scielo e Scopus. Foram selecionados estudos que tiveram como população-alvo crianças de 2 e 18 anos, portadoras de LLA e que avaliaram as complicações do tratamento antineoplásico na cavidade bucal. Após análise dos avaliadores, 18 estudos foram selecionados primariamente para participar da revisão sistemática. Após análise completa dos estudos, apenas 8 preencheram todos os critérios de inclusão. A amostra dos participantes oscilou entre 17 e 156 crianças, sendo o tamanho da amostra total de 472 crianças com idade variando entre 2 e 18 anos. A maioria dos autores não estabeleceram relação entre sexo e a frequência de manifestações orais e alguns não avaliaram seus pacientes de acordo com o sexo. Em todos os estudos, o exame intrabucal foi usado para estabelecer o diagnóstico das lesões bucais durante o tratamento

quimioterápico, dentre estes, apenas um relatou a realização do exame clínico intrabucal antes do início da quimioterapia. Seis artigos citaram as drogas utilizadas durante a quimioterapia, mas não estabeleceram correlação entre as complicações bucais e tipo de drogas utilizadas. Para os autores, as manifestações bucais são mais comuns na fase de indução. As lesões bucais mais frequentes foram mucosite, candidíase, periodontite e gengivite. Os locais mais acometidos foram a mucosa bucal e labial. A prevalência dessas manifestações bucais estava relacionada à má higienização bucal dos pacientes. A clorexidina demonstrou ser um agente de efeitos benéficos na diminuição das manifestações bucais e o uso profilático reduz a frequência da mucosite bucal e patógenos orais. A principal complicação bucal foi ulceração e estava associado ao baixo número de neutrófilos. Um estudo observou que a presença do HSV-1 e *Candida* spp. estava associada ao aumento da severidade da mucosite nas crianças com LLA. Os autores concluíram que a condição de saúde bucal dos portadores de LLA varia de acordo com um conjunto de fatores.

2.4 Agentes fúngicos e bacterianos envolvidos na mucosite bucal

A cavidade bucal é intensamente colonizada por bactérias, em que sua concentração máxima se encontra no biofilme dental, embora também haja abundantemente sobre o dorso da língua, palato e gengivas. Os microorganismos mais abundantes são os estreptococos do grupo *viridans*, *mitis*, *sanguis*, *salivarius*, etc. O rompimento da integridade da mucosa bucal, ocasionado por lesões ulceradas, resulta na penetração de microorganismos para a corrente sanguínea. Esses microorganismos podem ser identificados no sangue através de hemoculturas.

Essa bacteremia pode ser a causa de numerosos processos, dentre os quais, abscessos distantes, danos renais, endocardite infecciosa (POVEDA-RODA et al., 2008).

Os pacientes em tratamento quimioterápico para leucemia linfoblástica aguda, principalmente aqueles submetidos a transplante da medula óssea podem apresentar infecções fúngicas e bacterianas como ocorrências comuns (BROWN & WINGARD, 2004). Esses pacientes têm uma tendência a septicemia derivada da cavidade bucal devido ao seu tratamento de quimioterapia mieloablativo para o transplante de células-tronco hematopoéticas (ANTUNES et al., 2010).

Dentre as infecções bacterianas, cerca de 25% a 50% dos casos de septicemia nos pacientes com neutropenia são em decorrência de bactérias gram negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria spp.*, e *Escherichia coli*. Já as bactérias gram-positivas que podem causar infecções locais e sistêmicas em potencial nestes pacientes, têm-se *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans* e espécies *Enterococcus spp* (BROWN & WINGARD, 2004).

Os produtos da parede celular das bactérias como os antígenos da parede celular e lipopolissacarídeos, podem penetrar a submucosa rica em macrófagos e estimular a secreção de citocinas pró-inflamatórias, intensificando o processo inflamatório da mucosite bucal. Nos pacientes granulocitopênicos, há um risco de que bactérias intactas possam invadir vasos submucosos e produzir bacteremia ou sepse (SONIS, 2009). Complicações graves podem atrasar o tratamento, aumentar as hospitalizações e os custos médicos, bem como atrasar o término do tratamento (SADASIVAN, 2010).

A candidíase bucal é uma entidade nosológica frequente da cavidade bucal causada pela ação patogênica da *Candida spp.*, em que os tecidos bucais ficam

suscetíveis a esses agentes em decorrência de fatores, como por exemplo, xerostomia, radioterapia na região maxilofacial e quimioterapia (GONZÁLEZ GRAVINA et al., 2007).

A infecção por cândida é comumente causada pela *Candida albicans* por se tratar de um microrganismo residente na pele e mucosa bucal. A mucosa bucal saudável e íntegra atua como defesa do hospedeiro contra esse patógeno, no entanto, esses fungos podem causar infecções locais e sistêmicas nos pacientes com neutropenia e úlceras provocadas por radiação ou quimioterapia, aumentando a morbidade e mortalidade destes. Além disso, o uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, corticosteroides e substâncias citostáticas durante a neutropenia, associado a xerostomia e hospitalização prolongada, pode criar um ambiente favorável ao crescimento desses fungos (BROWN & WINGARD, 2004; GONZÁLEZ GRAVINA et al., 2007).

Esses agentes fúngicos existentes na cavidade bucal podem infectar as vias digestivas disseminando-se através da circulação, podendo desenvolver um quadro de infecção sistêmica fatal para o paciente, cujo algumas espécies, entre as quais *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. Dubliniensis*, têm se demonstrado resistente a certos medicamentos antifúngicos (GONZÁLEZ GRAVINA et al., 2007).

Epstein, Hancock, Nantel (2003) analisaram a relação da colonização bucal pela espécie Cândida e evolução do paciente, incluindo uma avaliação de infecção sistêmica, mortalidade, potencial relação com a mucosite bucal, bem como o impacto do tratamento antifúngico em uma população de receptores de transplante de células hematopoiéticas. Avaliaram registros de 115 pacientes consecutivos no período de janeiro de 1995 a dezembro de 1996. Todos os pacientes tinham avaliações bucais prospectivas antes do transplante e semanais durante a

internação até 4 semanas após o transplante ou alta, ou até morte. Os pacientes foram instruídos a continuar os regulares métodos de higiene e instruídos a fazer enxágue com 5 a 15 mL de digluconato de clorexidina (0,2%) por mais de meio minuto, 4 vezes ao dia. Medicamentos antifúngicos sistêmicos foram fornecidos a todos os pacientes do estudo. Antifúngicos sistêmicos e tópicos foram iniciados durante, ou antes, da infusão de células-tronco (dia 0). Antibióticos de largo espectro foram utilizados nos pacientes, caso tornassem-se febris. A mucosite bucal foi avaliada usando sistema de pontuação do Instituto Nacional do Câncer: grau 1, dor bucal não exigindo uso de narcóticos; grau 2, dor ou ulceração, ou ambos, não necessitando de uso de narcóticos; grau 3, ulceração grave exigindo um analgésico narcótico, grau 4, intubação preventiva ou resultando em pneumonia por aspiração documentado. Os achados clínicos compatíveis com candidíase bucal foram registrados. As amostras para *Cândida* foram obtidas através de coletas da mucosa bucal, região anterior do dorso da língua e de sítios suspeitos usando *swab*, e foram submetidos à rotina de cultura microbiológica com ágar dextrose Sabouraud. A população do estudo consistiu em 115 pacientes (59 homens) entre 19 e 59 anos (média de 39 anos). Seus diagnósticos médicos eram leucemia aguda, 33 (29%); leucemia crônica, 32 (28%), anemia aplástica, 4 (3%); linfoma, 13 (11%); mieloma múltiplo, 13 (11%); doença mieloproliferativa, 15 (13%) e doença de Hodgkin, 5 (4%). Dezesete pacientes receberam transplantes autógenos para o tratamento de sua doença primária, 62 receberam transplantes alogênicos entre irmãos e 36 receberam transplantes de doadores não relacionados. A colonização por espécies de *Cândida* foi identificada em 31% dos pacientes. Cinquenta e seis por cento dos pacientes com colonização tinham evidência clínica de candidíase bucal. A colonização por *Cândida* foi significativamente menor em pacientes em uso de

clorexidina isoladamente, em comparação com aqueles com clorexidina e nistatina juntos ($P < 0,046$). Vinte e cinco pacientes morreram no período pós-transplante imediato, 17 dos quais eram *Cândida* positivo. A duração da internação variou de 15 a 153 dias, o aumento da estadia também foi associado com colonização por *Cândida* ($P = 0,04$). Setenta e quatro por cento de todos os pacientes desenvolveram mucosite ulcerativa. Mucosite mais grave foi observada em doentes submetidos à quimioterapia e radioterapia. Não houve diferença significativa entre a colonização por *Cândida* e a presença ou gravidade da mucosite. Em conclusão, apesar de profilaxia antifúngica sistêmica e tópica, colonização por espécies de *Cândida* da orofaringe foi frequente em pacientes que receberam transplante de células hematopoiéticas. Dos 25 pacientes que morreram logo após o transplante, 92% tiveram mucosite ulcerativa, em comparação com 70% dos que sobreviveram, refletindo a associação da mucosite bucal com a toxicidade do transplante de células hematopoiéticas. Houve uma relação significativa entre transplante alogênico de células hematopoiéticas e autógeno, tempo de permanência, e colonização de *Cândida*. Em pacientes submetidos à profilaxia antifúngica sistêmica, enxágue com clorexidina foi estatisticamente mais eficaz na redução da colonização por *Cândida* quando comparado à associação de clorexidina e nistatina ($P = 0,046$).

Napeñas e colaboradores (2007) realizaram uma revisão sistemática que analisou o papel das mudanças da microbiota bucal no desenvolvimento da mucosite bucal durante a quimioterapia. Os estudos analisados renderam um total de 300 pacientes numa faixa de 10 a 58 pacientes por estudo, com 13 diferentes diagnósticos de câncer. Dezesesseis diferentes quimioterápicos foram utilizados, porém cinco dos estudos não especificaram a quimioterapia utilizada, dentre os quais, os mais frequentes foram o citarabina, vincristina, ciclofosfamida, metotrexato

e doxorrubicina. Foi constatada a utilização de 29 antimicrobianos diferentes, dentre os mais comuns a nistatina, anfotericina e clorexidina. Vários estudos descobriram mudanças qualitativas na microbiota bucal durante a quimioterapia, porém o trabalho concluiu que mais pesquisas são necessárias para determinação da relação entre a microbiota bucal, grau de granulocitopenia e a presença de mucosite em pacientes realizando quimioterapia, o que daria uma melhor compreensão do papel da microbiota bucal e o desenvolvimento e exacerbação da mucosite bucal.

Anirudhan e colaboradores (2008) estudaram a etiologia da mucosite bucal e avaliaram seu potencial nas complicações sistêmicas. Foram incluídos no estudo crianças menores de 15 anos de idade submetidos ao protocolo quimioterápico MCP-841 para tratamento da leucemia linfoblástica aguda e que apresentaram mucosite entre janeiro de 2003 e agosto de 2004. Foram realizadas coletas da lesão e do sangue para avaliação fúngica, bacteriana, herpesvírus humano simples (HSV) e sorologia. 70 pacientes foram elegíveis, com idade média de 4,25 anos (variação: 6 meses a 15 anos). Ocorreram 100 episódios de mucosite, em que 41 foram na fase de indução, 39 na fase de intensificação e 20 na fase de manutenção da quimioterapia. Úlceras foram a apresentação mais comum (70%), seguido por manchas (18%) e vesículas (3%); 11% tinham tanto úlcera quanto manchas. Grau I de mucosite esteve presente em 37%, grau II em 30%, grau III em 23% e grau IV em 10% dos episódios. Neutropenia estava presente em 64% dos episódios e de duração prolongada (> 1 semana) em 33 desses episódios. Não houve diferença significativa nos fatores de risco observados entre mucosite leve e grave; presença de choque séptico mostrou uma tendência significativa na mucosite severa ($P = 0,07$). Trinta e nove organismos fúngicos foram isolados a partir da cavidade bucal em 38 episódios de infecções fúngicas. Não houve fatores predisponentes

significativos para a colonização por fungos por via bucal, no entanto, houve uma alta associação com o uso de esteróides ($P = 0,07$) e presença de hifas fúngicas na urina ($P = 0,06$). Cinco dos seis pacientes com fungemia tinha prolongado neutropenia grave. Apesar do uso de anfotericina B, três pacientes morreram; duas mortes foram causadas por *Candida tropicalis* e uma por *Aspergillus niger*. Culturas de swabs revelaram 28 organismos de 23 episódios de mucosite. Infecção mista estava presente em 5 episódios. Houve quatro mortes em grupo de hemocultura positiva; um paciente com infecção mista devido *Acinetobacter* e *Staphylococcus aureus*; os outros três tiveram sepse bacteriana devido a *Escherichia coli*, *Klebsiella* e enterococos. Nenhuma cultura comprovada nos casos de septicemia demonstrou uma fonte bucal. Elevação de anticorpo para HSV ($> 1: 8$) foi observada em 16 indivíduos; 7 destes pacientes (44%) desenvolveram úlceras bucais recorrentes em comparação com 31% (17/54) no grupo soronegativo HSV ($P = 0,34$). Controles consistiu de 50 crianças < 15 anos de idade internados para várias doenças em enfermaria pediátrica. Apesar de significativo o número de lesões bucais, foram clinicamente compatíveis com infecção herpética e responderam à terapia com aciclovir oral. Houve uma prevalência significativamente maior de sorologia HSV em crianças em quimioterapia. Sendo assim, a obtenção de culturas de lesões bucais é útil na gestão adequada das lesões e, assim, possivelmente previne a disseminação sistêmica.

Soares e colaboradores (2011) avaliaram clinicamente alterações da mucosa bucal e analisaram qualitativamente a microbiota bucal em crianças com leucemia linfoblástica aguda submetidas a quimioterapia antineoplásica e tratamento profilático com clorexidina a 0,12%. Participaram da pesquisa 17 crianças com idades entre 2 e 12 anos, sem preferência por sexo ou raça. Bochechos com

clorexidina a 0,12% foi prescrito aos pacientes duas vezes ao dia, por 1 minuto, após 30 minutos do café da manhã e após a última refeição da noite. A solução de gluconato de clorexidina a 0,12% foi administrada durante 10 dias em todas as fases da quimioterapia. O exame clínico da mucosa bucal foi realizado diariamente durante o período de internação para a quimioterapia para avaliar a presença de mucosite bucal. Foi coletado material da mucosa labial e jugal para análise microbiológica durante a fase de intensificação após o fim do tratamento profilático com clorexidina a 0,12%. Apenas 5 (29,4%) dos 17 pacientes que utilizaram o gluconato de clorexidina a 0,12% desenvolveram mucosite bucal de baixa severidade, acometendo a mucosa jugal em 2 casos, a gengiva em 2 casos, e a língua em 1 caso. Nenhum dos pacientes apresentou mucosite disseminada. Análise microbiológica revelou uma frequência muito baixa de microrganismos potencialmente patogênicos na mucosa bucal dos pacientes. Entre as bactérias gram-positivas, encontrou-se estafilococos coagulase-negativo, e estavam presentes em amostras coletadas a partir de 8 pacientes (47,0%), seguido de *C. albicans* identificados em amostras de 6 pacientes (35,3%). Entre as bactérias gram-negativas, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. maltophilia* foram isoladas em 1 paciente (5,9%) cada. A análise da presença de microrganismos potencialmente patogênicos de acordo com a presença ou ausência da mucosite bucal revelou uma baixa frequência de *E. coli* enteropatogênica, *K. pneumoniae*, *S. maltophilia* em ambos os grupos. Do mesmo modo, os pacientes com mucosa bucal normal e pacientes com mucosite bucal exibiram frequências semelhantes de isolamento de *C. albicans*. Sobre estafilococos coagulase-negativo, os pacientes que apresentaram a mucosite bucal apresentaram uma maior frequência dessas bactérias gram-positivas quando comparados com pacientes com mucosa bucal normal. Em conclusão, os resultados

revelaram uma frequência muito baixa de microrganismos potencialmente patogênicos na mucosa bucal das crianças com leucemia linfoblástica aguda, circunstância esta que pode ser explicada pelo uso profilático de clorexidina em combinação com cuidados de higiene bucal diária. Os pacientes que apresentaram alterações na mucosa bucal apresentaram maior frequência de *Staphylococcus* coagulase-negativo quando comparados com pacientes com mucosa bucal normal, sugerindo uma possível relação entre estes microrganismos e o desenvolvimento da mucosite bucal.

Ye e colaboradores (2013) investigaram a diversidade e relativa abundância de taxa bacteriana da mucosa bucal em pacientes pediátricos com neoplasias malignas comparado com o grupo de referência. Foram incluídos os pacientes da enfermaria pediátrica de câncer do Hospital de Crianças Astrid Lindgren, Hospital Universitário Karolinska, de Estocolmo, na Suécia, com diagnóstico recente de neoplasias (n=109), compreendendo o período de novembro de 2008 a dezembro de 2010. Os pacientes com idade inferior a 4 anos ou acima de 18 anos foram excluídos, bem como protocolo de tratamento que não incluíram fármacos citostáticos e/ou pacientes sem número nacional de registro da população. Dos 60 pacientes que preencheram os critérios de inclusão, 37 concordaram em participar do presente estudo. Dados referentes à idade, sexo e diagnóstico de doenças malignas foram recolhidos. As amostras de mucosa bucal foram coletadas no momento do diagnóstico de malignidade e durante a quimioterapia antes de qualquer sinal de mucosite bucal. Nos casos em que ocorreu mucosite bucal, as amostras foram tomadas a partir da superfície das lesões da mucosite. Todas as amostras foram avaliadas pelos genes do RNA ribossômico 16S por método de sequenciamento. Os parâmetros clínicos dos pacientes no momento do diagnóstico

de malignidade foram comparados aos parâmetros de um grupo de referência. Não houve diferença significativa em relação às características clínicas, em termos da idade, sexo ou condição de saúde bucal entre os pacientes. A diversidade da comunidade bacteriana total foi menor e uma variabilidade inter-individual maior ($p < 0,001$) nos pacientes no momento do diagnóstico de malignidade em comparação com os indivíduos de referência. Os dados clínicos e da composição bacteriana no momento do diagnóstico de malignidade, foram comparados entre os pacientes que desenvolveram mucosite bucal àqueles que não desenvolveram, demonstrando um total de diversidade microbiana, significativamente maior ($p < 0,05$) nos pacientes que mais tarde desenvolveram mucosite em comparação com aqueles que não desenvolveram. A alteração da composição bacteriana durante quimioterapia foi mais pronunciado em pacientes que posteriormente desenvolveram mucosite do que aqueles sem mucosite ($p < 0,01$). A análise mostrou que pacientes que desenvolveram mucosite se apresentaram com níveis mais elevados dos filos Fusobactérias e Espiroquetas em comparação com aqueles que não desenvolveram mucosite. Concluindo, foi encontrada uma diversidade microbiana superior no momento do diagnóstico de malignidade em pacientes que desenvolveram mucosite bucal e que estes pacientes tinham uma modificação mais significativa da comunidade bacteriana pela quimioterapia antes da ocorrência de mucosite.

2.5 Herpesvírus Humano (HHV)

Os agentes infecciosos da família do herpesvírus humano podem estar presentes na microbiota bucal humana, sendo capazes de estabelecer quadros infecciosos ao longo da vida do hospedeiro humano, por apresentarem como característica a capacidade de permanecer em um estado de latência da infecção com baixos níveis de expressão dos genes virais (DREYFUS, 2013). Apenas alguns tipos infectam a espécie humana, ocorrendo de acordo com as células-alvo que acometem (MENDONÇA, 2008).

Com base em algumas diferenças biológicas e clínicas principais, os herpesvírus humano estão classificados em três subfamílias, *α-herpesviridae*, *β-herpesviridae*, *γ-herpesviridae*. As subdivisões explicitadas no quadro 4 a seguir, representam os tipos de HHV que infectam a espécie humana, de acordo com as células-alvo que acometem e a localização que permanecem durante seu estado de latência.

Quadro 4: Subdivisão da família *Herpesviridae*, células-alvo que acometem e localização do estado de latência.

| NOME | TIPO | SUBFAMÍLIA | CÉLULAS-ALVO | LOCALIZAÇÃO EM ESTADO DE LATÊNCIA |
|---|------|------------------------------------|--|--|
| <i>Herpes simplex 1 (HSV-1)</i> | 1 | <i>α- Herpesviridae</i> | Células mucoepiteliais | Neurônio |
| <i>Herpes simplex 2 (HSV-2)</i> | 2 | | Células mucoepiteliais | Neurônio |
| <i>Varicella Zoster virus (VZV)</i> | 3 | | Células mucoepiteliais | Neurônio |
| <i>Epstein-Barr virus (EBV)</i> | 4 | <i>γ- Herpesviridae</i> | Linfócitos B e células epiteliais | Linfócitos B |
| <i>Cytomegalovirus (CMV)</i> | 5 | <i>β- Herpesviridae</i> | Células epiteliais, monócitos e linfócitos | Monócitos, linfócitos e possivelmente outras células |
| <i>Herpes lymphotropic virus</i> | 6 | | Linfócito T e outras células | Linfócito T e outras células |
| <i>Human herpes virus-7 (HHV-7)</i> | 7 | | Linfócito T e outras células | Linfócito T e outras células |
| <i>Human herpes virus-8 (HHV-8) Sarcoma de Kaposi associado ao herpes virus (KSHV)</i> | 8 | <i>γ- Herpesviridae</i> | Células endoteliais | Desconhecida |

Fonte: Adaptado de MENDONÇA, 2008.

2.5.1 HSV

O HSV é um DNA-vírus que mede aproximadamente 200 nm de diâmetro e contém um filamento linear de ácido desoxirribonucleico em dupla hélice, envolvido num capsídeo icosaédrico composto de 162 capsômeros. O nucleocapsídeo (conjunto genoma e capsídeo) é coberto por um tegumento, na qual este é envolvido por um envelope que contém glicoproteínas (SPEAR, 2004).

Apresenta dois sorotipos semelhantes na sua sequência, contudo antigenicamente distintos, são eles o HSV-1 e HSV-2. Embora o HSV-1 e HSV-2 possam infectar tanto regiões bucais quanto genitais, o HSV-1 dissemina mais frequentemente através da saliva infectada ou lesões orais ativas, enquanto o HSV-2 é normalmente caracterizado como uma doença sexualmente transmissível, afetando principalmente as regiões genitais (FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007; ARDUINO & PORTER, 2008).

Usualmente, a infecção primária do HSV-1 afeta crianças entre 2 a 10 anos de idade, podendo afetar recém-nascidos e ser adiada até a adolescência. O período de incubação varia de 1 a 26 dias, com média de 6 a 8 dias (BUSTAMANTE & WADE, 1991). As manifestações clínicas mais frequentes na infecção primária são a gengivoestomatite herpética aguda e faringotonsilite. O quadro é caracterizado pelo aparecimento de inúmeras vesículas que eclodem rapidamente, formando pequenas lesões avermelhadas que evoluem desenvolvendo regiões centrais ulceradas. A coalescência destas lesões as torna maiores e mais dolorosas. As regiões que podem ser comprometidas são o palato duro, mole, gengiva, língua, lábios e rosto, associado à faringotonsilite ulcerativa e exsudativa. Febre, mal estar, linfadenopatia cervical, disfagia, anorexia e mialgia podem estar presentes

(BUSTAMANTE & WADE, 1991; FATAHZADEH & SCHWARTZ, 2007; ARDUINO & PORTER, 2008).

Após a infecção primária, o HSV-1 permanece latente no gânglio trigeminal e a reativação clínica pode ocorrer de forma espontânea ou provocada por fatores como febre, estresse, fadiga, trauma, terapia oncológica, entre outros, porém de forma mais branda (ARDUINO & PORTER, 2008).

A infecção pelo HSV-2 pode se manifestar através de bolhas, úlceras ou crostas na área genital, nádegas, ou ambos. Os pacientes podem relatar uma sintomatologia semelhante a gripe, como cefaleia, febre e linfadenopatia. Outros sintomas como disúria, retenção urinária, corrimento vaginal ou peniana, coceira genital, ardor ou formigamento e sensibilidade virilha podem estar presentes. As lesões genitais podem variar em número, com sintomatologia dolorosa, e se não tratadas podem persistir por até 21 dias (SCHLEISS, 2009).

Há estudos que sugerem que a presença do HSV-1 desempenha um papel importante e pode estar relacionado à severidade da mucosite bucal induzida por quimioterapia em pacientes com neoplasias hematológicas (CHEN et al., 2011; RÜPING et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012). A reativação do HSV bucal é extremamente frequente em pacientes com câncer, tanto os com mucosite, bem como os sem (DJURIC et al., 2009).

Nestes pacientes, as infecções pelo HSV tendem a ser mais recorrentes, duradouras e graves. Os pacientes podem apresentar múltiplas úlceras mucocutâneas, afetando as regiões nasolabial, orofaríngeo e genitais, com persistência de semanas ou meses, morbidade significativa e maior risco de infecções por bactérias e fungos (BUSTAMANTE & WADE, 1991; DJURIC et al., 2009).

Djuric e colaboradores (2009) avaliaram a prevalência da reativação do HSV usando diferentes técnicas (isolamento do vírus na cultura de células, detecção de anticorpos vírus-específico, antígenos virais e o ácido nucleico viral), e avaliaram o seu papel em potencial na ocorrência de danos na mucosa bucal em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. Os pacientes foram tratados com diferentes protocolos quimioterápicos dependendo do tipo de malignidade. Nenhum deles estava tomando agentes antivirais no momento do estudo. Os resultados do estudo concluíram que a reativação ocorre independentemente do quimioterápico. O HSV foi encontrado tanto em pacientes com mucosite, bem como sem.

Chen e colaboradores (2011) avaliaram as influências da candidíase bucal e vírus do herpes simples (HSV-1) nas infecções de mucosite bucal quimioterapicamente induzida. Dentre os 467 episódios de mucosite bucal com as duas culturas disponíveis, 221 não estavam infectados (47,3%) e 246 estavam relacionados a infecções fúngicas, por HSV-1, ou ambos (52,7%); dos 246 episódios, 102 estavam associados com infecções fúngicas isoladas (21,8%), 98 com infecções isoladas por HSV-1 (21%) e 46 com ambas as infecções (9,9%). Além disso, o estudo demonstrou o impacto da prévia terapia antifúngica sobre o risco de HSV-1 na mucosite bucal, pois os pacientes que receberam agentes antifúngicos anteriores à ocorrência da mucosite tiveram mais probabilidade de ter uma infecção por HSV-1. Em conclusão, os resultados sugeriram que a *Candida* spp. e o HSV-1 desempenham um papel importante na mucosite bucal e é fundamental a realização de culturas de esfregaço tanto para fungos quanto para HSV-1 na ocorrência de mucosite após quimioterapia. Infecção por HSV-1 deve ser considerado no diagnóstico diferencial da mucosite bucal.

Mendonça e colaboradores (2012) avaliaram prospectivamente a associação do HSV-1, *Candida* spp., e as bactérias orais sobre a severidade da mucosite bucal em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda tratados de acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI LLA-99). Todos os pacientes, independente do risco do grupo, receberam um regime de indução de 4 semanas, incluindo prednisona, vincristina, doxorrubicina, L-asparaginase, e metotrexato intratecal, ara-C e dexametasona (MADIT). Não houve tratamento profilático para quaisquer pacientes para fungos ou vírus. A investigação para presença de diferentes espécies do HSV foi realizada utilizando um iniciador de PCR. O tempo médio para início da mucosite foi de $6,8 \pm 3,9$ dias e começou a melhorar a partir de 9 dias. A maioria dos casos positivos para herpes foram identificados como tendo HSV-1. No 14º dia foi encontrada uma associação significativa entre a severidade da mucosite e a presença de HSV ($p=0,0347$) e *Candida* spp. ($p=0,0078$). No 56º foi encontrada uma associação significativa entre a severidade da mucosite e a presença de HSV sobre o 14º dia ($P < 0,0001$) e presença do HSV ($p = 0,0317$). Com estes resultados concluiu-se que, a presença de HSV e *Candida* spp. nos dias 14 e 56 de tratamento está associado ao aumento da severidade da mucosite em crianças e adolescentes com LLA.

Aggarwal e colaboradores (2014) estudaram a detecção do HSV-1 e 2 através da sorologia (ELISA), PCR convencional e PCR em tempo real, em lesões bucais de crianças com idade inferior a 14 anos em quimioterapia para neoplasia maligna. Os pacientes submetidos a transplante de células-tronco foram excluídos. A gravidade da mucosite foi classificada baseada nas características clínicas, através da escala de toxicidade oral do Instituto Nacional do Câncer. Crianças assintomáticas foram incluídas como controles. Um esfregaço foi obtido através de *swab* a partir da lesão

bucal nos casos, e nos controles as células da mucosa bucal foram adquiridas utilizando-se espátula de madeira. Uma amostra de sangue (1,5 ml) foi recolhida nos casos, bem como controles; O DNA foi submetido a PCR utilizando iniciadores de sequência específica para o HSV-1 e 2, e por PCR quantitativo em tempo real com sondas TaqMan. Anticorpos séricos para HSV (IgG e IgM) foram estimados por ELISA, porém a técnica não diferencia entre o HSV-1 e 2. Trinta e sete pacientes casos e 30 controles foram recrutados. Os resultados não estavam disponíveis em cinco pacientes devido a uma amostra abaixo do ideal. A média de idade dos casos e controles foi de $6,3 \pm 3,4$ e $7,5 \pm 3,5$ anos, respectivamente ($p = 0,17$). A proporção M: F na casos e controles foi de 3,6:1 e 1:1, respectivamente. O diagnóstico primário incluiu a leucemia linfoblástica aguda (ALL) (22; 69%), 4 (12,5%) com leucemia mielóide aguda e linfoma não-Hodgkin, e 1 (3%) com linfoma de Burkitt e tumor de Wilms. Classificação clínica e funcional da mucosite foi de grau 3 ou 4 em 21 (65,6%) e 15 (46%) casos, respectivamente. Todos os pacientes foram internados com neutropenia e febris, exceto dois. Nenhum paciente estava fazendo uso de medicamentos antivirais no ato da matrícula. Os resultados comparativos entre ELISA e PCR qualitativo e quantitativo demonstraram ELISA-Ig M negativo em todos os casos, bem como controles. O ELISA-Ig G foi positivo em 11 (34%) casos e 9 (30%) dos controles ($p = 1,0$). PCR qualitativo para HSV-1 detectou o vírus em oito (25%) casos e nenhum controle ($p = 0,009$). Com PCR em tempo real quantitativo, HSV-1 foi detectado em 21 (66%) casos e 3 (10%) controles ($p = 0,0026$). PCR em tempo real quantitativo foi capaz de detectar o HSV-1 em maior número de pacientes, em comparação com PCR qualitativo ($p = 0,04$). HSV-2 não foi detectado em qualquer caso ou controle com PCR qualitativo. PCR em tempo real identificou HSV-2 em 22 (69%) casos e nenhum controle ($p < 0,0001$). Houve 17 (53%)

pacientes que tinham tanto o HSV-1 quanto o 2, conforme detectado por PCR quantitativo. Em pacientes, a carga viral média de HSV-1 foi maior que o HSV-2, embora não significativo ($p = 0,11$). Crianças maiores de 3 anos apresentaram maior prevalência (76%) de HSV-1 por PCR quantitativo em comparação com as crianças mais jovens (28,6%), embora esta também não tenha sido uma taxa significativa ($p = 0,3$). Não houve associação da prevalência de HSV-2 com a idade. Não houve correlação entre a gravidade da mucosite com o HSV. O estudo confirmou a alta (66%) prevalência do HSV-1 em mucosite bucal em crianças que receberam quimioterapia para o câncer. Não houve associação de HSV-1 com a gravidade da mucosite ou idade. PCR em tempo real quantitativo foi capaz de demonstrar uma prevalência significativamente maior (66%) de HSV-1 em comparação com PCR qualitativo (25%). A sorologia foi ineficaz como uma ferramenta de diagnóstico. PCR em tempo real quantitativo demonstrou uma elevada (69%) prevalência de HSV-2 bem como mucosite bucal na população susceptível. A carga de HSV-2 foi baixa, e nenhum dos casos foram identificados por PCR qualitativo. de HSV-2 foi baixa, e nenhum dos casos foram identificados por PCR qualitativo.

2.5.2 EBV e CMV

O EBV está presente em cerca de 90% da população mundial e apresenta tropismo por linfócitos B e células epiteliais (BRAS-SILVA, 2009). Sua transmissão ocorre de indivíduo a indivíduo, principalmente através da saliva, podendo desencadear a mononucleose infecciosa, carcinoma nasofaríngeo e leucoplasia pilosa oral. Está associado com vários tipos de doenças malignas epiteliais e linfoides, e na patogênese de tipos avançados da doença periodontal (LYNCH,

2000; SLOTS et al., 2006; CHEN et al., 2015). Atualmente, há relatos que pacientes com Síndrome de Sjögren tem exibido taxas de antívirus de EBV mais elevadas quando comparados a pacientes saudáveis (TINCANI et al., 2013).

O EBV infecta várias linhas celulares, incluindo linfócitos B e T e células epiteliais escamosas da orofaringe e da mucosa nasofaríngea. O vírus estabelece latência em linfócitos B e pode ser reativado em estados de imunodeficiência (BRUCE; ROGERS, 2004).

A mononucleose infecciosa está associada com achados inespecíficos, como petéquia palatal, eritema faríngeo e hipertrofia das tonsilas, entretanto, essas manifestações não confirmam o diagnóstico de infecção por EBV por estarem presentes em outras infecções do trato respiratório superior, contudo, a infecção por EBV pode produzir uma "síndrome de febre glandular" com lesões triviais bucais ou úlceras bucais sobre a orofaringe, febre, linfadenopatia e erupção cutânea morbiliforme, sendo esta última mais comum na infecção na infância (BRUCE; ROGERS, 2004).

A infecção primária por EBV pode ser uma ameaça para os pacientes que receberam transplante de medula óssea ou transplante de órgãos, ou estão em tratamento imunossupressor por outras razões (SCHUSTER; KRETH, 1992).

O CMV pode acometer até 99% da população adulta dependendo da etnia e condições socioeconômicas. Nos países desenvolvidos, a soroprevalência da CMV pode ser bem abaixo de 50% em adultos jovens de nível socioeconômico superior (SCHLEISS, 2009).

A transmissão da infecção por CMV pode ocorrer durante toda a vida, principalmente através do contato com secreções infectadas. As infecções por CMV em recém-nascidos são comuns e ocorrem frequentemente de maneira subclínica,

podendo estar associadas ao retardo mental, surdez e problemas de desenvolvimento em crianças (SCHLEISS, 2009).

Os sintomas característicos da infecção por CMV são febre e mal-estar grave, com a presença de linfocitose atípica, também presentes na infecção por EBV, dificultando o diagnóstico clínico entre os vírus, contudo, a infecção por CMV apresenta um quadro mais brando de faringite e esplenomegalia (SCHLEISS, 2009).

A persistência do vírus ao longo da vida através de períodos de latência e intermitentes reativações e replicações virais, associada ao grande proteoma extraordinário e a extensa manipulação da imunidade adaptativa e inata, faz o CMV apresentar um alto perfil para envolvimento em doenças autoimunes, tornando-o também, um grande risco para infecções oportunistas severas em pacientes transplantados, imunossuprimidos e infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida humana, muitas vezes ocasionando o óbito (EPSTEIN; SHERLOCK; WOLBER, 1993; SCHLEISS, 2009; HALENIUS; HENGEL, 2014).

Dada a frequência e as causas múltiplas de lesões bucais em pacientes imunocomprometidos, a vigilância da cavidade bucal adicionada a utilização dos avanços recentes na tecnologia para detecção do CMV, favorece o diagnóstico específico e reduz o inadequado tratamento empírico desta patologia (EPSTEIN; SHERLOCK; WOLBER, 1993).

Ogata e colaboradores (2011) utilizaram reação em cadeia polimerase (PCR) para detectar genomas de DNA viral no plasma para avaliar especificamente a epidemiologia e cinética do CMV, HHV-6 e reativação do EBV em doentes que receberam tratamento quimioterápico para leucemia de células T. Trinta e quatro pacientes internados e que preencheram os critérios foram incluídos neste estudo. Foram coletadas amostras de sangue para monitorizar o DNA viral logo após o início

da quimioterapia e durante o período em que estavam hospitalizados para a quimioterapia com intervalos de 7 a 14 dias. Reativação do vírus foi definida como a detecção do DNA viral na amostra do plasma e com duração da reativação definida como o período de resultados positivos consecutivos. A taxa cumulativa global do resultado positivo para CMV no plasma em 100 dias após o início da quimioterapia foi de 50,6%. A análise univariada revelou que a maior contagem de glóbulos brancos e contagem de células anormais no momento do diagnóstico estavam associados com reativação do CMV. Já a taxa global cumulativa de um resultado positivo para o HHV-6 numa amostra de plasma foi de 52,3% em 100 dias após o início da quimioterapia. Nenhuma variável no momento do diagnóstico foi identificada como um fator de risco associado com a reativação do HHV-6. A duração em semanas dos testes para DNA positivos para HHV-6 em pacientes individuais tenderam a ser mais curtas quando comparada com o teste para DNA positivo para CMV, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($P = 0,11$, teste de Mann-Whitney). A taxa global cumulativa de um resultado positivo para o teste de DNA de EBV numa amostra de plasma foi de 21,6% em 100 dias após o início da quimioterapia. Nenhuma variável no momento do diagnóstico foi identificada como um fator de risco associado a reativação do EBV. Cinco pacientes tinham DNA do EBV na amostra de plasma colhidas dentro dos primeiros 7 dias de tratamento, e a probabilidade de incidência da reativação do EBV dentro dos primeiros 7 dias de tratamento foi de 14,7%. A duração em semanas dos testes para DNA de EBV-positivos nos pacientes individuais foi significativamente menor que os testes para DNA de CMV positivos ($P = 0,02$, teste de Mann-Whitney), mas não foi significativamente diferente dos testes positivos de DNA de HHV-6 ($P = 0,18$). Este estudo mostrou que o CMV, HHV-6, e a reativação do EBV era comum em pacientes

com leucemia das células T submetidos à quimioterapia citotóxica. A monitorização da rotina da reativação do CMV pode ser útil para a detecção precoce de doenças relacionadas com o CMV. Os ensaios clínicos de plasma-CMV-guiada por DNA, abordagens preventivas contra doenças relacionadas com o CMV são garantidos. Em contraste, a utilidade prática de monitoração para o HHV-6 ou EBV não são evidentes, com base nos resultados deste estudo.

Morales-Sánchez e colaboradores (2014) avaliaram se o EBV, CMV, HHV6 e HHV7 estavam envolvidos na gênese da leucemia linfoblástica aguda das células B e T na infância. Amostras da medula óssea foram testadas por PCR *nested*. Observou-se que menos de 20% das amostras foram positivas por pelo menos um dos vírus testados. Amostras positivas apresentaram baixos níveis de infecção, assim, os resultados sugeriram que o EBV, CMV, HHV6 e HHV7 não estão envolvidos na gênese da LLA nas crianças mexicanas. Uma análise mais aprofundada das amostras positivas não mostrou associação entre as infecções detectadas ou co-infecções e prognóstico. Os estudos em busca dos agentes infecciosos foram realizados individualmente, testando amostras por meio de técnicas convencionais de biologia molecular. Os autores afirmam que futuras investigações devem usar tecnologias de sequenciamento de nova geração, para promoção de sequenciamento do DNA em plataformas capazes de gerar informações sobre milhares de pares de base em única corrida, e análise de bioinformática que são mais capazes de detectar o espectro completo de vírus.

Chen e colaboradores (2015) analisaram um total de 1.411 amostras de soro para avaliar a soroprevalência de EBV em 2007, em Taiwan. As amostras foram coletadas durante um inquérito soropidemiológico de doenças evitáveis por vacinação. Foram obtidos dados demográficos de saúde e pessoais por meio de

questionários e realizado o ELISA para detecção de anticorpos anti-Ig G do capsídeo viral do EBV nos soros. Das 1411 amostras, 830 e 581 eram do sexo feminino e masculino, respectivamente. Entre eles, 199 indivíduos (14%) residiam na zona rural e 878 (62%) e 476 (34%) eram do norte e do sul de Taiwan. A taxa de soropositividade ponderada global de EBV foi de 88,5%. A taxa de soropositiva de EBV atingiu 52,8% em crianças de dois anos, rapidamente subiu para 88,7% na faixa etária de 5-7 anos e 93,0% para aqueles com idade entre 14-16 anos. A taxa de soropositivos aumentou significativamente com a idade ($P < 0,0001$). Durante a idade adulta, a taxa de soropositivos EBV aumentou lentamente para mais de 95% até a velhice. O nível de escolaridade mais elevado também foi responsável pela taxa de soropositividade para EBV. Embora o gênero não tenha sido um fator de risco significativo para a taxa de soropositivos, as mulheres tiveram um nível de anticorpos relativamente mais elevado que os homens (teste t de Student $P = 0,0348$). Os moradores das regiões rurais tiveram uma taxa levemente superior que aqueles das regiões urbanas, mas o odds ratio ajustado para a taxa de soropositivos EBV não foi estatisticamente significativa. O estudo concluiu que a taxa de soropositividade para EBV aumentou de 23% a 0 anos de idade a 53% em 2 anos de idade. Com a ameaça de mononucleose infecciosa associada a infecção aguda do EBV na infância e a associação com certas malignidades em adultos, as estratégias de prevenção, como a educação para a higiene, e o desenvolvimento de uma vacina eficaz, são necessárias para reduzir a alta taxa de infecção na população suscetível em Taiwan.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a microbiota bucal de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA, submetidos a tratamento quimioterápico no HEMOAM, de acordo com o protocolo GBTLI LLA – 2009.

3.2 Específicos

- Analisar a expressão de membros da família do HHV (HSV-1, HSV-2, EBV e CMV) em esfregaços da mucosa bucal de pacientes com LLA;
- Verificar a presença de agentes fúngicos e bacterianos em lesões na cavidade bucal de pacientes com LLA;

4 PACIENTES E MÉTODOS

Esta pesquisa envolveu a avaliação ambulatorial dos pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA que iniciaram o tratamento segundo o protocolo GBTLI LLA-2009. Foi realizada a análise de células da mucosa bucal dos pacientes incluídos no estudo para avaliação da presença dos vírus HSV-1, HSV-2, EBV e CMV por meio de PCR convencional independente da presença ou não da mucosite bucal, ao passo que a avaliação de agentes fúngicos e bacterianos ocorreu somente na presença de lesões bucais por meio de esfregaços.

4.1 Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto teve aprovação no **Comitê de Ética em Pesquisa** com seres humanos da Universidade Federal do Amazonas e Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) com o protocolo CAAE nº 30934514.9.0000.5020 (Anexos A e B). Segue Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo do Assentimento Livre Esclarecido do Menor a serem utilizados (Apêndice A e B).

4.2 Desenho do estudo

Tratou-se de um caso-controle, descritivo, prospectivo, em que um grupo de pacientes pediátricos com LLA foi comparado quanto a exposição de fatores ao grupo controle composto de indivíduos semelhantes, porém sem a doença.

4.3 População do estudo

Participaram do presente estudo, 9 pacientes diagnosticados com Leucemia Linfoblástica Aguda, com idade entre 2 e 14 anos, de ambos os sexos, que iniciaram tratamento quimioterápico segundo o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI LLA-2009). Os pacientes foram incluídos no período de setembro a novembro de 2014 e seguidos até janeiro de 2015, na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), localizada na Avenida Constantino Nery, Nº 4397, Manaus, Amazonas. Adicionalmente, foram avaliados 3 pacientes-controles, livres da doença de base, de ambos os sexos, com idade entre 1 e 4 anos.

4.4 Critérios de Inclusão

- Pacientes com diagnóstico de LLA de ambos os sexos de 1 a 18 anos de idade.
- Pacientes que iniciaram o tratamento quimioterápico na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas de acordo com o protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI LLA-2009).
- Pacientes em fase inicial de tratamento quimioterápico

4.5 Critérios de Exclusão

- Pacientes apresentando prontuários preenchidos de forma inadequada e dados insuficientes.
- Pacientes com Síndrome de Down.

4.6 Procedimentos da pesquisa clínica

Todos os pacientes do estudo apresentaram diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda e iniciaram o tratamento quimioterápico, de acordo com o protocolo GBTLI LLA-2009. Estes pacientes deram entrada na instituição pelo serviço de triagem, e após a avaliação inicial com suspeita de neoplasia, foram encaminhados ao médico hematologista que realizou os exames necessários para o fechamento do diagnóstico, dia 0 (D0), determinando o início dos esquemas terapêuticos com suas subseqüentes fases.

Após a admissão do paciente pelo serviço de internação do HEMOAM para o início do seu tratamento, dia 1 (D1), foi realizada uma avaliação do paciente, observando aspectos da cavidade bucal e regiões anexas, seguindo um padrão de atendimento adotado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM), a fim de avaliar qualquer alteração inicial nestes tecidos, na qual estas observações foram anotadas numa ficha de preenchimento adaptada da FAO/UFAM (Apêndice C). Subseqüente a avaliação, foi realizada a coleta do material da mucosa bucal para pesquisa dos vírus da família HHV, com o auxílio de escova ginecológica estéril (Kolplast® Comercial Industrial do Brasil Ltda), ao passo que a avaliação de agentes fúngicos e bacterianos foi planejada somente em situações que apresentassem lesões visíveis, com a utilização de *swab* esterilizado para coleta e transporte de amostras com meio de cultura Stuart (Labor Import Comercial), conforme explicitado nos itens 4.6.2 e 4.6.8, respectivamente.

Dado início ao tratamento quimioterápico, as coletas da mucosa bucal foram realizadas continuamente durante a prefase e indução, e fase de consolidação, proporcionando uma avaliação pontual e dinâmica do paciente desde a sua

admissão, bem como verificando a possível presença do vírus da família HHV nessas diferentes fases. Paralelamente, ocorria a avaliação da mucosa bucal seguindo o protocolo FAO/UFAM e investigação da mucosite nos pacientes.

As etapas das avaliações clínicas, coletas do material e análise laboratorial estão representadas no fluxograma abaixo (Figura 1).

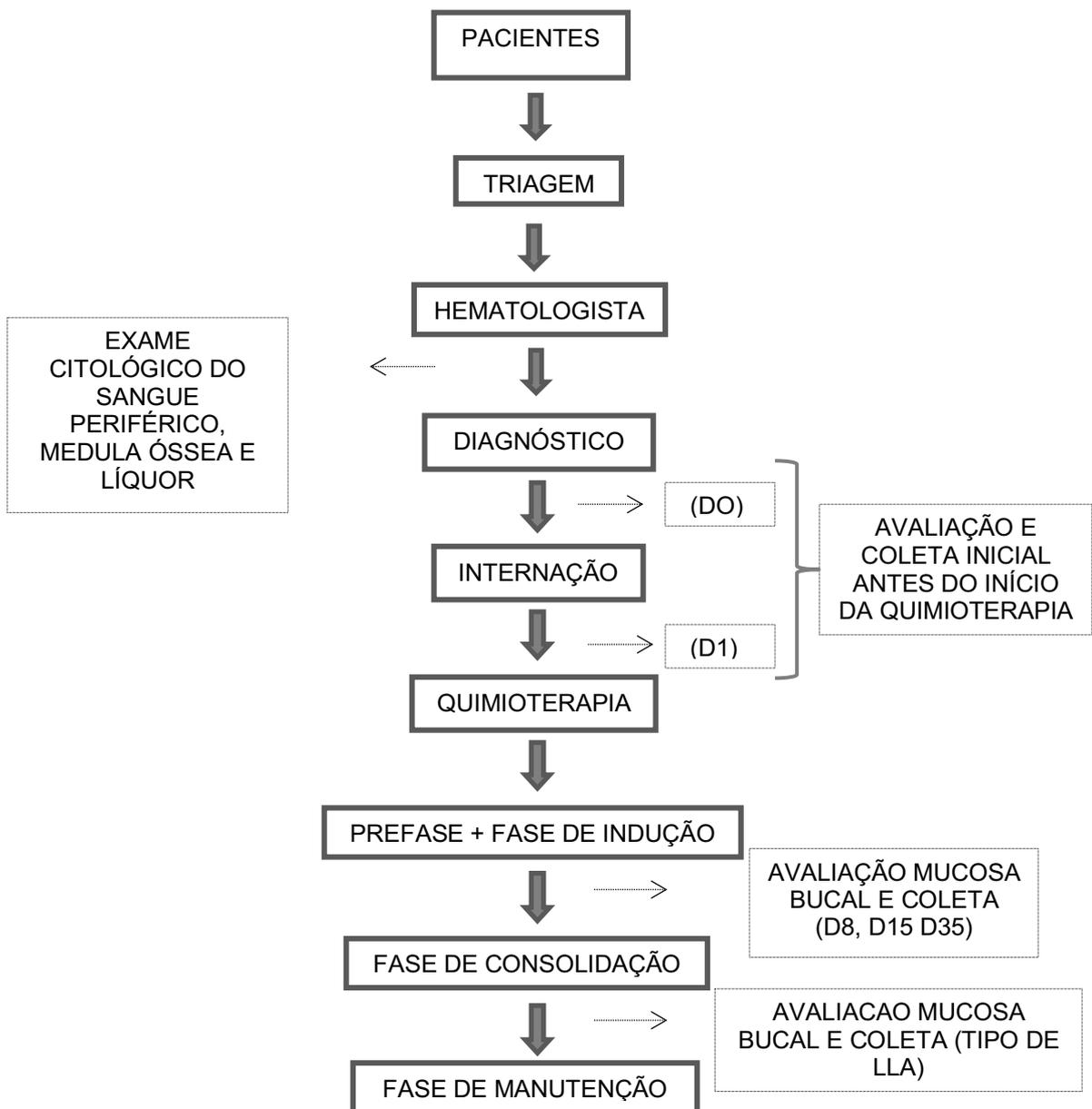


Figura 1: Fluxograma representando as etapas das avaliações clínicas, coletas do material e análise laboratorial após admissão do paciente.

4.6.1 Avaliação da condição bucal dos pacientes e graduação da mucosite

A avaliação da condição bucal dos pacientes foi realizada através do exame físico da cavidade bucal e regiões anexas, seguindo a semiotécnica preconizada pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM), em que avaliam lábios, mucosa jugal, língua, assoalho, palato duro, palato mole, orofaringe e gengivas, utilizando-se instrumental adequado, equipamentos de proteção individual e dentro das normas de biossegurança.

As manifestações bucais foram avaliadas e anotadas em formulário (Apêndice C) levando em consideração a presença de sinais e sintomas como xerostomia; consistência salivar; disfagia e disfonia; candidíase; tumefação na parótida; alterações como fissuras e atrofia papilar na língua; edema, eritema, úlceras e pseudomembranas.

A graduação da mucosite bucal, quando presente, foi realizada de acordo com a Escala de Toxicidade Bucal da Organização Mundial de Saúde (Quadro 3). As informações clínico-laboratoriais obtidas foram armazenadas em formulário de pesquisa apropriado (Apêndice C) para este estudo. Os pacientes com graduação 1 e 2 da OMS foram considerados como portadores de **mucosite moderada** e os com graduação 3 e 4, como **mucosite severa** (OTMANI et al., 2011).

Quadro 3 – Escala de Toxicidade Bucal da Organização Mundial de Saúde

| | |
|---------------|---|
| Grau 0 | Sem alterações |
| Grau 1 | Dor e eritema |
| Grau 2 | Eritemas e úlceras |
| Grau 3 | Eritema difuso, lesões ulcerativas, dieta líquida |
| Grau 4 | Úlceras difusas que tornam a alimentação impossível |

Fonte: Adaptado da escala de toxicidade bucal da OMS, 1979.

4.6.2 Coleta de células epiteliais da mucosa bucal e preparo das amostras

Para a investigação do vírus da família HHV, amostras de raspados citológicos foram obtidas segundo técnica semelhante a utilizada por Mendonça (2008). Com o auxílio de escova ginecológica estéril (Kolplast® Comercial Industrial do Brasil Ltda), a região de mucosa jugal (de molares a incisivos) foi raspada bilateralmente, durante aproximadamente 5 a 10 segundos, pelo profissional pesquisador, após a realização de bochechos com água esterilizada para remoção de possíveis resíduos alimentares que pudessem estar presentes.

As amostras foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL com 500 µL de Tampão TE (Tris HCl na concentração de 10mM + EDTA na concentração de 1mM pH 8,0) e armazenada a uma temperatura de -20° C.

Para a avaliação dos agentes fúngicos e bacterianos foi utilizado *swab* esterilizado para coleta e transporte de amostras com meio de cultura Stuart (Labor Import Comercial®).

Os dias das avaliações e coletas dos esfregaços de células epiteliais da mucosa bucal foram baseados nos dias em que os pacientes passaram por coleta para a avaliação dos grupos de risco, e estão representados nos quadros abaixo em destaque de acordo com o seu diagnóstico:

Quadro 5: Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia B-Derivada do grupo de baixo risco de recaída.

| LEUCEMIA B-DERIVADA BAIXO RISCO | | |
|--|-------------------------|-----------------------------|
| Fases | Dia da Coleta | Número total de dias |
| Prefase e Indução | D1; D8; D15; D35 | 35 dias |
| Consolidação da remissão | D1; D15; D29 | 29 dias |

Quadro 6: Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia B-Derivada do grupo de alto risco de recaída

| LEUCEMIA B-DERIVADA ALTO RISCO | | |
|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Fases | Dia da Coleta | Número total de dias |
| Prefase e Indução | D1; D8; D15; D35 | 35 dias |
| Consolidação da remissão | D1; D15; D29; D50 | 57 dias |

Quadro 7: Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda T-Derivada

| LLA T-DERIVADA | | |
|---------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Fases | Dia da Coleta | Número total de dias |
| Prefase e Indução | D1; D8; D15; D35 | 35 dias |
| Consolidação da remissão | D1; D15; D29; D50 | 57 dias |

Quadro 8: Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo

| LLA PH+ | | |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Fases | Dia da Coleta | Número total de dias |
| Prefase e Indução | D1; D8; D15; D35 | 35 dias |
| Consolidação da remissão | D1; D15 | 22 dias |

As informações clínico-laboratoriais coletadas foram armazenadas em formulário específico para esta pesquisa (Apêndice D).

Foram incluídos todos os novos casos consecutivos que se apresentaram ao serviço no período de agosto a novembro de 2014 e avaliados nos diferentes momentos propostos até janeiro de 2015. A mostra foi constituída por 12 pacientes, 9 casos e 3 controles, de maneira que se garantiu um erro amostral não superior a 5% e confiabilidade de 95%. Para tanto, utilizou-se o cálculo do tamanho de uma amostra aleatória simples para populações finitas, considerando o tamanho da

população (N) de cinquenta, visto que este é o total de pacientes que em média recebem diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda ao ano na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM.

- Primeira aproximação do tamanho da amostra (n_0), onde E_0 (erro amostral tolerável) = 5% = 0,05.

$$n_0 = 1/E_0^2$$

$$n_0 = 1/0,0025$$

$$n_0 = 400$$

- Tamanho da amostra (n), onde N (média de pacientes diagnosticados ao ano no HEMOAM) = 50. Sendo que a amostra será feita em 3 meses, então temos $50/12 = 4,17$. Portanto o $N = 4 \times 3 = 12$.

$$N = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

$$N = \frac{12 \times 400}{12 + 400}$$

$$N = \frac{4800}{412}$$

$N = 12$ pacientes aproximadamente

Os 3 pacientes-controle livres da doença de base, foram avaliados para fins de comparação, apresentando-se de ambos os sexos e com idade de 1 a 4 anos, atendidos para exame odontológico de rotina no Ambulatório da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas. Esses pacientes eram sabidamente saudáveis, sem doenças sistêmicas, e com saúde bucal adequada. A

coleta do material da mucosa bucal foi realizada por meio de escova ginecológica estéril (Kolplast® Comercial Industrial do Brasil Ltda) da mesma maneira citada anteriormente para os pacientes com LLA.

Para avaliação dos vírus da família HHV, a coleta do material da mucosa bucal dos pacientes com LLA foi realizada nos diferentes dias da préfase e indução, e consolidação do tratamento quimioterápico, ao passo que, nos pacientes atendidos no ambulatório da FAO/UFAM, esta coleta se deu em um único momento. A distribuição das coletas e a nomeação das amostras ocorreu de acordo com a Figuras 2 e 3, respectivamente.

| R ESTUDO | LLA | FASE DE TRATAMENTO | | | | | | |
|----------|----------|--------------------|----|-----|-----|--------------|-----|-----|
| | | PREFASE/INDUÇÃO | | | | CONSOLIDAÇÃO | | |
| | | D1 | D8 | D15 | D35 | D15 | D29 | D50 |
| 1 | LLA B AR | C | C | C | C | NC | NC | NC |
| 2 | LLA B AR | C | C | C | C | C | NC | NC |
| 3 | LLA B BR | C | C | C | C | C | NC | NC |
| 4 | LLA B BR | C | C | C | NC | NC | NC | NC |
| 5 | LLA B BR | C | C | C | NC | NC | NC | NC |
| 6 | LLA B BR | C | C | NC | NC | NC | NC | NC |
| 7 | LLA B BR | C | C | NC | NC | NC | NC | NC |
| B | LLA B AR | C | NC | C | NC | NC | NC | C |
| A | LLA T AR | C | NC | C | NC | NC | NC | NC |
| GC1 | Saudável | UC | | | | | | |
| GC2 | Saudável | UC | | | | | | |
| GC3 | Saudável | UC | | | | | | |

Figura 2 Distribuição das coletas dos pacientes com LLA nas diferentes fases e do grupo controle atendidos no ambulatório da FAO/UFAM.

Legenda: **R. ESTUDO**: Registro no estudo; **LLA B AR**: Leucemia Linfoblástica Aguda B Derivada com alto risco de recidiva; **LLA B BR**: Leucemia Linfoblástica Aguda B Derivada com baixo risco de recidiva; **LLA T**: Leucemia Linfoblástica Aguda T-Derivada; **LLA PH+**: Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo; **GC**: Grupo 999controle; **D1**: Dia 1; **D8**: Dia 8; **D15**: Dia 15; **D29**: Dia 29; **D35**: Dia 35; **D50**: Dia 50; **C**: Coletado; **NC**: Não coletado; **UC**: Única coleta.

| PACIENTE | FASE DE TRATAMENTO | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|----------|----------|--------------|-----|----------|
| | PREFASE/INDUÇÃO | | | | CONSOLIDAÇÃO | | |
| | D1 | D8 | D15 | D35 | D15 | D29 | D50 |
| 1 | 1 D1 IN | 1 D8 IN | 1 D15 IN | 1 D35 IN | * | * | * |
| 2 | 2 D1 IN | 2 D8 IN | 2 D15 IN | 2 D35 IN | 2 D15 CR | * | * |
| 3 | 3 D1 IN | 3 D8 IN | 3 D15 IN | 3 D35 IN | 3 D15 CR | * | * |
| 4 | 4 D1 IN | 4 D8 IN | 4 D15 IN | * | * | * | * |
| 5 | 5 D1 IN | 5 D8 IN | 5 D15 IN | * | * | * | * |
| 6 | 6 D1 IN | 6 D8 IN | * | * | * | * | * |
| 7 | 7 D1 IN | 7 D8 IN | * | * | * | * | * |
| B | B D1 IN | * | B D15 IN | * | * | * | B D50 CR |
| A | A D1 IN | * | A D15 IN | | * | * | * |
| GC1 | UC | | | | | | |
| GC2 | UC | | | | | | |
| GC3 | UC | | | | | | |

Figura 3: Nomenclatura das amostras de acordo com o paciente e dias das fases do tratamento. Legenda: **D1**: Dia 1; **D8**: Dia 8; **D15**: Dia 15; **D29**: Dia 29; **D35**: Dia 35; **D50**: Dia 50; **IN**: Prefase e Indução; **CR**: Consolidação da Remissão; **GC**: Grupo saudável comparativo; **UC**: Única Coleta. Ex.: 3 D8 IN – Paciente 3 coletado no dia 8 da Prefase e Indução.

4.6.3 Otimização do método de extração do DNA

A otimização da extração de DNA, assim como todas as etapas laboratoriais (extração de DNA nas amostras, quantificação de DNA e todos os PCRs para os vírus da família HHV e respectivas corridas de gel) foram realizadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade Federal do Amazonas com o auxílio das pesquisadoras Évelyn Costa Lira e Pamella Suely Santa Rosa Pimentel.

Para a otimização da metodologia para obtenção do DNA foram realizados 4 testes utilizando-se os protocolos *PureLink® Genomic DNA Kits* (Invitrogen by Life Technologies) (Figura 4), *QIAamp DNA Mini Kit®* (Qiagen, Inc., USA) (Figura 5) e suas modificações, conforme os protocolos nos Anexos C e D.



Figura 4: Mini kit *PureLink® Genomic DNA*.

Fonte: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K182001>



Figura 5: Mini kit *QIAamp DNA®*.

Fonte: <http://www.qiagen.com/br/products/catalog/sample-technologies/dna-sample-technologies/genomic-dna/qiaamp-dna-mini-kit/>

4.6.4 Extração do DNA

Para otimização nos sistemas e condições das reações de PCR, as amostras foram renomeadas e identificadas de acordo com o Quadro 9 a seguir. Seis amostras foram perdidas durante as fases de otimização do método de extração do DNA, pois as coletas não estavam sendo realizadas em duplicatas, apresentado um total de 26 amostras.

Quadro 9 – Renomeação e identificação dos microtubos das amostras de acordo com as coletas dos pacientes.

| PACIENTE | AMOSTRA | MICROTUBO |
|-----------------|----------------|------------------|
| 1 | 1 D1 IN | 1 |
| | 1 D8 IN | 2 |
| | 1 D15 IN | 3 |
| | 1 D35 IN | 4 |
| 2 | 2 D35 IN | 5 |
| | 2 D15 CR | 6 |
| 3 | 3 D35 IN | 7 |
| | 3 D15 CR | 8 |
| 4 | 4 D1 IN | 9 |
| | 4 D8 IN | 10 |
| | 4 D15 IN | 11 |
| 5 | 5 D1 IN | 12 |
| | 5 D8 IN | 13 |
| | 5 15 IN | 14 |
| 6 | 6 D1 IN | 15 |
| | 6 D8 IN | 16 |
| 7 | 7 D1 IN | 17 |
| | 7 D8 IN | 18 |
| 8B | B D1 IN | 19 |
| | B D8 IN | 20 |
| | B D50 CR | 21 |
| 9A | A D1 IN | 22 |
| | A D8 IN | 23 |
| GC1 | GC1 | 24 |
| GC2 | GC2 | 25 |
| GC3 | GC3 | 26 |

Nos microtubos que continham as amostras dos pacientes acondicionadas em 500 μ L de Tampão TE (Tris HCl na concentração de 10mM + EDTA na concentração de 1mM pH 8,0) foram adicionados 500 μ L de TPK (Proteinase K na concentração de 10 mg/mL associada a tampão TE e Tween 20 %), compondo um volume final de 1000 μ L. Em seguida, os microtubos passaram pelo vórtex brevemente para homogeneização da mistura, e incubados a 56° C durante 1 hora e após, por mais 10 minutos a 100° C para inativação da proteinase K no banho seco. Finalizada esta etapa, as escovas cervicais foram removidas com o auxílio de papel de vedação para placas de sequenciamento, e a concentração do DNA foi obtida pela leitura de absorbância a 260 nm e os microtubos foram armazenados a uma temperatura de -20° C.

Os resultados da quantificação da concentração de DNA nas amostras após serem submetidas a etapa de extração estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1: Quantificação da concentração de DNA nas amostras.

| PACIENTE | AMOSTRA | MICROTUBO | CONCENTRAÇÃO [] ng/ μ L | PUREZA |
|----------|----------|-----------|---------------------------------|--------|
| 1 | 1 D1 IN | 1 | 132.0 | 1.01 |
| | 1 D8 IN | 2 | 11.2 | 1.39 |
| | 1 D15 IN | 3 | 69.4 | 1.15 |
| | 1 D35 IN | 4 | 132.8 | 1.01 |
| 2 | 2 D35 IN | 5 | 78.7 | 1.12 |
| | 2 D15 CR | 6 | 69.7 | 1.14 |
| 3 | 3 D35 IN | 7 | 10.5 | 1.22 |
| | 3 D15 CR | 8 | 28,8 | 1.15 |
| 4 | 4 D1 IN | 9 | 54.3 | 1.03 |
| | 4 D8 IN | 10 | 26.2 | 1.16 |
| | 4 D15 IN | 11 | 58.4 | 1.03 |
| 5 | 5 D1 IN | 12 | 106.0 | 1.03 |
| | 5 D8 IN | 13 | 16.6 | 1.14 |
| | 5 15 IN | 14 | 15.2 | 1.16 |
| 6 | 6 D1 IN | 15 | 27.3 | 1.14 |
| | 6 D8 IN | 16 | 13.5 | 1.21 |
| 7 | 7 D1 IN | 17 | 23.0 | 1.13 |
| | 7 D8 IN | 18 | 37.9 | 1.08 |
| 8B | B D1 IN | 19 | 19.5 | 1.20 |
| | B D8 IN | 20 | 13.4 | 1.14 |
| | B D50 CR | 21 | 18.6 | 1.17 |
| 9A | A D1 IN | 22 | 13.0 | 1.27 |
| | A D8 IN | 23 | 11.0 | 1.30 |
| GC1 | GC1 | 24 | 15.2 | 0.84 |
| GC2 | GC2 | 25 | 19.7 | 1.19 |
| GC3 | GC3 | 26 | 28.8 | 1.15 |

4.6.5 Verificação da qualidade do DNA

A β -globina é um par de oligonucleotídeos, representados no quadro 10, designado na amplificação de um produto constitutivo comum a todas as células afim de certificar que a extração dos ácidos nucleicos foi adequada e assim, promover um controle interno da qualidade do DNA, excluindo resultados falso-negativos (MENDONÇA, 2008).

Para verificação da integridade e qualidade do DNA de todas as amostras, foram realizadas reações de amplificação utilizando-se o gene da β -globina. Para controle negativo das reações foram utilizados todos os reagentes (exceto DNA) juntamente com água ultrapura (branco da reação).

Quadro 10 – Sequência dos oligonucleotídeos da β -globina utilizados na reação:

| Vírus | Oligonucleotídeos | Sequência (5' → 3') | Região no genoma | Fragmento (pb) |
|------------------|-------------------|------------------------------|------------------------|----------------|
| β -globina | PCO3 | CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC | Região exônica do gene | 123 pb |
| | PCO4 | TCACCACCAACTTCATCCAGCTTCACC | | |

Fonte: Adaptado de MENDONÇA, 2008.

A preparação do mix para a reação de PCR para β -globina está representado na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2: Preparação do mix para β -globina.

| REAGENTES | 1x |
|---|-----------------------------|
| H ₂ O | 10,8 μ L |
| Tampão 10x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) | 2,5 μ L |
| dNTP (10 mM) | 1 μ L |
| MgSO ₄ (50 mM) | 2,5 μ L |
| PCO ₃ (5 pmoles) | 1,5 μ L |
| PCO ₄ (5 pmoles) | 1,5 μ L |
| Taq Polimerase (Hi Fidelity 5U/ μ l) | 0,2 μ L |
| DNA | 5 μ L |
| TOTAL | 25 μL |

Fonte: MENDONÇA, 2008.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com a Tabela 3:

Tabela 3: Sequência do ciclo de amplificação da reação da β -globina.

| | ETAPAS | TEMPERATURA | TEMPO |
|-----------|---------------------|-------------|------------|
| 40 ciclos | Denaturação inicial | 94° C | 2 min |
| | Denaturação | 94° C | 30 seg |
| | Anelamento | 60° C | 45 seg |
| | Extensão | 72° C | 1 min |
| | Extensão final | 72° C | 5 min |
| | Manutenção/Hold | 4° C | Indefinido |

Fonte: MENDONÇA, 2008.

4.6.6 Verificação da presença do DNA homólogo dos vírus da família HHV através da amplificação do DNA

Para o diagnóstico do HSV-1, com amplificação e reconhecimento por meio de PCR convencional, foram utilizados pares de iniciadores específicos (Quadro 11), gentilmente cedido pela Fundação de Medicina Tropical, assim como o controle positivo para o vírus proveniente de fragmento de necropsia de pulmão. Para controle da reação foi utilizado um controle negativo (água ultrapura associada aos reagentes da reação).

Quadro 11 – Sequência dos oligonucleotídeos para o HSV-1 utilizados na reação:

| Vírus | Oligonucleotídeos | Sequência (5' → 3') | Região no genoma | Fragmento (pb) |
|-------|--------------------------------|----------------------------------|------------------|----------------|
| HSV-1 | H ₁ P ₃₂ | TGGGACACATGCCTTCTTGG | RL2 | 147 pb |
| | H ₁ M ₃₂ | ACCCTTAGTCAGACTCTGTTACTTA CCC | | |

A preparação do mix para a reação de PCR para detecção do HSV-1 está representado na Tabela 4 abaixo:

Tabela 4: Preparação do mix para HSV-1.

| REAGENTES | 1x |
|--|-----------|
| H₂O | 13,60 µL |
| Tampão 10x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) | 2,5 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,5 µL |
| MgSO₄ (50 mM) | 0,8 µL |
| H₁P₃₂ (10 pmoles) | 1,2 µL |
| H₁M₃₂ (10 pmoles) | 1,2 µL |
| Taq Polimerase (Hi Fidelity 5U/µl) | 0,2 µL |
| DNA | 5 µL |
| TOTAL | 25 µL |

Fonte: GALVÃO; FERREIRA & SILVA, 2010.

As condições de amplificação da reação de PCR para a identificação do HSV-1 foram as seguintes (Tabela 5):

Tabela 5: Sequência do ciclo de amplificação da reação do HSV-1.

| | ETAPAS | TEMPERATURA | TEMPO |
|-----------|----------------------------|--------------------|--------------|
| 40 ciclos | Denaturação inicial | 94° C | 2 min |
| | Denaturação | 94° C | 30 seg |
| | Anelamento | 60° C | 45 seg |
| | Extensão | 68° C | 30 seg |
| | Extensão final | 72° C | 5 min |
| | Manutenção/Hold | 4° C | Indefinido |

Fonte: Adaptado de GALVÃO; FERREIRA & SILVA, 2010.

Para o diagnóstico do HSV-2 foram utilizados iniciadores específicos (Quadro 12) e controles sabidamente positivos para o vírus, provenientes de fragmentos de

biópsia de material anal, ambos cedidos gentilmente pela Fundação de Medicina Tropical. Controle negativo foi utilizado para controle da reação.

Quadro 12– Sequência dos oligonucleotídeos para o HSV-2 utilizados na reação:

| Vírus | Oligonucleotídeos | Sequência (5'→ 3') | Região no genoma | Fragmento (pb) |
|-------|--------------------------------|--------------------|------------------|----------------|
| HSV-2 | H ₂ P ₄ | CGCTTCATCATGGGC | UL28 | 227 pb |
| | H ₂ M ₄₀ | GTACAGACCTTCGGAGG | | |

A preparação do mix para a reação de PCR para detecção do HSV-2 está representado na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6: Preparação do mix para HSV-2.

| REAGENTES | 1x |
|---|--------------|
| H ₂ O | 13,60 µL |
| Tampão 10x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) | 2,5 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,5 µL |
| MgSO ₄ (50 mM) | 0,8 µL |
| H ₂ M ₄₀ (10 pmoles) | 1,2 µL |
| H ₂ P ₄ (10 pmoles) | 1,2 µL |
| Taq Polimerase (Hi Fidelity 5U/µl) | 0,2 µL |
| DNA | 5 µL |
| TOTAL | 25 µL |

Fonte: GALVÃO; FERREIRA & SILVA, 2010.

As condições de amplificação da reação de PCR para a identificação do HSV-2 foram as seguintes (Tabela 7):

Tabela 7: Sequência do ciclo de amplificação da reação do HSV-2.

| | ETAPAS | TEMPERATURA | TEMPO |
|-----------|---------------------|-------------|------------|
| 40 ciclos | Denaturação inicial | 94° C | 2 min |
| | Denaturação | 94° C | 30 seg |
| | Anelamento | 60° C | 45 seg |
| | Extensão | 68° C | 30 seg |
| | Extensão final | 72° C | 5 min |
| | Manutenção/Hold | 4° C | Indefinido |

Fonte: Adaptado de GALVÃO; FERREIRA e SILVA, 2010.

Para o diagnóstico do EBV e CMV foram utilizados *primers reverse* para cada vírus específico e um único *primer forward* (Quadro 13), cedidos gentilmente pela Fundação de Medicina Tropical, provenientes de um sistema multiplex (SAHIN et al., 2007).

Foram utilizados controles positivos provenientes de fragmentos de biópsia de material anal sabidamente CMV positivo e, Linfoma de Hodgkin sabidamente EBV positivo através de imunoistoquímica prévia, ambos cedidos pela Fundação de Medicina Tropical. Para controle da reação, controle negativo foi utilizado.

Quadro 13– Sequência dos oligonucleotídeos para os vírus do EBV e CMV utilizados na reação:

| Vírus | Sequência (5'-3') | Fragmento (pb) |
|------------------|-------------------------|----------------|
| HSV - GF (EBV-F) | GTGTTGACTTTGCCAGCCTCTAC | 176 pb |
| EBV - R | ACTCGTGACGTGCTTCTTTAC | |
| HSV - GF (CMV-F) | GTGTTGACTTTGCCAGCCTCTAC | 242 pb |
| CMV - R | TTGACACTCGCGCATGCATTC | |

Fonte: (SAHIN et al., 2007).

Apesar de se tratar de um único *primer forward*, os sistemas de reação de PCR foram individuais para detecção para cada vírus. O sistema da reação de PCR para detecção do EBV e CMV está representado na Tabela 8 e 9, respectivamente:

Tabela 8: Preparação do mix para EBV.

| REAGENTES | 1x |
|--|-----------|
| H₂O | 13,60 µL |
| Tampão 10x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) | 2,5 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,5 µL |
| MgSO₄ (50 mM) | 0,8 µL |
| HSV-GF (EBV-F) (10 pmoles) | 1,2 µL |
| EBV-R (10 pmoles) | 1,2 µL |
| Taq Polimerase (Hi Fidelity 5U/µl) | 0,2 µL |
| DNA | 5 µL |
| TOTAL | 25 µL |

Fonte: GALVÃO; FERREIRA & SILVA, 2010.

Tabela 9: Preparação do mix para CMV.

| REAGENTES | 1x |
|--|-----------|
| H₂O | 13,60 µL |
| Tampão 10x (500 mM KCL e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5) | 2,5 µL |
| dNTP (10 mM) | 0,5 µL |
| MgSO₄ (50 mM) | 0,8 µL |
| HSV-GF (CMV-F) (10 pmoles) | 1,2 µL |
| CMV-R (10 pmoles) | 1,2 µL |
| Taq Polimerase (Hi Fidelity 5U/µl) | 0,2 µL |
| DNA | 5 µL |
| TOTAL | 25 µL |

Fonte: GALVÃO; FERREIRA & SILVA, 2010.

As condições da reação da PCR para a identificação dos vírus foram as seguintes (Tabela 10):

Tabela 10: Sequência do ciclo de amplificação da reação para EBV e CMV:

| | ETAPAS | TEMPERATURA | TEMPO |
|-----------|----------------------------|--------------------|---------------|
| 40 ciclos | Denaturação inicial | 94° C | 2 min |
| | Denaturação | 94° C | 30 seg |
| | Anelamento | 60° C | 45 seg |
| | Extensão | 68° C | 30 seg |
| | Extensão final | 72° C | 5 min |
| | Manutenção/Hold | 4° C | Indefinido |

Fonte: Adaptado de GALVÃO; FERREIRA & SILVA, 2010.

Todas as reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador (*Applied Biosystems® Veriti® Thermal Cycler*).

4.6.7 Eletroforese em gel de agarose 2,0%

Finalizada a PCR, os produtos amplificados da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com 0,8 µL de brometo de etídio (1 µg/µL), em TBE 1X (tris + ácido bórico 0,089M e EDTA 0,02M) para visualização em transluminador de luz ultravioleta, sob tensão elétrica de 80 a 100 Volts. Foram aplicadas alíquotas de 10 µL da reação de cada produto da PCR, juntamente com 3 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,5% e glicerol 20%), totalizando um volume final de 13 µL. O tamanho dos fragmentos da PCR amplificados foi determinado por meio da comparação com o marcador de peso molecular (*100 pb bp DNA Ladder ready-to-use* da Bioron®).

4.6.8 Coleta das amostras para identificação dos fungos e bactérias

Para avaliação dos agentes fúngicos e bacterianos utilizou-se *swab* esterilizado para coleta e transporte de amostras com meio de cultura Stuart (Labor Import Comercial®) (Figura 6).



Figura 6: *Swab* com meio de cultura Stuart.

Fonte: http://www.plastlabor.com.br/components/com_virtuemart/shop_image/product/Swab_Haste_Pl__s_4c0f895cb119a.jpg

4.6.8.1 Cultura das amostras para isolamento dos fungos e bactérias

A cultura dos fungos foi realizada em placas de Petri utilizando o meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose preparado de acordo com as instruções do fabricante, com pH ajustado e esterilizado em autoclave. O material foi manipulado em uma zona de segurança, semeado em movimentos de estrias sobre a superfície do meio de cultura e incubado à temperatura de 28,5° C por um período de 24 horas. Após este período foi observado o crescimento fúngico pelo exame direto. Nos resultados negativos, se observou por mais nove dias.

Nos resultados positivos, foi realizada a identificação fenotípica dos microrganismos. O agrupamento de leveduras desenvolve colônias circulares, cremosas, opacas ou brilhantes em Ágar Sabouraud, à proporção que, a grande

quantidade e agrupamento de fungos filamentosos podem estar presentes a olho nu na forma de bolores (CARDOSO-JORGE, 2006).

As amostras bacterianas foram semeadas sobre a superfície do meio de cultura em movimentos de estrias. Para microrganismos aeróbios, as placas foram incubadas em estufa na temperatura de 37° C em presença de oxigênio do ar atmosférico. Para a cultura de bactérias anaeróbias, foram utilizados recipientes hermeticamente fechados, como jarras e câmaras de anaerobiose e/ou, meios redutores capazes de absorver o oxigênio ou gerar H₂ e CO₂(CARDOSO-JORGE, 2006).

4.6.8.2 Identificação dos microrganismos através de sistema automatizado

Para a identificação fenotípica dos microrganismos, optou-se pelo sistema Vitek® 2 Compact (Biomérieux) que é um equipamento capaz de identificar uma enorme variedade de microrganismos e realizar testes de sensibilidade aos antibióticos. Nesse sistema, todas as etapas são automatizadas, em que utilizam-se cartões de identificação VITEK®. O sistema é composto por uma câmara incubadora; uma cassete de suporte para os cartões e tubos-teste; códigos de barras para identificação das cassetes; caixa coletora de dejetos; carrossel de suporte para incubação dos cartões; cartões para bactérias gram positivas, gram negativas e fungos; um computador e uma impressora. A cassete permite a inoculação dos cartões em alguns minutos. O incubador simultaneamente incuba e lê os cartões. O computador com o programa VITEK® gera continuamente as operações em curso, memoriza os valores, trata e interpreta os resultados (Figura 7).



Figura 7: Computador e câmara incubadora do Vitek®
Fonte: <http://archive-pl.com/page/86401/2012-07-08/http://laboratoriumluxmed.pl/laboratory/read/content/29>

Os cartões de identificação são nomeados de acordo com o microrganismo a ser identificado, no caso de bactérias gram positivas são denominados em GP, enquanto que, os cartões para identificação de bactérias gram negativas e *Neisseria*, *Haemophilus* e outras bactérias gram negativas exigentes na identificação são denominados de cartão GN e NH. Para a identificação dos fungos, os cartões são denominados de YST. Os cartões utilizados no teste de susceptibilidade antimicrobiana são denominados AST e variam em AST-585 e AST-612 para bactérias gram positivas, AST-238 e AST-239 para bactérias gram negativas, e AST YS01 em antibiogramas de fungos.

Para que o Vitek® apresente bons resultados na identificação dos microrganismos é necessário seguir as etapas preconizadas explicitadas no anexo do protocolo laboratorial (ANEXO E).

5 RESULTADOS

Foram avaliados 9 pacientes com diagnóstico de LLA, com idades entre 2 e 14 anos, que se apresentaram ao Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas no período de setembro de 2014 a novembro de 2014, Paralelamente, foram examinados 3 pacientes livres da doença de base, com idades entre 1 e 4 anos, atendidos para exame odontológico de rotina no Ambulatório da Faculdade de Odontologia (FAO) da Universidade Federal do Amazonas, e que sabidamente eram pacientes saudáveis, sem doenças sistêmicas, e saúde bucal adequada.

O grupo experimental juntamente com o grupo controle totalizou 12 pacientes, distribuídos conforme a Tabela 11 a seguir.

Tabela 11: Perfil clínico dos pacientes estudados

| VARIÁVEIS | FREQUÊNCIA ABSOLUTA (FA) |
|-----------------------------------|--------------------------|
| Pacientes com LLA | 9 |
| Idade | |
| 2 anos | 6 |
| 7 anos | 1 |
| 9 anos | 1 |
| 14 anos | 1 |
| Sexo | |
| Masculino | 6 |
| Feminino | 3 |
| Pacientes livres da doença | 3 |
| Idade | |
| 1 ano | 2 |
| 4 anos | 1 |
| Sexo | |
| Masculino | 1 |
| Feminino | 2 |

Em relação a distribuição quanto o diagnóstico da Leucemia Linfoblástica Aguda, houve a presença de mais casos de Leucemia B-Derivada do grupo de baixo risco de recidiva, não apresentando nenhum caso de Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo (Gráfico 1).

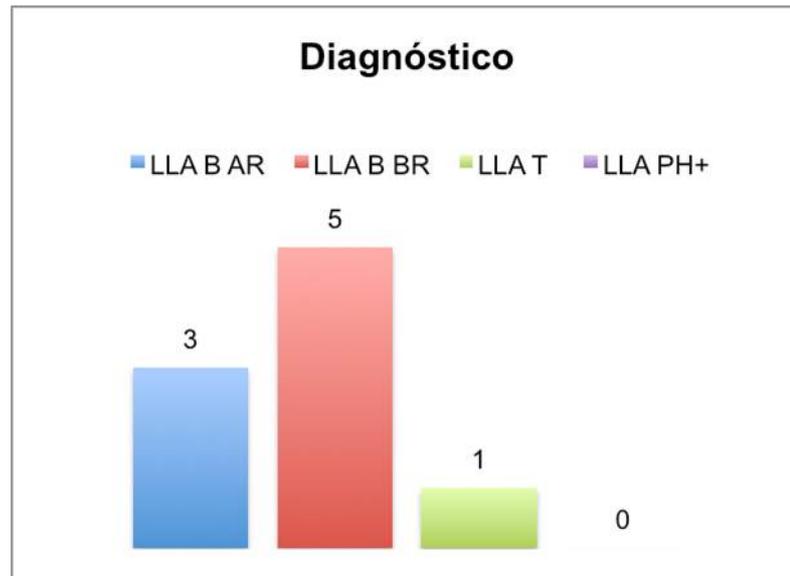


Gráfico 1: Distribuição dos pacientes quanto o diagnóstico da LLA.

Legenda: **LLA B AR**: Leucemia Linfoblástica Aguda B Derivada com alto risco de recidiva; **LLA B BR**: Leucemia Linfoblástica Aguda B Derivada com baixo risco de recidiva; **LLA T**: Leucemia Linfoblástica Aguda T-Derivada; **LLA PH+**: Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo.

As manifestações bucais foram avaliadas levando em consideração a presença de sinais e sintomas como xerostomia; consistência salivar; disfagia e disfonia; candidíase; tumefação na parótida; alterações como fissuras e atrofia papilar na língua; edema, eritema, úlceras e pseudomembranas. Somente três pacientes apresentaram alterações bucais dignas de nota, dentre estas, eritema bem localizado em assoalho bucal, xerostomia e lábios ressecados (Figura 8). Estas manifestações ocorreram no 8º dia e 15º dia da prefase e indução em dois pacientes, ao passo que um apresentou no 35º dia da prefase e indução. Nenhum dos pacientes com LLA avaliados apresentou mucosite bucal (Gráfico 2).



Figura 8: Presença semi-mucosa labial ressecada durante avaliação da cavidade bucal, no 15º dia de tratamento da prefase e indução.

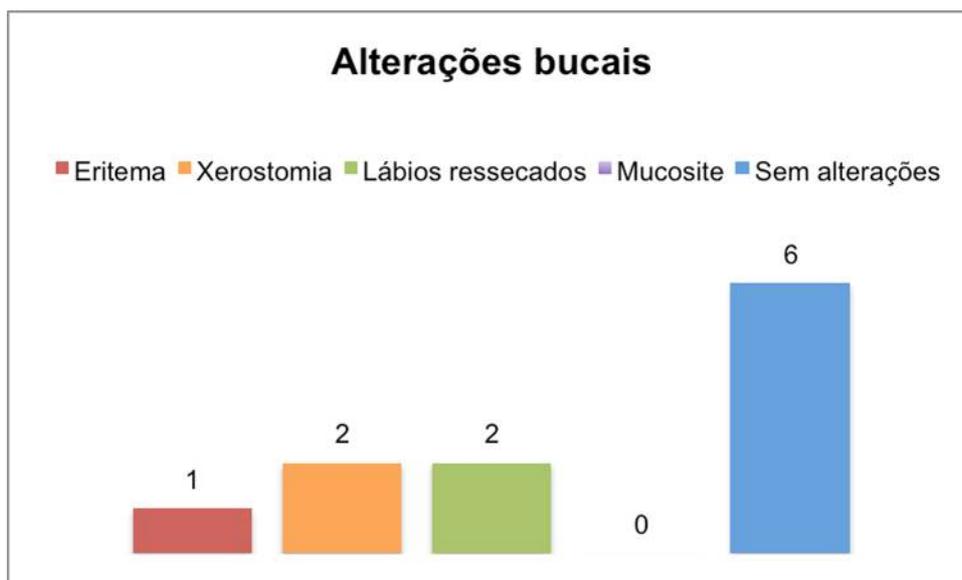


Gráfico 2: Distribuição dos pacientes quanto as alterações bucais apresentadas durante as avaliações nas diferentes fases.

As amostras foram consideradas adequadas para o diagnóstico molecular após amplificação utilizando-se os iniciadores da β -globina para confirmação da presença do DNA humano e verificação da integridade do DNA (Figuras 9 e 10).

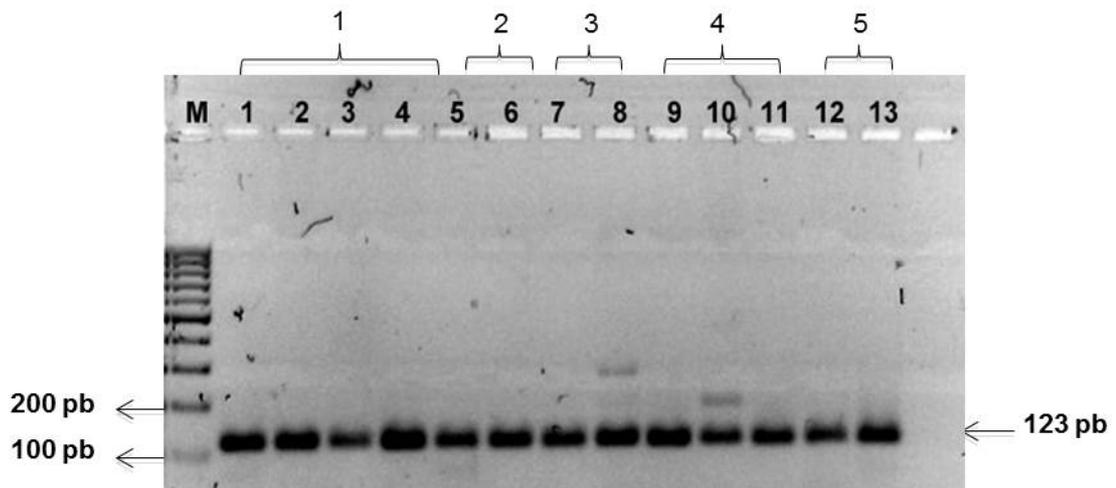


Figura 9: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando amplificação de um fragmento de 123 pb da β -globina nas amostras 1 a 13. M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 1-13 distribuídas por pacientes de acordo com as numerações representativas.

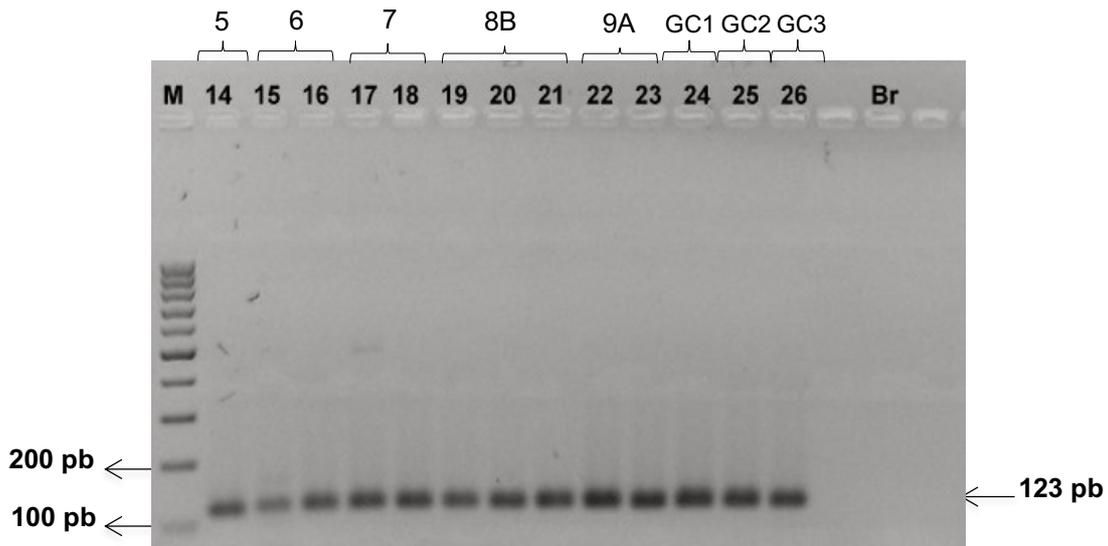


Figura 10: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando amplificação de um fragmento de 123 pb da β -globina nas amostras 14 a 26. M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 14-26 distribuídas por pacientes de acordo com as numerações representativas; Br: Controle negativo, branco da reação.

Nenhuma das 26 amostras foram positivas utilizando-se os iniciadores H₁P₃₂ e H₁M₃₂ para detecção do HSV-1 (Figura 11) e, H₂P₄ e H₂M₄₀ para HSV-2 (Figura 12).

Os controles positivos para os vírus amplificaram e evidenciaram fragmentos de 147 pb e 227 pb, para HSV-1 e HSV-2, respectivamente. Controle negativo para a reação foi utilizado.

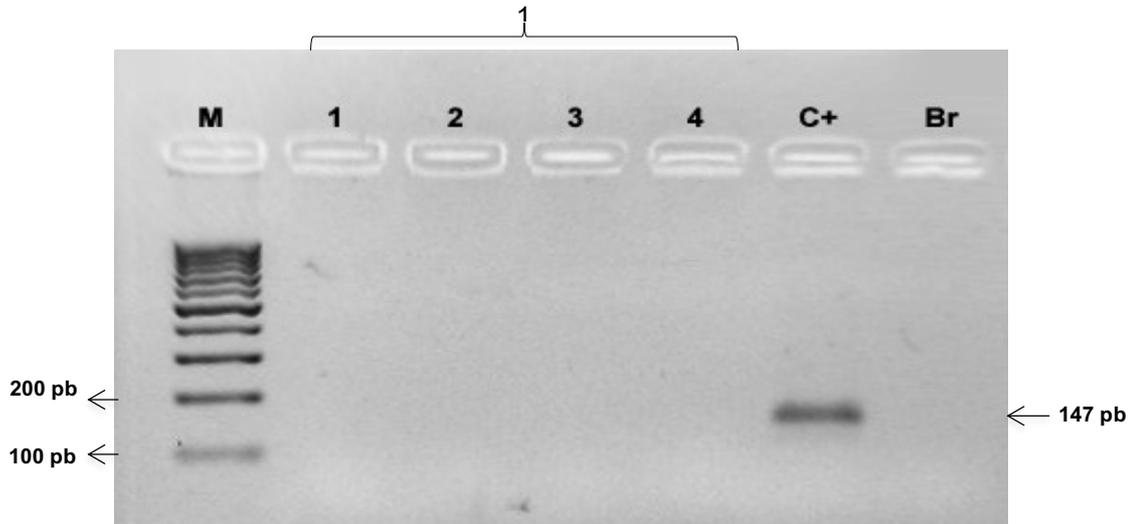


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do HSV-1 nas amostras 1 a 4 (o mesmo ocorreu para o restante das amostras). M: Marcador de peso molecular 100 pb plus DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 1-4; C+: Controle positivo mostrando fragmento de 147 pb; Br: Controle negativo, branco da reação.

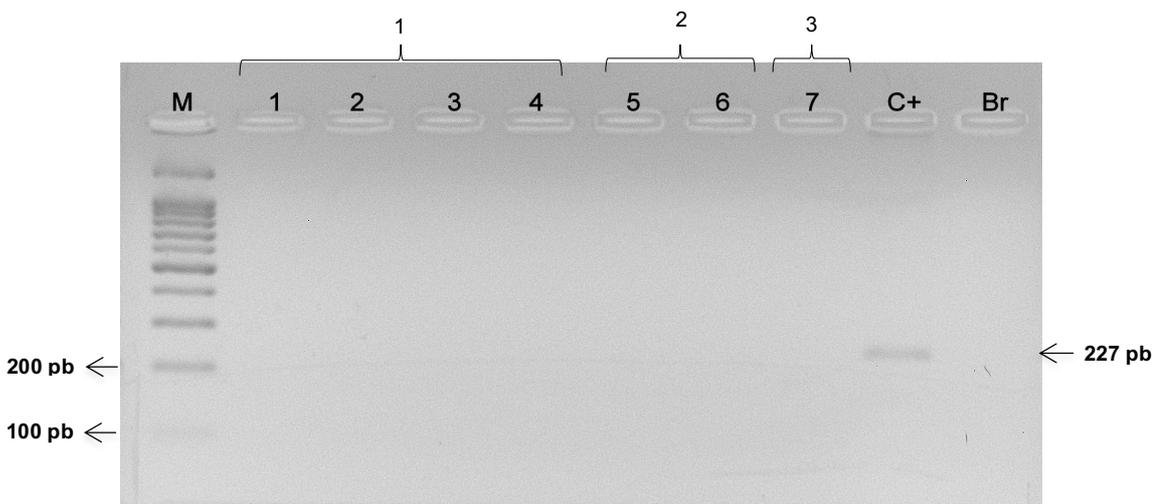


Figura 12: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do HSV-2 nas amostras 1 a 7 (o mesmo ocorreu para o restante das amostras). M: Marcador de peso molecular 100 pb plus DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 1-7; C+: Controle positivo mostrando fragmento de 227 pb; Br: Controle negativo, branco da reação.

A amplificação do DNA do CMV foi realizada utilizando-se os iniciadores CMV-R e HSV-GF, este último é um *primer forward* proveniente de um sistema multiplex, utilizado também na detecção do EBV (SAHIN et al., 2007). Nenhuma das 26 amostras detectaram a presença do DNA do CMV. Controle positivo para o vírus amplificou e evidenciou um fragmento de 242 pb (Figuras 13 e 14).

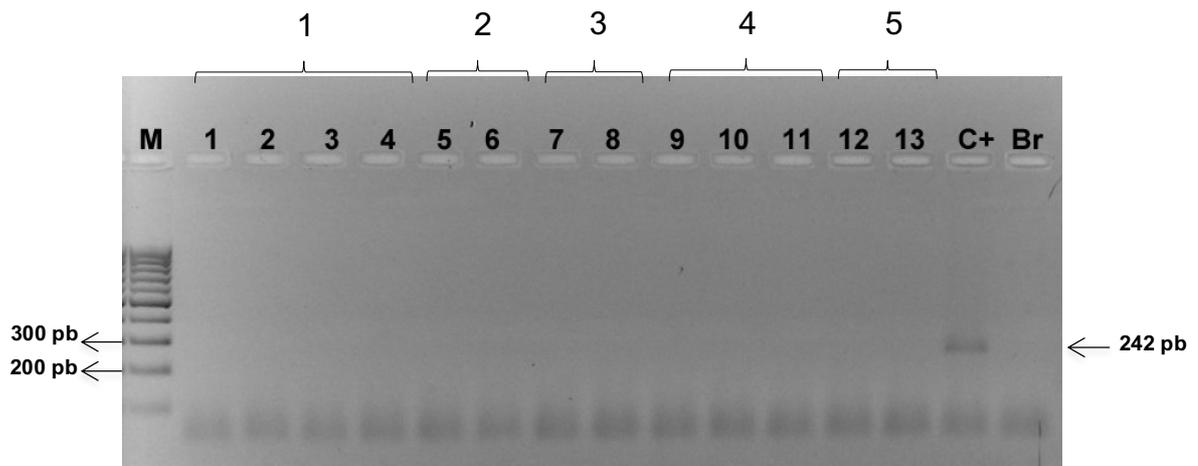


Figura 13: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do CMV nas amostras 1 a 13. M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 1-13 distribuídas por pacientes de acordo com as numerações representativas; C+: Controle positivo mostrando fragmento de 242 pb; Br: Controle negativo, branco da reação.

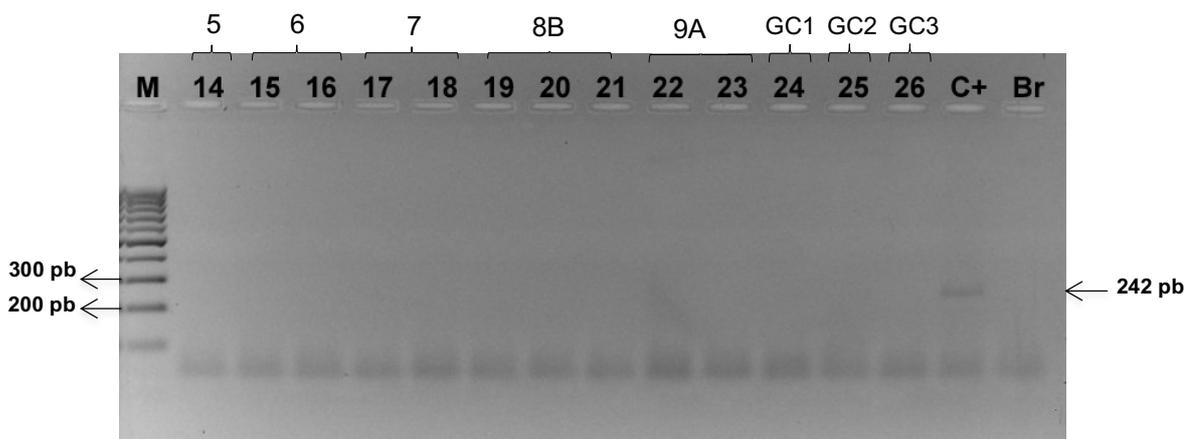


Figura 14: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando a ausência de amplificação do DNA do CMV nas amostras 14 a 26. M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 14-26 distribuídas por pacientes de acordo com as numerações representativas; C+: Controle positivo mostrando fragmento de 242 pb; Br: Controle negativo, branco da reação.

Somente quatro amostras apresentaram amplificação do DNA do vírus EBV utilizando-se os iniciadores EBV-R e HSV-GF, dentre as quais, 3 corresponderam a pacientes com diagnóstico de LLA, equivalendo a 33,3% (de um total de 9) e 1 paciente saudável atendido no ambulatório da FAO/UFAM equivalendo também a 33,3% (de um total de 3), sendo essas, as amostras 13 e 14 do paciente 5, correspondendo às coletas **5 D8 IN** (Coletado no dia 8 da Prefase e Indução) e **5 D15 IN** (Coletado no dia 15 da Prefase e Indução), respectivamente; amostra 23 do paciente A, correspondendo à coleta **A D8 IN** (Coletado no dia 8 da Prefase e Indução); e a amostra 25 pertencente ao paciente **GC2** (paciente saudável), de acordo com a distribuição explicitada no Quadro 12.

Controle positivo para o vírus amplificou e evidenciou um fragmento de 176 pb. Resultados das amplificações estão expostos nas Figuras 15 e 16.

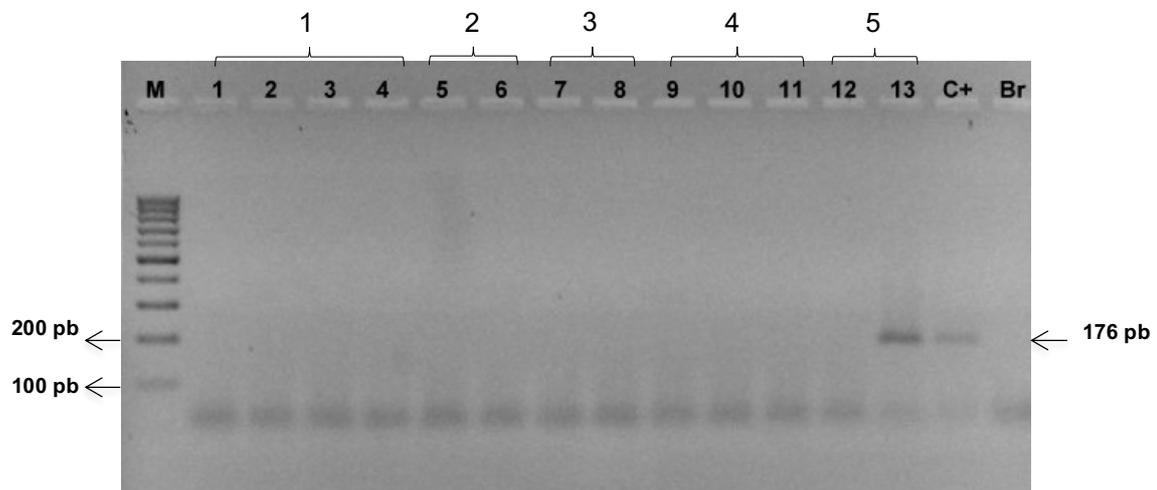


Figura 15: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 µg/µL) demonstrando amplificação do DNA do EBV na amostra 13 (paciente 5 do estudo). M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 1-13 distribuídas por pacientes de acordo com as numerações representativas; C+: Controle positivo mostrando fragmento de 176 pb; Br: Controle negativo, branco da reação.

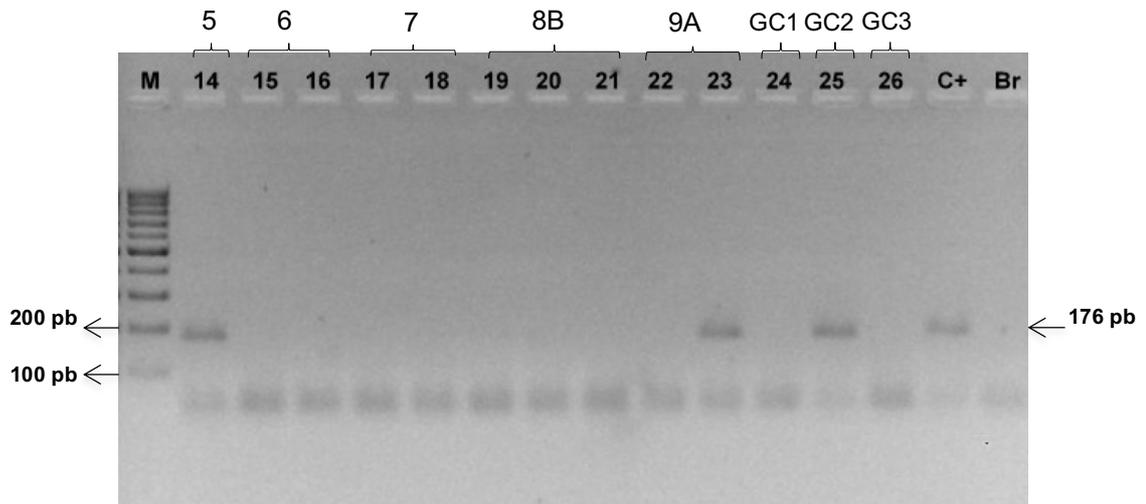


Figura 16: Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) demonstrando amplificação do DNA do EBV somente na amostra 14 (paciente 5 do estudo) e amostra 23 (paciente A). M: Marcador de peso molecular 100 pb DNA *Ladder ready-to-use* da Bioron®; Amostras 14-26 distribuídas por pacientes de acordo com as numerações representativas; C+: Controle positivo mostrando fragmento de 176 pb; Br: Controle negativo, branco da reação.

Apesar de nenhum dos pacientes avaliados terem apresentado quadro de lesões bucais compatível com quadro de mucosite, foram realizadas coletas de amostras da mucosa bucal íntegra de 4 pacientes escolhidos de maneira aleatória, e identificados os agentes bacterianos através do método automatizado Vitek®. Após análise, foram observadas a presença de *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. sanguinis*.

6 DISCUSSÃO

Leucemia Linfoblástica Aguda é uma neoplasia maligna derivada das células hematopoiéticas, caracterizada por um aumento na produção maligna de linfoblastos, preferencialmente na medula óssea, porém podendo se acumular em numerosos órgãos e tecidos (GUIMARÃES, ROSA, 2008). É responsável por cerca de 25% de todos os cânceres infantis e 80% das leucemias infantis (PUI, ROBISON, LOOK, 2008; STANULLA, SCHRAPPE, 2009; SILVERMAN et al., 2010).

Mendonça (2008) realizou uma avaliação prospectiva para analisar a associação entre os graus de mucosite e a presença do HSV-1, *Candida spp* e bactérias da cavidade bucal, em pacientes pediátricos submetidos a tratamento quimioterápico para LLA de acordo com o protocolo GBTLI LLA-99. As coletas foram realizadas no 14º dia da terapia de Indução (D14) e 56º dia da terapia de intensificação (D56).

Com base no estudo de Mendonça (2008), o presente estudo avaliou a microbiota bucal de pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA admitidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, submetidos a tratamento quimioterápico de acordo com o protocolo GBTLI LLA - 2009. As avaliações clínicas e coletas do material ocorreram durante o 1º (D1), 8º (D8), 15º (D15), 35º (D35) dia da prefase e indução, e 15º (D15) e 50º (D50) dia da fase de consolidação da remissão da terapia. Foi realizada uma análise da expressão de membros da família do HHV (HSV-1, HSV-2, EBV e CMV) através de PCR convencional, independente da presença ou não da mucosite bucal, ao passo que a avaliação de agentes fúngicos e bacterianos ocorreu somente na presença de lesões bucais por meio de esfregaços. Estas avaliações contínuas proporcionaram uma avaliação pontual e

dinâmica dos pacientes desde a sua admissão, bem como verificando a possível presença do vírus da família HHV nas diferentes fases.

6.1 LLA e Quimioterapia

Esta neoplasia apresenta-se frequentemente quimiossensível, alcançando uma taxa de sobrevida livre de eventos em cerca de 80% dos pacientes em longo prazo, mediante a aplicação de regimes combinados intensivos de quimioterapia (STANULLA, SCHRAPPE, 2009; SILVERMAN et al., 2010). Entretanto, estudo mais recente afirma que as taxas de cura podem alcançar cerca de 90% quando implementado o regime terapêutico ideal, baseado na estratificação dos subgrupos, classificados de acordo com as características das células leucêmicas do paciente, principalmente com o desenvolvimento de tratamentos específicos através de genoma de alto rendimento e sistemas inovadores de medicamentos (PUI et al., 2012).

O protocolo definido pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância de 1999 distribuía os pacientes em grupos de baixo e alto risco, de acordo com achados clínico-laboratoriais ao diagnóstico e a resposta precoce à terapia de indução no 7º, 14º e 28º dia (GBTLI LLA-99), contudo, foi implementado o protocolo GBTLI LLA-2009 que inseriu a Doença Residual Mínima (DRM), que auxilia na determinação dos grupos de risco e suas terapias ajustadas aos referentes grupos, sendo estes avaliados no 8º, 15º e 35º dia da fase de indução, identificando um grupo de pacientes com alto risco de falha indutória e recidiva, excluindo os pacientes com LLA T-derivada e LLA Ph+/BCR/ABL do grupo de baixo risco (GBTLI LLA-2009).

Todos os pacientes diagnosticados com LLA que foram avaliados, estavam sob tratamento com o protocolo GBTLI LLA-2009. Estes foram estratificados em grupos conforme preconiza o protocolo. Oito pacientes apresentaram leucemias B-derivadas e foram divididos em baixo e alto risco de recidiva, sendo administrado regimes reduzidos de quimioterápicos aos pacientes com excelente resposta ao tratamento. Apenas um paciente apresentou o diagnóstico de LLA T-derivada sendo introduzido protocolo específico, e nenhum caso de LLA Ph+/BCR/ABL foi observado. O Regime terapêutico baseado na estratificação dos subgrupos foi implementado conforme o protocolo.

A fase de indução da remissão corresponde a primeira fase da terapia de tratamento para LLA com o objetivo de erradicar mais de 99% da carga de células leucêmicas iniciais e restaurar a hematopoiese normal. Correlacionado a isso, é necessária a avaliação cuidadosa do grupo de risco de recidiva para que o tratamento mais intensivo seja administrado apenas nos casos de alto risco poupando os pacientes com menor risco dos efeitos tóxicos indevidos (PUI, ROBISON, LOOK, 2008; PUI et al., 2011; PUI et al., 2012).

A LLA acomete tanto crianças como adultos, porém com pico de prevalência entre 2 e 5 anos de idade (PUI, ROBISON, LOOK, 2008). Estudos evidenciam que a idade de diagnóstico tem um forte efeito sobre o prognóstico, demonstrando um resultado mais favorável nos pacientes mais jovens que nos adolescentes e jovens adultos, pois este grupo apresenta uma prevalência aumentada de leucemia de alto risco e uma menor tolerância e adesão à terapia (PUI, ROBISON, LOOK, 2008; PUI et al., 2011; PUI et al., 2012). Foram avaliados 9 pacientes com LLA com idades entre 2 e 14 anos, apresentando uma prevalência maior de crianças com 2 anos de idade, corroborando com a literatura.

6.2 Complicações bucais e Quimioterapia

Os agentes quimioterápicos causam alterações relevantes na cavidade bucal dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda devido seus efeitos tóxicos (EPSTEIN et al. 2002; SONIS, 2004; NISCOLA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007; MENDONÇA, 2008; MORAIS et al., 2014), independentemente do protocolo utilizado (OLIVEIRA et al., 2007).

Uma revisão sistemática da literatura sobre as complicações bucais secundárias à quimioterapia para tratamento da LLA, demonstra que as manifestações bucais mais frequentes são mucosite, candidíase, periodontite e gengivite (MORAIS et al., 2014). Úlceras, petéquias, equimoses, eritema, sangramento gengival, xerostomia, palidez das mucosas e infiltração leucêmica gengival também podem estar presentes (OLIVEIRA et al., 2007; ANIRUDHAN et al., 2008).

Estas complicações ocorrem mais comumente após o início da administração dos fármacos, com um declínio gradual através das duas semanas seguintes, na fase de indução do tratamento (OLIVEIRA et al., 2007; ANIRUDHAN et al., 2008; MORAIS et al., 2014). A maioria dos autores não estabelecem relação entre sexo e a frequência de manifestações bucais (MORAIS et al., 2014). Os pacientes do grupo com LLA examinados mostraram-se distribuídos uniformemente em relação ao sexo e somente três manifestaram alterações bucais, ocorridas em torno da 2^a, 3^a e 4^a semana da fase de indução, dentre as quais, eritema bem localizado em assoalho bucal, xerostomia e lábios ressecados. Nenhum dos pacientes com LLA avaliados apresentou mucosite bucal, sendo atribuído a isso, a implementação do regime terapêutico adequado para cada paciente, baseado na estratificação dos subgrupos

de acordo com o preconizado no protocolo GBTLI LLA-2009, permitindo que o tratamento mais intensivo seja administrado apenas nos casos de alto risco, diminuindo os riscos dos efeitos tóxicos indevidos.

6.3 Mucosite e microbiota bucal

Considerando que os pacientes diagnosticados com LLA e que apresentam mucosite bucal tem maior diversidade microbiana (YE et al., 2013), protocolos de higiene bucal associados ao tratamento profilático com digluconato de clorexidina a 0,12% demonstraram-se estatisticamente eficiente quando comparado a grupos que não receberam cuidados (CHENG et al., 2001; EPSTEIN, HANCOCK, NANTEL, 2003; SOARES et al., 2011), revelando uma frequência mais baixa de microrganismos potencialmente patogênicos na mucosa bucal das crianças com leucemia linfoblástica aguda (EPSTEIN, HANCOCK, NANTEL, 2003; SOARES et al., 2011). Não administrou-se bochechos com digluconato de clorexidina a 0,12%, que auxilia no combate a diversidade microbiana, entretanto, foram realizadas instruções de higiene bucal durante as avaliações da mucosa bucal dos pacientes, para controle dessa população.

6.3.1 Mucosite e agentes virais da família HHV

Autores avaliaram as influências da candidíase bucal e do HSV-1 nas infecções de mucosite quimioterapicamente induzida, e os resultados sugeriram que estes microrganismos desempenham um papel importante na mucosite bucal e pode estar associado ao aumento da severidade desta, em crianças e adolescentes com

LLA (MENDONÇA., 2008; CHEN et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012). Contudo, estudo para detecção do HSV-1 e HSV-2 em lesões bucais de crianças em quimioterapia para neoplasia maligna, não observou correlação entre a gravidade da mucosite com o HSV, porém confirmou a alta prevalência do HSV-1 em mucosite bucal nas crianças que receberam quimioterapia para o câncer (AGGARWAL et al., 2014).

Mendonça (2008) na sua avaliação de 71 pacientes pediátricos, observou a prevalência do HSV-1 na mucosa bucal em 12,3% dos pacientes na fase inicial do tratamento (D14), reduzindo sua prevalência para 6,2% na fase mais tardia, na terapia de intensificação (D56). Durante a terapia de indução, somente 8,5% dos pacientes não apresentaram nenhum grau de inflamação das mucosas bucais. O HSV-1 esteve presente em 12,9% das mucosites no D14, e 6,3% no D56. Na análise de 6 pacientes com mucosite grau 3 na avaliação do D56, 3 eram positivos para HSV-1. Diferente dos resultados encontrados por Mendonça (2008), nenhuma amostra do estudo demonstrou-se positiva para a presença do HSV-1 e HSV-2 após exame de detecção através de PCR qualitativo. O fato de nenhum paciente ter apresentado quadro de mucosite e a coleta ter sido realizada independente da presença de lesões bucais, pode sugerir estado de latência para os vírus, contribuindo para o resultado quando comparado ao estudo citado.

O EBV está presente em cerca de 90% da população mundial (BRAS-SILVA, 2009), associado na patogênese de tipos avançados da doença periodontal e tumores malignos epiteliais e linfoides, como o Linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo e doença de Hodgkin (SCHUSTER; KRETH, 1992; LYNCH, 2000; SLOTS et al., 2006; CHEN et al., 2015), enquanto que o CMV pode acometer até

99% da população adulta dependo da etnia e condições socioeconômicas, podendo estar envolvido a doenças autoimunes (HALENIUS; HENGEL, 2014).

Ambos representam uma ameaça a pacientes imunodeprimidos, causando morbidade e mortalidade neste grupo (SCHUSTER; KRETH, 1992; EPSTEIN; SHERLOCK; WOLBER, 1993; SLOTS et al., 2006; HALENIUS; HENGEL, 2014; CHEN et al., 2015). A reativação do CMV foi descrita em mais de 75% nos pacientes soropositivos que receberam transplante da medula óssea e órgãos (EPSTEIN; SHERLOCK; WOLBER, 1993)

Os sintomas característicos da infecção por CMV são bem semelhantes aos encontrados na infecção por EBV, dificultando o diagnóstico clínico entre os vírus (SCHLEISS, 2009). Em decorrência da frequência e causas múltiplas de lesões bucais em pacientes imunocomprometidos, a vigilância da cavidade bucal adicionada a utilização dos avanços recentes na tecnologia favorece o diagnóstico específico e reduz o inadequado tratamento empírico (EPSTEIN; SHERLOCK; WOLBER, 1993).

Morales-Sánchez et al (2014) avaliaram se o EBV, CMV, HHV6 e HHV7 estavam envolvidos na gênese da leucemia linfoblástica aguda das células B e T em crianças mexicanas. Menos de 20% das amostras foram positivas por pelo menos um dos vírus testados, descartando quaisquer envolvimento na gênese da LLA nestas crianças. Além disso, não se evidenciou a associação entre as infecções ou co-infecções detectadas com o prognóstico, no entanto, Ogata et al (2011) afirmaram que a reativação do CMV, HHV6 e EBV é comum em pacientes com leucemia das células T submetidos à quimioterapia citotóxica.

Estudo realizado por Chen et al (2015) em Taiwan concluiu que a taxa de soropositividade para EBV aumentou de 23% aos 0 anos de idade a 53% aos 2 anos

de idade. Além disso, os autores sugerem estratégias de prevenção, como educação para a higiene, e o desenvolvimento de vacinas eficazes para redução da alta taxa de infecção na população suscetível, visto que a ativação do vírus é uma ameaça de mononucleose infecciosa na infância e também está associado com certas malignidades em adultos.

A literatura relata a utilização de um ensaio multiplex de PCR como um método rápido, sensível e econômico para a detecção do HSV-1, HSV-2, CMV e EBV, permitindo assim, a aplicação de tratamento antiviral específico evitando o uso de produtos farmacêuticos redundantes e potencialmente tóxicos nos pacientes (SAHIN et al., 2007). Entretanto, há autores que afirmam que PCR em tempo real quantitativo é capaz de demonstrar uma prevalência significativamente maior de HSV-1 e HSV-2 em comparação com PCR qualitativo (AGGARWAL et al., 2014), e sugerem que futuras investigações devem utilizar tecnologias de sequenciamento de nova geração e análise de bioinformática, por serem mais capazes de detectar o espectro completo dos vírus (MORALES-SÁNCHEZ et al. 2014).

Os pacientes que compuseram o estudo também foram avaliados através de PCR qualitativo quanto a presença do CMV e EBV. Nenhuma das amostras foram positivas para o CMV, e somente quatro amostras apresentaram amplificação do DNA do vírus EBV. Três amostras corresponderam a pacientes com diagnóstico de LLA, em que duas destas eram equivalentes as coletas do paciente 5 nos dias 8 e 15 da prefase e indução, e uma ao paciente 9A correspondendo a coleta realizada no 8º dia da prefase e indução; uma amostra pertencia a um paciente do grupo controle atendido no ambulatório da FAO/UFAM. Os resultados inferirem que os pacientes 5 e 9A do estudo podem ter sido expostos ao vírus EBV após o início dos tratamentos, visto que as coletas realizadas no 1º dia do tratamento não

apresentaram a presença do vírus. Porém, conforme afirma a literatura, a utilização de PCR em tempo real quantitativo pode auxiliar na detecção mais apurada destes vírus, bem como a utilização de tecnologias mais avançadas, pois alguns desses podem permanecer em um estado de latência da infecção com baixos níveis de expressão dos genes virais, mantendo-se pouco detectáveis.

6.3.2 Mucosite e agentes fúngicos e bacterianos

Há evidências que os principais patógenos bucais são adquiridos precocemente na infância durante as fases iniciais de colonização bucal influenciando na determinação da composição da microbiota bucal individual e na maturação do sistema imunológico das mucosas (FONSECA, 2012).

Smith et al. (1993) determinaram a prevalência de diferentes espécies de estreptococos durante a infância em coletas da mucosa bucal realizadas através de *swab*. As amostras demonstraram uma prevalência de 89% de *Streptococcus mitis*. *Streptococcus salivarius* também foi predominante (94%). O componente da microbiota estreptocócica inicialmente colonizadora do lactente consistiu do *S. Mitis*.

Fonseca (2012) caracterizou a colonização bucal por espécies de *Streptococcus* não-hemolíticos relevantes dos grupos *mitis*, *sanguinis*, *salivarius*, *anginosus* e *mutans* em pacientes de 2 a 16 meses de idade. Diferentes tipos morfológicos foram isolados e classificados através de reações de PCR. Das amostras identificadas, a grande maioria pertencia à espécie *S. salivarius* (35%), dominante em todas as faixas etárias, seguida de *S. mitis* (5%), *S. oralis* (2%) e *S.*

sanguinis (1%). Estreptococos consistiram na grande maioria da microbiota cultivável nas faixas etárias estudadas (83% a 100%).

Baseado em estudos que preveem a alta diversidade de microrganismos bucais e que estes podem se apresentar patogênicos sob condições específicas, o presente trabalho se propôs a analisar os agentes fúngicos e bacterianos presentes nas lesões na cavidade bucal nos pacientes com LLA. Apesar de nenhum dos pacientes avaliados terem apresentado quadro de lesões bucais com padrão de infecção, foram realizadas coletas de amostras da mucosa bucal íntegra de 4 pacientes e identificados os agentes bacterianos através do método automatizado Vitek®. Foram observadas a presença de *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *S. sanguinis*, microbiota comumente encontrada na cavidade bucal, conforme apresentando nos estudos citados.

Diante do exposto, sugere-se que a aplicação do regime terapêutico ideal para cada paciente, de acordo a estratificação nos subgrupos preconizados pelo protocolo GBTLI LLA-2009, permite que o tratamento mais intensivo seja administrado apenas nos casos de alto risco, diminuindo os riscos dos efeitos tóxicos indevidos que possam ocasionar em lesões bucais com o aumento da morbidade frente a patogenicidade da microbiota bucal. Infere-se que avaliações periódicas realizadas pelos cirurgiões-dentistas e o acompanhamento das alterações bucais, associada a melhor compreensão da microbiota bucal poderá contribuir na melhoria da qualidade de vida nestes pacientes.

7 CONCLUSÕES

- As manifestações bucais ocorreram em torno da 2^a, 3^a e 4^a semana da fase de indução, em que são instituídos regimes quimioterápicos mais intensivos.
- A instituição de instrução de higiene e a vigilância da cavidade bucal nos pacientes com LLA pode auxiliar na manutenção das condições de saúde diminuindo a propagação de infecções de localização bucal.
- A condição de diagnóstico de LLA parece não influenciar na presença dos agentes virais, uma vez que, se apresentou positivo em pacientes do grupo experimental e grupo controle.
- Sugere-se que os vírus avaliados que não positivaram podem estar em estado de latência, uma vez que a mucosa avaliada encontrava-se em estado íntegro.

8 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, R. et al. HSV-1 as well as HSV-2 is frequent in oral mucosal lesions of children on chemotherapy. *Support Care Cancer*, v. 22, n. 7, p. 1773-9, jul., 2014.
- ANIRUDHAN, D. et al. Etiology and outcome of oral mucosal lesions in children on chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Indian Pediatr.*, v. 45, n. 1, p. 47-51, jan., 2008.
- ANTUNES, H. S. et al. Streptococcal bacteraemia in patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation: the role of tooth brushing and use of chlorhexidine. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 1, n. 15, p. 303-9, mar., 2010.
- ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*, v. 37, p. 107–21, 2008.
- BRAS-SILVA P.H. Recrutamento de Células Dendríticas e Linfócitos T imaturos reguladores (T reg) em lesões associadas ao Vírus Epstein-Barr (EBV): papel da citocina MIP3a. TESE DE DOUTORADO. USP- 2009.
- BROWN, C. G, WINGARD J. Clinical consequences of oral mucositis. *Semin Oncol Nurs*, v. 20, n. 1, p. 16-21, feb., 2004.
- BRUCE, A. J.; ROGERS, R. S. Oral manifestations of sexually transmitted diseases. *Clin Dermatol.*, v. 22, n. 6, p. 520-7, nov.-dec., 2004.
- BUSTAMANTE, C. I.; WADE, J. C. Herpes Simplex Virus Infection in the Immunocompromised Cancer Patient, *J Clin Oncol*, v. 9, p. 1903-15, 1991.
- CAMPO E. et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, v. 117, n. 19, p. 5019-32, may, 2011.
- CARDOSO-JORGE, A. O. *Princípios de Microbiologia e Imunologia*. São Paulo: Editora Santos, 2006. 418p.
- CHEN C. Y. et al. A large-scale seroprevalence of epstein-barr virus in Taiwan. *Plos One*, v. 23, n. 10, p. 1-11, jan., 2015.
- CHEN, Y. K. et al. The impact of oral herpes simplex virus infection and candidiasis on chemotherapy-induced oral mucositis among patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v. 30, n. 6, p. 753-9, jun., 2011.
- CHENG, K. K. F. et al. Evaluation of an oral care protocol intervention in the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in paediatric cancer patients. *European Journal of Cancer*, v.37, p. 2056–63, 2001.
- COSTA, E. M. M. B. et al. Evaluation of an oral preventive protocol in children with acute lymphoblastic leucemia. *Pesqui Odontol Bras.*, v. 17, n. 2, p. 147-50, apr.-jun., 2003.

DJURIC, M. et al. Prevalence of oral herpes simplex virus reactivation in cancer patients: a comparison of different techniques of viral detection. *J Oral Pathol Med*, v. 38, p.167–173, 2009.

DREYFUS, D. H. Herpesviruses and the microbiome. *Allergy Clin Immunol*, v. 132, n. 6, p. 1278 – 1286, dec., 2013.

EILERS, J.; MILLION, R. Prevention and management of oral mucositis in patients with cancer. *Semin Oncol Nurs.*, v. 23, n. 3, p. 201-12, aug., 2007.

EPSTEIN, J. B. et al. The role of salivary function in modulating chemotherapy-induced oropharyngeal mucositis: A review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 94, n. 1, p. 39-44, jul., 2002.

EPSTEIN, J. B.; HANCOCK, P. J.; NANTEL, S. Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: An outcome-based analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 96, n. 2, p. 154-63, aug., 2003.

EPSTEIN, J. B.; SHERLOCK, C. H.; WOLBER, R. A. Oral manifestations of cytomegalovirus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*, v. 75, n. 4, p. 443-51, apr., 1993.

FARIAS, M. G. *Caracterização molecular e imunofenotípica de 35 casos de leucemia linfóide aguda pediátrica*. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

FATAHZADEH, M.; SCHWARTZ, R. A. Human herpes simplex virus infections. *J Am Acad Dermatol*, v. 57, p. 737-63, nov., 2007.

FONSECA, M. *Análise da colonização bucal de crianças com 2 a 16 meses de idade por espécies não hemolíticas do gênero Streptococcus*. 2012. 41 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba. 2012.

GALVÃO, R. S. ; FERREIRA, L. C. L. ; SILVA, R.P . Detecção Molecular de vírus Herpes, Espten-Barr e Citomgalovirus na mucosa anal em pacientes HIV+ atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. RESUMO EXPANDIDO-ANAIS DO PAIC, FMTAM, p. 12 - 12, 01 mar. 2010.

GBTLI-LLA-2009. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na infância. Coordenadores: Silvia R. Brandalise, Vitória Régia Pinheiros e Maria Lúcia M Lee. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Campinas, 2009. *Disponível no Departamento de Atendimento ao Paciente/HEMOAM. Manaus, 2011.*

GBTLI-LLA-99. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na infância. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Campinas, 2000.

GONZÁLEZ GRAVINA, H. et al. Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of Candida spp. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 12, n. 6, p. 419-23, oct., 2007.

GUIMARÃES, J. L. M.; ROSA, D. D. *Rotinas em Oncologia*. Porto Alegre: Artmed, 2008. 942 p.

HALENIUS, A.; HENGEL, H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. *Biomed Res Int.*, v. 2014, p. 1-15, 2014.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível no site <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>> Acesso em março de 2014.

LYNCH, D. P. Oral viral infections. *Clin Dermatol.*, v. 18, n. 5, p. 619-28, sep.-oct., 2000.

McCARTHY, G. M. et al. Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-Fluorouracil. *Oral Oncology*, v. 34, p. 484-90, 1998.

MCNALLY, R. J. Q.; EDEN, T. O. B. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol.*, v. 127, n. 3, p. 243-63, nov., 2004.

MENDONÇA, R M H. *Associação entre a presença de microorganismos da microbiota bucal e a intensidade da mucosite bucal, em pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda, submetidos ao tratamento antineoplásico*. 2008. 120 f. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e Adolescente) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.

MENDONÇA, R. M. et al. Prospective evaluation of HSV, *Candida* spp., and bucal bacteria on the severity of oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer*, v. 20, n. 5, p. 1101-7, may, 2012.

MORAIS, E. F. et al. Oral manifestations resulting from chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Braz J Otorhinolaryngol*, v. 80, n. 1, p. 78-85, jan.-fev., 2014.

NAPEÑAS, J. J. et al. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 103, p. 48-59, 2007.

NISCOLA, P. et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haematologic*, v. 92, p. 222-31, 2007.

OGATA, M. High Incidence of Cytomegalovirus, Human Herpesvirus-6, and Epstein-Barr Virus Reactivation in Patients Receiving Cytotoxic Chemotherapy for Adult T Cell Leukemia. *J Med Virol*, v. 83, n. 4, p. 702-9, apr., 2011.

OLIVEIRA LULA, E. C. et al. Chemotherapy-induced oral complications in leukemic patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.*, v. 71, n. 11, p. 1681-5, nov., 2007.

OTMANI N. et al. Determinants of severe oral mucositis in paediatric cancer patients: a prospective study. *Int J Paediatr Dent*, v. 21, n. 3, p. 210-6, may, 2011.

- POVEDA-RODA, R. et al. Bacteremia originating in the oral cavity. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 1, n. 13, p.55-62, jun., 2008.
- PUI, C. H. et al. Improved prognosis for older adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.*, v. 1, n. 29, p. 386-91, feb., 2011.
- PUI, C. H. et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood.*, v. 120, n. 6, p. 1165-74, aug., 2012.
- PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, v. 371, p.1030-43, mar., 2008.
- RÜPING, M. J. G. T. et al. Association of HSV reactivation and pro-inflammatory cytokine levels with the severity of stomatitis after BEAM chemotherapy and autologous SCT. *Support Care Cancer*, v. 19, p. 1211–16, 2011.
- SADASIVAN, R. Chemotherapy-induced Oral Mucositis. *US Oncological Review*, v. 6, n.1, p. 13-16, 2010.
- SAHIN, F. et al. Detection of herpes simplex virus type 1 in addition to Epstein–Bar virus in tonsils using a new multiplex polymerase chain reaction assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v. 57, n. 1, p. 47-51, jan., 2007.
- SCHLEISS, M. R. Persistent and recurring viral infections: the human herpesviruses. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, v. 39, n. 1, p. 7-23, jan., 2009.
- SCHUSTER, V. KRETH H. W. Epstein-Barr virus infection and associated diseases in children. II. Pathogenesis, epidemiology and clinical aspects. *Eur J Pediatr.*, v. 151, n. 10, p. 718-25, oct., 1992.
- SILVERMAN, L. B. et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985–2000). *Leukemia*, v. 24, n. 2, p. 320–34, feb., 2010.
- SLOTS, J. et al. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J Periodontal Res.*, v. 41, n. 4, p. 235-44, aug., 2006.
- SMITH, D. J. et al. Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol Immunol.*, v. 8, n. 1, p. 1-14, feb., 1993.
- SOARES, A. F. et al. Frequency of Oral Mucositis and Microbiological Analysis in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated with 0.12% Chlorhexidine Gluconate. *Braz Dent J.*, v. 22, n. 4, p. 312-16, 2011.
- SONIS, S. T. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral Oncol*, v. 45, n. 12, p. 1015-20, dec., 2009.
- SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 277-84, apr., 2004.
- SPEAR, P. G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cellular Microbiology*, v. 6, n. 5, p. 401–10, 2004.

STANULLA, M.; SCHRAPPE, M. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Semin Hematol*, v. 46, p. 52–63, 2009.

STONE, R.; FLIEDNER, M. C.; SMIET, A. C. M. Management of oral mucositis in patients with câncer. *Eur J Oncol Nurs.*, v. 9, S24-32, 2005.

STRICK, L. B; WALD. A. Diagnostics for Herpes Simplex Virus is PCR the New Gold Standard? *Mol Diagn Ther.*, v. 10, n. 1, p. 17-28, 2006.

TINCANI, A. et al. Novel aspects of Sjögren's syndrome in 2012. *BMC Med.*, v. 11, p. 1-7, apr., 2013.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, v. 114, n. 5, p. 937-51, jul., 2009.

WALD, A. et al. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis.*, v. 188, n. 9, p. 1345-51, oct., 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979. *Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. World Health Organization, Switzerland: Geneva, 1979. E-book disponível no site < <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241700483.pdf>> Acesso em maio/2013.

YE, Y. et al. Oral bacterial community dynamics in paediatric patients with malignancies in relation to chemotherapy-related oral mucositis: a prospective study. *Clin Microbiol Infect.*, v. 19, n. 12, dec., 2013.

APÊNDICE A


 UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Análise da microbiota bucal de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda.

Pesquisador responsável: Juliana Maria Souza de Oliveira.

Telefone para contato: (92)98128-4997 **email:** juctbmf@gmail.com

Local da coleta de dados: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e Ambulatório da Faculdade de Odontologia da UFAM.

Nº Ficha: _____

Prezado (a):

As informações abaixo têm por finalidade esclarecer e pedir a participação voluntária do menor, pelo qual você é responsável, nesta pesquisa que será realizada pela Faculdade de Odontologia da UFAM em parceria com a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a participação é importante.

É importante sua ciência de que esta pesquisa está sujeita a Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Objetivo do estudo: Essa pesquisa tem como objetivo avaliar alterações nos tecidos moles da boca dos pacientes pediátricos com diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), e outras situações que pretendemos descobrir. Esse conhecimento poderá nos ajudar a melhorar a condição de saúde bucal, na redução das consequências da doença e na melhoria na qualidade de vida.

Procedimentos. Faremos uma análise da boca do menor para identificação e descrição dos sintomas, que chamamos de manifestações orais. Analisaremos as mucosas, lábios, língua, gengiva, bochecha e o céu da boca, além dos dentes. Realizaremos a coleta de saliva e esfregaço (raspado) da boca nas diferentes fases do tratamento quimioterápico, fazendo um acompanhamento do menor desde sua entrada até o final do tratamento.

Fotografias. Caso haja necessidade, tiraremos fotos dessas alterações para ilustração sempre com o seu consentimento. Essas fotos poderão ser publicadas, circuladas ou apresentadas em meios específicos, como congressos com a finalidade científica. Não se preocupe que a identidade do menor é sigilosa e será sempre preservada.

Riscos Associados ao estudo. Esta pesquisa não oferece risco físico aos participantes, uma vez que os exames realizados são procedimentos não invasivos, representado somente por exame clínico, coleta de saliva e esfregaços da mucosa bucal. Os participantes não sofrerão exposição ao público, sendo suas identidades mantidas em sigilo. O menor será acompanhado por especialistas em diagnóstico bucal durante seu tratamento, sendo utilizadas medidas intervencionais, quando necessárias, para com a mucosite e infecções microbiológicas, esperando-se proporcionar uma melhora na qualidade de vida desses pacientes.

Benefícios. Além do benefício adicional do diagnóstico de alterações presentes na boca, o menor será acompanhado por especialistas em diagnóstico bucal durante o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda e tratado caso apresente alguma condição bucal limitante.

Confiabilidade e avaliação dos registros. A autorização das instituições neste estudo será confidencial. Os registros serão exclusivos dos participantes do projeto. A identidade do menor permanecerá sempre em confidencialidade de acordo com as normas/leis legais regulatórias de proteção nacional e internacional.

Após essas considerações, você declara que:

Autorização. Recebi e entendi todos os esclarecimentos, e concordo como responsável pelo menor _____ na sua participação nesta pesquisa.

Direito a retirada do estudo. Entendo que a desistência não causará nenhum prejuízo à saúde ou bem estar físico do menor, com isso não virá a interferir no atendimento ou tratamento médico.

Participação voluntária. Compreendo que a participação neste estudo é voluntária. Não será dada nenhuma remuneração e nenhum tipo de recompensa nesta pesquisa, assim como despesas, sendo a autorização à participação do menor de caráter voluntário.

Consentimento pós-informação. É por estar devidamente informado sobre o conteúdo deste termo, livremente, expresse meu consentimento para a inclusão do menor como sujeito nesta pesquisa.

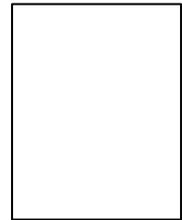
Após ler as informações aqui citadas e ter minhas dúvidas esclarecidas pelo pesquisador.

- () **ACEITO** a participação nessa pesquisa
- () **NÃO ACEITO** participação nessa pesquisa.

Manaus, _____ de _____ de _____.

Pesquisador Responsável

Representante legal



Impressão do dedo polegar
Caso não saiba assinar

APÊNDICE B



 UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO DO MENOR

Título: Análise da microbiota bucal de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda

Pesquisador responsável: Juliana Maria Souza de Oliveira

Telefone para contato: (92)98128-4997 **email:** juctbmf@gmail.com

Local da coleta de dados: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e Ambulatório da Faculdade de Odontologia da UFAM.

Nº Ficha: _____

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **Análise da microbiota bucal de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda**. Nesta pesquisa iremos avaliar alterações nos tecidos moles da sua boca e outras situações que pretendemos descobrir, que possa estar relacionado ao seu diagnóstico.

Faremos uma análise da sua boca para identificação e descrição dos sintomas, que chamamos de manifestações orais. Analisaremos as mucosas, lábios, língua, gengiva, bochecha e o céu da boca, além dos dentes. Realizaremos a coleta de saliva e esfregaço (raspado) da boca nas diferentes fases do tratamento quimioterápico, fazendo um acompanhamento desde sua entrada até o final do tratamento.

Esta pesquisa oferece risco mínimo, pois os exames realizados são procedimentos não invasivos, representado somente por exame clínico, coleta de saliva e esfregaços da mucosa bucal. Você não sofrerá exposição ao público, sendo sua identidade mantida em sigilo.

Além do benefício adicional do diagnóstico de alterações presentes na boca, você será acompanhado por especialistas em diagnóstico bucal durante o tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda e tratado caso apresente alguma condição bucal limitante.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido(a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. O responsável por você poderá retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido(a) pelo pesquisador.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ **(se já tiver documento)**, fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas *dúvidas*.

Manaus, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do (a) pesquisador (a) responsável

Assinatura do (a) menor

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:
Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas – CEP/UFAM
Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM
Fone: (92) 3305-1181 Ramal 2004 / (92) 9171-2496
E-mail: cep@ufam.edu.br - cep.ufam@gmail.com

APÊNDICE C

ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

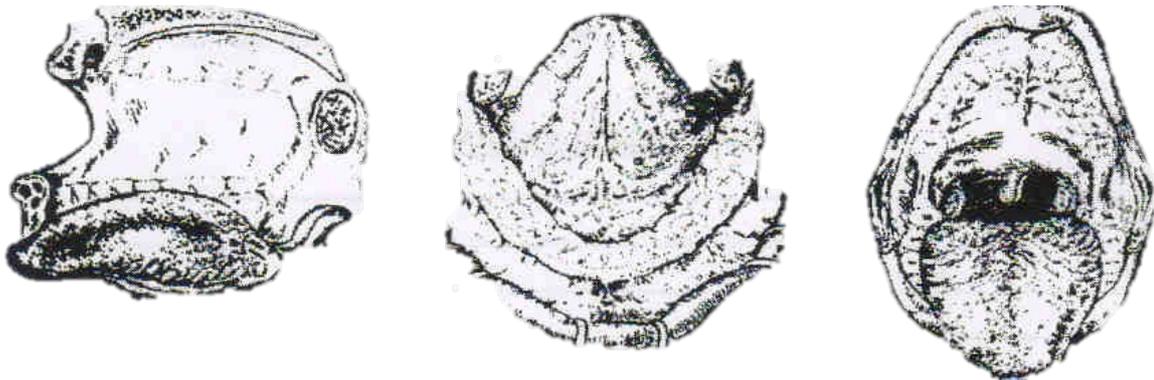


Identificação

Número do registro do HEMOAM: _____
 Número do registro no estudo: _____
 Nome: _____
 Sexo: ____ Raça: _____ Data de entrada: _____
 Data e local de Nascimento: _____ Idade: _____ Grupo: 1() 2 ()
 Endereço: _____
 Diagnóstico: _____
 História oncológica familiar: _____
 Tipo de tratamento: _____
 Protocolo de tratamento: _____

Está em tratamento Quimioterápico: Sim () Não ()
 Fase do tratamento:
 Indução () _____
 Consolidação () _____
 Manutenção () _____

Dados Clínicos:



Descrição do aspecto intra-oral da mucosite e outras lesões orais

Classificação do grau da mucosite segundo a OMS:

Grau 1 () _____
 Grau 2 () _____
 Grau 3 () _____
 Grau 4 () _____

Observações e Quimioterápicos utilizados:

APÊNDICE D

FORMULÁRIO PARA A COLETA DE DADOS

“ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM LEUCEMIA”

Pesquisador(a): Juliana Maria Souza de Oliveira.
Orientador(a): Profa. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura.
Co-orientador(a): Profa. Dra. Juliana Vianna Pereira.

Número do registro do HEMOAM:

Número do registro no estudo:

Data de entrada:

Nome: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Diagnóstico: _____

História oncológica familiar: _____

Fase do tratamento:

Indução () _____

1. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

2. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

3. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

Mucosite bucal: () SIM () NÃO

Classificação da mucosite:

| | |
|------------|------------|
| () Grau 0 | () Grau 4 |
|------------|------------|

| | |
|------------|-----------------------|
| () Grau 1 | () Mucosite moderada |
|------------|-----------------------|

| | |
|------------|---------------------|
| () Grau 2 | () Mucosite severa |
|------------|---------------------|

| |
|------------|
| () Grau 3 |
|------------|

Agentes fúngicos encontrados: _____

Agentes bacterianos encontrados: _____

Presença de HSV-1 em PCR convencional?

Consolidação () _____

1. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

2. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

3. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

Mucosite bucal: () SIM () NÃO

Classificação da mucosite:

| | |
|------------|------------|
| () Grau 0 | () Grau 4 |
|------------|------------|

| | |
|------------|-----------------------|
| () Grau 1 | () Mucosite moderada |
|------------|-----------------------|

| | |
|------------|---------------------|
| () Grau 2 | () Mucosite severa |
|------------|---------------------|

| |
|------------|
| () Grau 3 |
|------------|

Agentes fúngicos encontrados: _____

Agentes bacterianos encontrados: _____

Presença de HSV-1 em PCR convencional?

Manutenção () _____

1. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

2. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

3. __/__/__ Medicamentos administrados: _____

Mucosite bucal: () SIM () NÃO

Classificação da mucosite:

| | |
|------------|------------|
| () Grau 0 | () Grau 4 |
|------------|------------|

| | |
|------------|-----------------------|
| () Grau 1 | () Mucosite moderada |
|------------|-----------------------|

| | |
|------------|---------------------|
| () Grau 2 | () Mucosite severa |
|------------|---------------------|

| |
|------------|
| () Grau 3 |
|------------|

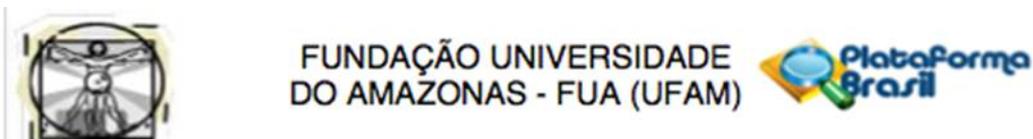
Agentes fúngicos encontrados: _____

Agentes bacterianos encontrados: _____

Presença de HSV-1 em PCR convencional?

Assinatura do (a) pesquisador (a)

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E SUA RELAÇÃO COM A GRADUAÇÃO DA MUCOSITE

Pesquisador: Juliana Maria Souza de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30934514.9.0000.5020

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 734.382

Data da Relatoria: 30/07/2014

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante da nova versão apresentada, o presente protocolo de pesquisa atende ao que regulamenta a Resolução 466/12 - CNS, não havendo, portanto, restrição ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

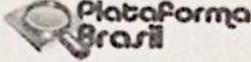
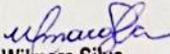
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 31 de Julho de 2014

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

ANEXO B

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|--|--|--|--|------------------------|--|------------------------|---------------|--------------------------|--|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO | |  | | | | | | | | | | | | |
| PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP | | | | | | | | | | | | | | |
| Elaborado pela Instituição Coparticipante | | | | | | | | | | | | | | |
| DADOS DO PROJETO DE PESQUISA | | | | | | | | | | | | | | |
| Título da Pesquisa: ANÁLISE DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E SUA RELAÇÃO COM A GRADUAÇÃO DA MUCOSITE | | | | | | | | | | | | | | |
| Pesquisador: Juliana Maria Souza de Oliveira | | | | | | | | | | | | | | |
| Área Temática: | | | | | | | | | | | | | | |
| Versão: 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| CAAE: 30934514.9.3001.0009 | | | | | | | | | | | | | | |
| Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia | | | | | | | | | | | | | | |
| Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO Financiamento Próprio | | | | | | | | | | | | | | |
| DADOS DO PARECER | | | | | | | | | | | | | | |
| Número do Parecer: 794.862 | | | | | | | | | | | | | | |
| Data da Relatoria: 26/08/2014 | | | | | | | | | | | | | | |
| Situação do Parecer: Aprovado | | | | | | | | | | | | | | |
| Necessita Apreciação da CONEP: Não | | | | | | | | | | | | | | |
| MANAUS, 17 de Setembro de 2014 | | | | | | | | | | | | | | |
| Assinado por: Adriana Malheiro (Coordenador) | |  ADRIANA MALHEIRO Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa / FHEMOAM | | | | | | | | | | | | |
| <table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td colspan="3">Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl D Dir Ens Pesq</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Chapada</td> <td></td> <td>CEP: 69.050-002</td> </tr> <tr> <td>UF: AM</td> <td>Município: MANAUS</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefone: (92)3655-0114</td> <td>Fax: (92)3655-0112</td> <td>E-mail: cep@hemoam.am.gov.br</td> </tr> </table> | | | Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl D Dir Ens Pesq | | | Bairro: Chapada | | CEP: 69.050-002 | UF: AM | Município: MANAUS | | Telefone: (92)3655-0114 | Fax: (92)3655-0112 | E-mail: cep@hemoam.am.gov.br |
| Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl D Dir Ens Pesq | | | | | | | | | | | | | | |
| Bairro: Chapada | | CEP: 69.050-002 | | | | | | | | | | | | |
| UF: AM | Município: MANAUS | | | | | | | | | | | | | |
| Telefone: (92)3655-0114 | Fax: (92)3655-0112 | E-mail: cep@hemoam.am.gov.br | | | | | | | | | | | | |
| Página 05 de 05 | | | | | | | | | | | | | | |
|  Wilmara Silva Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa / FHEMOAM | | | | | | | | | | | | | | |

ANEXO C

PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS FUNGOS E BACTÉRIAS UTILIZADO NO SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK® 2 COMPACT (BIOMÉRIEUX)

1. Cadastrar o paciente no sistema;
2. Retirar os cartões e a solução salina da geladeira para atingir temperatura ambiente (Figura 17);



Figura 17: Representando os cartões (A) e solução salina (B).

Fonte: Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

3. Selecionar as culturas positivas;
4. Identificar dois tubos de ensaio para cada cultura – um para identificação (ID) e outro para teste de susceptibilidade (TSA) – e colocar no cassete;
5. Transferir 3 mL de solução salina para todos os tubos;

6. Calibrar o Densicheck com os padrões 0,0; 0,5; 2,0 e 3;0 (aparelho que mede a escala nefelométrica de McFarland - padrão de turvação que determina a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos - quanto maior o número de bactérias, maior será a opacidade do meio de cultura) (Figura 18);



Figura 18: Calibração do Densicheck.

Fonte: Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

7. Preparar as suspensões nos tubos de ID (culturas positivas na solução salina) e homogeneizar no vórtex (Figura 19);



Figura 19: Preparo da suspensão nos tubos de identificação.

Fonte: Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

8. Inserir os tubos e medir até alcançar um resultado dentro deste intervalo;
9. Depois de preparar todas as suspensões nos tubos de ID, preparar os tubos de TSA;
10. Se a bactéria for GN, transferir 145 μ l com a pipeta vermelha para o tubo de TSA (Figura 20);



Figura 20: Transferência de 145 µl da suspensão preparada no tubo de ID para o tubo de TSA.
Fonte: Imagem cedida gentilmente pelo Laboratório de Microbiologia da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

11. Se a bactéria for GP, transferir 280 µl com a pipeta azul para o tubo de TSA;
12. Se for levedura, transferir 280 µl com a pipeta azul para o tubo de TSA;
13. Colocar os cartões de identificação e antibiograma com cuidado para não tocar no tubo de transferência. Posicioná-los na cassette;
14. Inserir a cassette no Vitek® 2 Compact;
15. Selecionar o número da cassette no sistema, cadastrar os cartões e associá-los aos pacientes cadastrados;
16. Colocar a cassette na porta do lado superior do aparelho e apertar START FILL. A suspensão passará do tubo para os cartões;
17. Passar a cassette para a outra porta no lado inferior;

18. O aparelho fará a leitura dos códigos de barras, cortará os tubinhos e transferência e incubará os cartões no carrossel;
19. Ao terminar, o visor piscará e mostrará REMOVE;
20. Retirar a cassete e descartar os tubos de ensaio;
21. Visualizar os resultados no Vitek® 2 Compact;
22. Imprimir os resultados.