

REGINA MARIA HOLANDA DE MENDONÇA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE
MICROORGANISMOS DA MICROBIOTA ORAL E A
INTENSIDADE DA MUCOSITE ORAL, EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA,
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

i

REGINA MARIA HOLANDA DE MENDONÇA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE
MICROORGANISMOS DA MICROBIOTA ORAL E A
INTENSIDADE DA MUCOSITE ORAL, EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA,
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Saúde da Criança e do Adolescente

Orientadora: Prof^a Dr^a Silvia Regina Brandalise

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M523a Mendonça, Regina Maria Holanda de
Associação entre a presença de microrganismos da microbiota oral e a intensidade da mucosite oral, em pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda, submetidos ao tratamento antineoplástico / Regina Maria Holanda de Mendonça. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Silvia Regina Brandalise
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mucosite. 2. Pediatria. 3. Leucemia. 4. Herpesvirus 1 humano.
5. Bactérias. 6. Candida. I. Brandalise, Silvia Regina. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Relationship between oral microbiota and oral mucositis severity in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia on chemotherapy

Keywords: • Mucositis
• Pediatrician
• Leukemia
• Herpesvirus 1 human
• Bacteria
• Candida

Titulação: Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente
Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Banca examinadora:

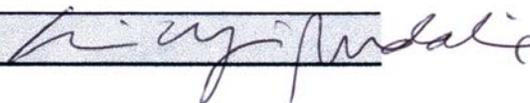
Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise
Prof. Dr. Antônio Fernando Ribeiro
Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro
Profa. Dra. Célia Beatriz Gianotti Antoneli
Prof. Dr. Marcos Martins Curi

Data da defesa: 15 - 02 - 2008

Banca Examinadora da tese de Doutorado

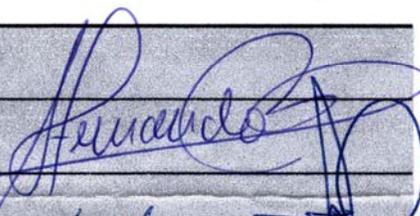
Orientadora:

Profa. Dra. Sílvia Regina Brandalise



Membros:

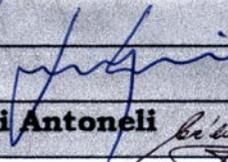
1. Prof. Dr. Antonio Fernando Ribeiro



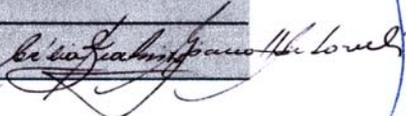
2. Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro



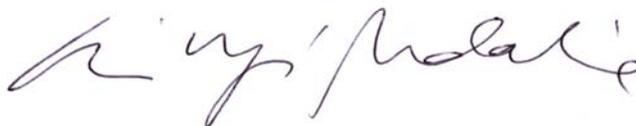
3. Prof. Dr. Marcos Martins Curi



4. Prof.(a) Dr. (a) Célia Beatriz Gianotti Antoneli



**Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**



Data: 2008

Aos meus pais
Antônio Luiz e Alexandrina
que,
com todos os sacrifícios
em nome do amor aos filhos,
com seus ensinamentos,
seu exemplo de trabalho e honestidade,
com amizade e respeito,
deram a oportunidade de buscar
minha realização pessoal e profissional.

Aos meus queridos irmãos
Sandra, Marcelo e Jorge,
irmão de coração,
que sempre confiaram em mim,
apoiando e estimulando,
nunca deixando de demonstrar
o amor e a certeza de que
poderia contar sempre com eles.

E por fim,
mas nunca em último lugar,
ao meu marido Vinicius,
a mais brilhante luz na
mais intensa escuridão.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi construído por muitas mãos, pois tive a felicidade de encontrar muitas pessoas dispostas a me ajudar. Amigos, família, companheiros de trabalho... Por isso, desde já, peço que me perdoem se me esqueci de mencionar alguém.

À Profa. Dra. Silvia Regina Brandalise, minha orientadora neste trabalho, Professora Assistente do Departamento de Pediatria, Diretora do Centro Infantil Boldrini, pela paciência, disposição, confiança, por incentivar o desenvolvimento de nossas idéias e ideais, e por fazer com que eles se tornem ciência.

Aos Professores Dra. Marcela de Araújo e Dr. Carlos Emilio Levy, meus co-orientadores, com admiração, por seu imenso apoio, paciência e incentivo durante a elaboração deste trabalho.

À Sra. Rosângela Aparecida Mendes Silva e Srta. Joseane Morari, pelo inestimável auxílio na execução dos exames diagnósticos, sempre dispostas me ensinarem e a esclarecerem minhas dúvidas, e aos demais colegas dos laboratórios de Biologia Molecular e de Microbiologia do Centro Infantil Boldrini.

Ao Dr. José Andrés Yunes e Dra Juliana Godoy Assumpção, pela disposição nas orientações e por terem me recebido num mundo tão diferente para mim até então, o da biologia molecular.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo/FAPESP, pela avaliação científica e apoio financeiro.

À Dra. Kátia Maria Coutinho Cappellaro, responsável pela Unidade de Odontologia do Centro Infantil Boldrini, pelo carinho, apoio e por acreditar em mim, ofertando-me os primeiros ensinamentos em onco-hematologia pediátrica.

À Dra. Karina de Cássia Braga Ribeiro, pela inquestionável amizade de tantos anos, pelo incentivo ao meu aprimoramento profissional conduzindo-me nos primeiros passos da pesquisa científica.

Aos amigos no Boldrini e do IPEB, pela amizade, carinho e cuidado que sempre demonstraram por mim, com relação a todos os aspectos de minha vida, acadêmica ou pessoal.

À Sra Simone Cristina Ferreira, ex-secretária da Pós Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, do Departamento de Pediatria da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pela seriedade, dedicação, gentileza e atenção destinados durante todo o nosso convívio, conseguindo alcançar o equilíbrio exato entre a eficiência burocrática e o acolhimento carinhoso.

Aos componentes da banca de qualificação, Dr. Antônio Fernando Ribeiro e Dr. José Dirceu Ribeiro, pelos questionamentos fundamentais e pelas valiosas sugestões que muito contribuíram para conclusão desta tese.

Ao Dr. Antônio Batista e demais funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Centro Infantil Boldrini, que em todos os momentos demonstraram a maior disposição para contribuir com a obtenção dos dados e informações de seguimento dos pacientes.

À Sra. Vera Silvia S. Fróes Ficoni, Bibliotecária do Centro Infantil Boldrini, por sua e inesgotável paciência e valiosa ajuda na captação das referências bibliográficas desta tese, sempre com atenção, carinho, presteza e empenho.

Ao Sr. Rui e Sra. Maria Lúcia, meus sogros, por me receberem como a uma filha e por todos os seus esforços para que eu me sentisse realmente em minha casa, dividindo responsabilidades e aliviando os momentos de cansaço.

A todos os meus amigos, antigos ou recentes, pelo apoio, estímulo e por estarem sempre dispostos a auxiliar na realização deste trabalho, dividindo comigo as situações difíceis e a alegria das conquistas, mesmo distantes em alguns momentos.

*"O prazer no trabalho
aperfeiçoa a obra."*

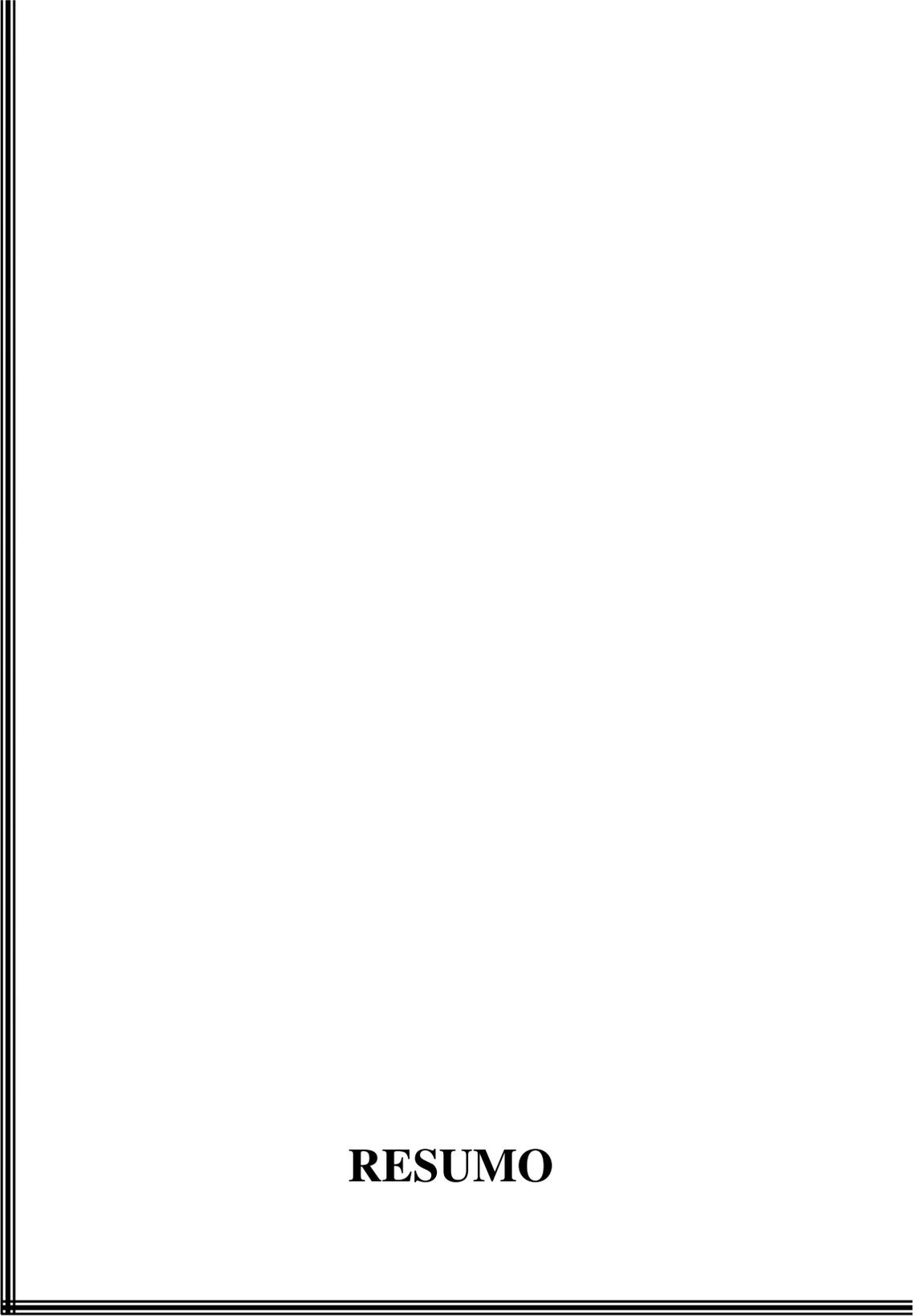
Aristóteles

	Pág.
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxv
1- INTRODUÇÃO	29
2- JUSTIFICATIVAS	51
3- HIPÓTESES	55
4- OBJETIVOS	59
5- CASUÍSTICA E MÉTODO	63
6- ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
7- RESULTADOS	85
8- DISCUSSÃO	103
9- CONCLUSÃO	115
10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
11- ANEXOS	137

LISTA DE ABREVIATURAS

CMV	citomegalovírus
COX-2	cicloxigenase 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	conjunto de quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
IL-1β	interleucina 1 β
IL-6	interleucina 6
HSV	Herpes vírus simples
HSV-1	Herpes vírus simples tipo 1
HSV-2	Herpes vírus simples tipo 2
kbp	1.000 pares de bases nitrogenadas
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
NaCl	cloreto de sódio
NCI	National Cancer Institute
pb	pares de bases nitrogenadas
PBS	tampão fosfato
PCR	reação da polimerase em cadeia
PI	primo infecção
rpm	rotações por minuto
S.D.S.	dodecil sulfato de sódio
S.T.E.	salina-tris-EDTA

TBE	tris/ácido bórico/EDTA
TE	tris-EDTA
TNF-α	fator- α de necrose tumoral
Tris-HCl	tris/ácido clorídrico
TMO	Transplante de medula óssea
UFC	unidades formadoras de colônias
UV	luz ultravioleta
1X	diluição de uma vez



RESUMO

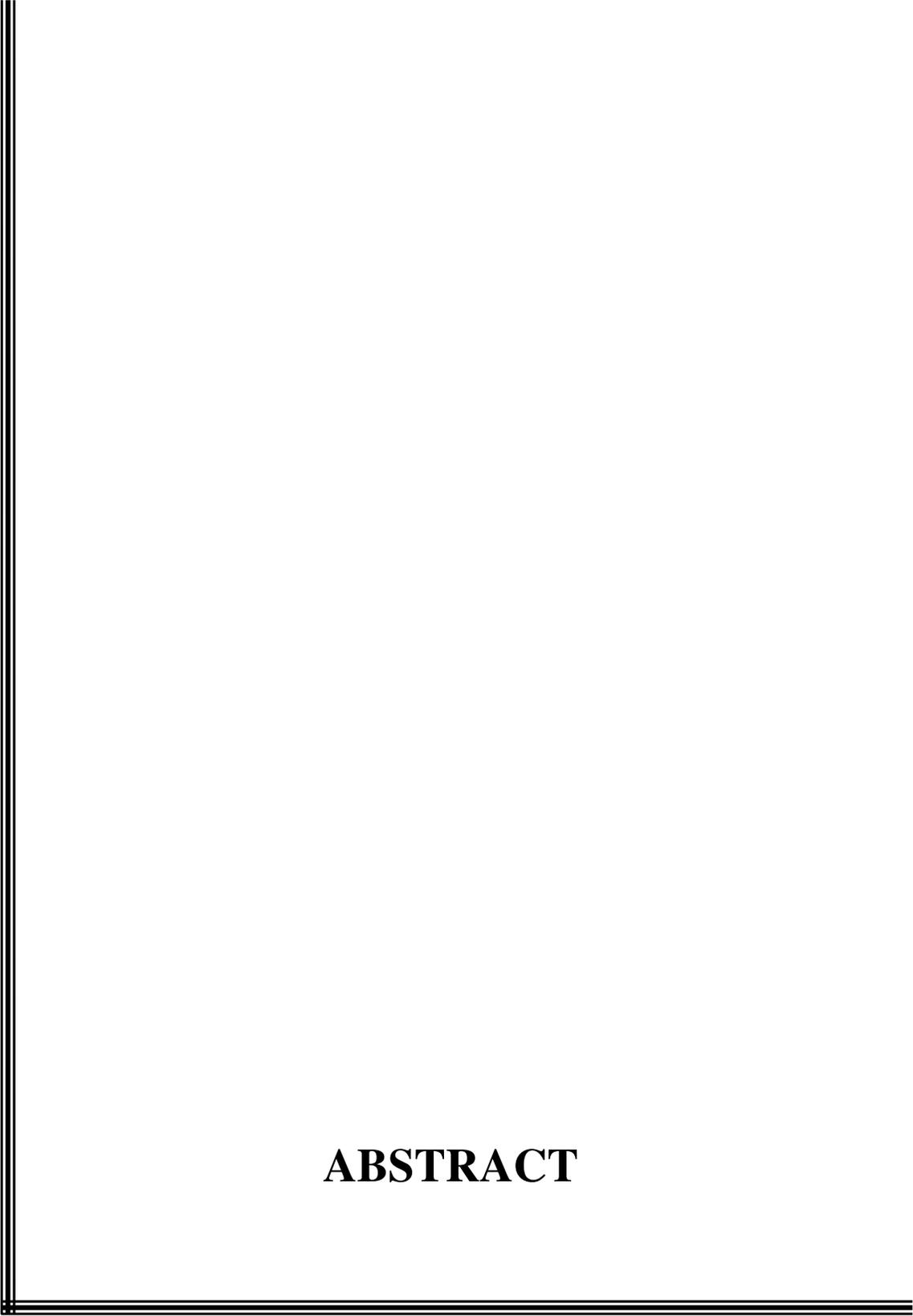
ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE MICROORGANISMOS DA MICROBIOTA ORAL E A INTENSIDADE DA MUCOSITE ORAL, EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO

Introdução: Dentre os efeitos secundários à quimioterapia, a mucosite oral é um dos mais freqüentes. Entre os fatores que contribuem para esta susceptibilidade estão a alta taxa de renovação celular e a presença dos microorganismos, que encontram na cavidade oral condição propícia para sua instalação. **Objetivos:** Analisar a associação entre grau de mucosite e a presença de *HSV-1* (*herpes simplex vírus tipo 1*), *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes com Leucemia Linfóide Aguda, em quimioterapia. O segundo objetivo foi calcular o risco para os diferentes graus de mucosite, relacionados à presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral nesta população. **Método:** Estudo prospectivo, unicêntrico, realizado no período de agosto de 2005 a outubro de 2006. Foram estudados 71 casos consecutivos de crianças com diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda, tratados de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99. A avaliação do grau de mucosite foi feita segundo critérios do *National Cancer Institute*. As análises da microbiota oral foram realizadas no 14° dia da terapia de Indução (D14) e 56° dia, na fase de Intensificação. A identificação do *HSV-1* foi realizada pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). A identificação de bactérias e fungos, por testes bacterioscópicos e de cultivo. A análise da associação entre os elementos estudados e a intensidade de mucosite foi feita pelo teste exato de Fisher. O *odds ratio* foi calculado por regressão logística. O nível de significância foi de 5%. **Resultados:** No D14 foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o grau da mucosite e a presença de *HSV-1* ($p < 0,0001$), bem como *Candida spp* ($p = 0,0078$) e total de colônias de *Candida spp* ($p = 0,0012$). No D56 foi encontrada associação significativa entre o grau da mucosite e a positividade do *HSV-1* no D14 ($p < 0,0001$), a presença de *HSV-1* no D56 ($p < 0,0001$) e o número de colônias de *Candida spp* no D56 ($p = 0,0247$). No D14 foram considerados fatores de risco para aumento do grau da mucosite, a presença do *HSV-1* (OR=65; IC=95%) e *Candida spp* (OR=15; IC=95%). No D56 os fatores de risco foram a presença do *HSV-1* no D14 (OR=54; IC=95%) e a presença de *HSV-1* no D56 (OR=57; IC=95%).

Dentre os diferentes grupos das bactérias encontradas nos D14 e D56, o *Streptococcus viridans* foi identificado em 100% dos pacientes, em ambos momentos.

Conclusões: A presença do *HSV-1* e da *Candida spp* esteve associada ao grau da mucosite, nos momentos avaliados. Não se observou associação entre a presença dos distintos grupos bacterianos e o agravamento da mucosite oral.

Palavras-chave: Mucosite oral, pediatria, leucemia, Herpesvirus 1 humano, bactérias, *Candida*



ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN ORAL MICROBIOTA AND ORAL MUCOSITIS SEVERITY IN PEDIATRIC PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA ON CHEMOTHERAPY

Introduction: Oral mucositis is the most common side-effect related to chemotherapy. Oral microbiota and high cellular turn over of oral epithelium are contributing factors for mucositis. **Objective:** This study was designed to verify the associations of HSV-1(*herpes simplex virus*), *Candida spp* and oral bacterial presence in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) while on chemotherapy, and oral mucositis. The second objective was to calculate the odds ratio (OR) for oral mucositis grade in this population. **Methods:** A prospective study was conducted from August 2005 to October 2006 in one single center. Seventy one consecutive cases of children diagnosed with ALL were studied. The mucositis severity degree was done according to NCI Criteria. Oral microbiota analyses were performed on D14 and D56 of cancer therapy. *HSV-1* identification was performed by PCR. Bacteria and fungus identification were obtained by standard bacteriology and cultivation tests. Fisher's exact test was used for analysis of the association analysis among the microorganisms and the mucositis grade. The OR was calculated by logistic regression. The significance level was 5%. **Results:** On D14 there was a significant association between mucositis grade and the HSV-1 presence ($p < 0.0001$), as well as, *Candida spp* ($p = 0.0078$) and *Candida spp* colony numbers ($p = 0.0012$). On D56 there was a significant association between mucositis grade and HSV-1 presence at D14 ($p < 0.0001$), *HSV-1* presence at D56 ($p < 0.0001$) and *Candida spp* colony numbers at D56 ($p = 0,0247$). On D14 the risks factors associated with an increase of the mucositis grade were *HSV-1* presence (OR=65; IC=95%) and *Candida spp* (OR=15; IC=95%. On D56 the risk factors for mucositis were *HSV-1* presence at D14 (OR=54; IC=95%) and *HSV-1* presence at D56 (OR=57; IC=95%). Among the different groups of bacteria evaluated on D14 and D56, *Streptococcus viridans* occurred in 100% of all cases in both time points. **Conclusion:** *HSV-1* and *Candida spp* presence was associated with mucositis grade on the evaluated time treatment intervals. There was no association between bacteria groups and oral mucositis severity.

Keywords: oral mucositis, pediatrics, leukemia, Herpesvirus 1 human, bacteria, *Candida spp*

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas observou-se aumento das taxas de cura dos tumores malignos que ocorrem no grupo etário pediátrico (**BITSKO et al., 2007; BRENNER et al., 2007; EARLE & EISER, 2007**). A terapia antineoplásica utilizada para o tratamento do câncer envolve três modalidades: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, cada uma delas contribuindo com determinado risco de complicações infecciosas (**PIZZO et al., 2006**).

Dentre os agravos secundários à quimioterapia, a mucosite oral é efeito colateral bastante comum (**CHENG et al., 2001; LUGLIE et al., 2002; CLARKSON et al., 2003**). A prevalência da mucosite oral em pacientes submetidos ao tratamento de neoplasias malignas é estimada entre 25,1 e 57% (**DODD et al., 2000; BARASCH & PETERSON, 2003; NAIDU et al., 2004; GANDEMER et al., 2007; CRUZ et al., 2007; RUIZ-ARGÜELLES et al., 2007**). Nos pacientes com Leucemia Linfóide Aguda (LLA) este efeito secundário é relatado com frequência variável entre 18 a 33% (**ROJAS DE MORALES et al., 2001; WANANUKUL et al., 2005; RAMPHAL et al., 2007**). A inflamação das mucosas, com frequência provoca dor e diminuição da qualidade de vida. Além disso, as morbidades secundárias à mucosite podem interferir na terapia oncológica, levando à suspensão do tratamento até que as complicações sejam resolvidas. Podem proporcionar dificuldades na aderência ao tratamento (**ELTING et al., 2003**).

As infecções relacionadas a quadros de mucosite podem ser localizadas ou sistêmicas, quando ocorre a migração de bactérias ou fungos da cavidade oral para outros sítios corporais (**GABRIEL et al., 2003; EPSTEIN et al., 2003**).

1.1- Aspectos clínicos e patogênicos da mucosite oral

Clinicamente, a mucosite oral pode manifestar-se como área eritematosa, descamação da mucosa, ulceração, sangramento e/ou exudato. A mucosa não queratinizada do palato mole, mucosa jugal, lábios, superfície ventral da língua e o assoalho de boca são as áreas mais vulneráveis à estomatotoxicidade direta. Outras regiões, como gengiva,

dorso lingual e palato duro são menos afetadas, provavelmente devido ao seu menor índice de renovação celular (**KÖSTLER et al., 2001; DONNELLY et al., 2003a**). Na tentativa de minimizar estes efeitos, as propostas de tratamento encontradas na literatura variam desde o uso de soluções para bochechos orais, até a utilização de fatores de crescimento hematopoéticos (**STIFF, 2001; DAZZI et al., 2003; DONNELLY et al., 2003b; SONIS et al., 2004; NAPENAS et al., 2007a; EILERS & MILLION, 2007**).

Em função da alta taxa de renovação celular, a mucosa oral torna-se especialmente susceptível aos efeitos das terapias antineoplásicas e, em especial, à quimioterapia (**SQUIER, 1990**). Alterações na integridade da mucosa, da microbiota oral e na composição salivar, são relacionadas à etiopatogenia e a graus de intensidade da mucosite (**BLIJLEVENS et al., 2000; KANDA et al., 2000; AQUERRETA et al., 2002; SONIS et al., 2004**). São divergentes os dados publicados referentes à influência da idade sobre o desenvolvimento da mucosite oral induzida pela quimioterapia. **KEEFE (2007a)** sugeriu que idades extremas, baixas ou altas, podem ser consideradas fatores de risco para maior intensidade da mucosite, ponderando, entretanto, existirem poucas evidências que confirmem essa hipótese. Outro estudo demonstrou que os pacientes mais jovens submetidos aos agentes quimioterápicos apresentavam aumento no risco de desenvolverem mucosites (**WILKES, 1998**). As hipóteses para este fato se fundamentaram em taxa maior de renovação celular nas crianças e adolescentes (**GRAHAM et al., 1993**) e maiores quantidades de receptores para fator de crescimento epidérmico, no epitélio de indivíduos mais jovens (**SONIS et al., 1992**).

A patogenia da mucosite relacionada à quimioterapia pode ser baseada nos efeitos citotóxicos, diretos ou indiretos, dos agentes quimioterápicos sobre a mucosa oral (**NISCOLA et al., 2007**), devendo-se considerar a ação adicional dos microorganismos, exarcebando a gravidade das lesões, principalmente quando se leva em consideração a grande variedade de microorganismos presentes na cavidade oral. Nos pacientes pediátricos com câncer, outros agentes patogênicos, incluindo os oportunistas, devem ser lembrados nos processos infecciosos, inclusive as mucosites. No ANEXO I (pg. 121) estão distribuídos os patógenos mais comuns envolvidos nas infecções das crianças com doenças malignas.

A mucosite é um processo complexo, envolvendo os tecidos e elementos celulares das mucosas, havendo evidências de que a gravidade desta inflamação pode ser determinada por fatores genéticos. A resposta à agressão na barreira mucosa pode ser didaticamente dividida em cinco fases: iniciação, regulação, sinalização/amplificação, ulceração e reparo (SONIS et al., 2004). A seguir, resumidamente está apresentada a caracterização de cada fase da fisiopatogenia da mucosite, de acordo com SONIS et al. (2004).

Fase 1- Iniciação

A radioterapia e a quimioterapia causam danos ao DNA nas células da camada basal do epitélio e geram espécies reativas de oxigênio.

Fase 2- Regulação

Nesta fase, múltiplos eventos acontecem simultaneamente. Ocorre ativação da via ceramida, causando apoptose e o início da cascata de eventos submucosos. Fatores oxidativos causam a destruição do DNA levando à morte celular. A ativação de fatores de transcrição em resposta aos fatores oxidativos, quimioterapia ou radioterapia, resulta em super-regulação gênica, incluindo os genes fator- α de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas IL-1 β e IL-6, levando ao dano tecidual e apoptose das células da submucosa e das células da camada basal do epitélio. Outros genes são super-regulados, gerando a expressão de moléculas de adesão, cicloxigenase-2 (COX-2) e subsequente angiogênese.

Fase 3- Amplificação do sinal

Citocinas pró-inflamatórias exercem função indireta na amplificação dos danos à mucosa. Os danos, nesta fase, estão representados na submucosa e camada basal do epitélio, onde clinicamente a aparência da mucosa é normal.

Fase 4- Ulceração

É resultante da citotoxicidade nas células da camada basal, caracterizando-se por alterações atróficas que culminam com ulceração. A presença de macrófagos representa a resposta inflamatória intermediária. Nesta fase, ocorre a colonização bacteriana ou fúngica, que vai ativar os macrófagos teciduais, aumentando as citocinas pró-inflamatórias, as quais vão acelerar e amplificar os danos teciduais.

Fase 5- Cicatrização

Inicia-se com a sinalização da matriz extra-celular, levando à renovação do epitélio, diferenciação e restabelecimento da microbiota.

A mucosite oral é resultante do efeito inibitório direto dos quimioterápicos sobre a replicação e proliferação das células da mucosa, que promove a redução na capacidade de renovação da camada basal do epitélio. Esses eventos propiciam a atrofia da mucosa, diminuição acentuada da produção de colágeno e eventual ulceração (**LOCKHART & SONIS, 1981**). A liberação de substâncias no tecido conjuntivo que exacerbam a resposta inflamatória somam-se às alterações epiteliais, completando a patogênese da mucosite. Os efeitos tóxicos da quimioterapia sobre a mucosa oral iniciam-se logo após sua administração, atingindo o pico de intensidade entre o 7º e 10º dia após o início do ciclo da quimioterapia, com resolução ocorrendo em menos de duas semanas (**SONIS & CLARK, 1991**).

A ação dos agentes citotóxicos leva à quebra das barreiras mucosas e mielossupressão associada, comprometendo a capacidade do paciente de resistir à entrada de patógenos como vírus, bactérias e fungos, aumentando o risco de disseminação das infecções (**PIZZO, 1984; CHIAPPELLI, 2005**).

1.2- Agentes microbiológicos envolvidos na mucosite oral

A imunossupressão secundária ao tratamento quimioterápico favorece a ocorrência de infecções por agentes oportunistas, como por exemplo, fungos e vírus.

1.2.1- Agentes virais envolvidos na mucosite oral

Dentre os agentes virais relacionados a infecções em pacientes com doenças oncológicas, destaca-se o vírus *Herpes simplex 1 (HSV-1)*. O *HSV-1* é um vírus de DNA extremamente freqüente na população geral, com incidência variando entre 30 e 50% em grupos de alto nível socioeconômico e entre 80 a 100% em grupos com baixo nível socioeconômico (**STUART-HARRIS, 1983**).

Nos pacientes submetidos à quimioterapia, é o agente viral encontrado com maior freqüência nas lesões da mucosa oral (**ALEXANDER et al., 2002**). Em relatório publicado em 1990, o *National Cancer Institute (NCI)*, nos Estados Unidos, concluiu que 37 a 68% dos pacientes com LLA ou outros tipos de doenças oncológicas recebendo tratamento com quimioterapia apresentavam reativação do *HSV-1* durante os períodos de imunossupressão, e que esses episódios eram associados a ulcerações na mucosa oral. Nos pacientes imunocomprometidos as mucosites associadas ao *HSV-1* são mais dolorosas, graves e de resolução prolongada, comparativamente às mucosites sem relação com este agente viral (**SQUIER, 1990**).

MONTGOMERY et al. (1986) relataram que 48% das lesões da mucosa oral em pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico estavam relacionadas à presença do *HSV-1*. Estas lesões ocorriam com maior freqüência nos pacientes que haviam realizado o transplante de medula óssea (TMO). **CARREGA et al. (1994)** avaliaram a ocorrência de úlceras orais em 20 crianças submetidas à quimioterapia. Isolaram o *HSV-1* em 50% das lesões ulceradas, mas não demonstraram a relação causal entre o surgimento das lesões e a presença do *HSV-1*. Os autores sugerem que outros fatores, como infecção bacteriana ou fúngica, toxicidade do agente quimioterápico e neutropenia deveriam ser considerados na etiopatogenia das lesões. Estudando 18 pacientes adultos, **BERGMANN et al. (1990)** concluíram que a presença do *HSV-1* pode estar associada à ocorrência da mucosite oral; no entanto ressaltaram que outros fatores, como trauma local, devem ser considerados como contribuintes para a instalação da inflamação nas mucosas, bem como para sua intensidade.

Outros vírus podem ser identificados em células da mucosa oral de pacientes imunossuprimidos. Dentre eles, o *Citomegalovírus (CMV)* foi responsável pelo desenvolvimento de 5 lesões em 7 pacientes que haviam recebido o TMO. As lesões ocorreram em região de língua, com aspecto clínico semelhante às aquelas associadas à mucosite (LOID et al., 1994).

SAMONIS et al. (2000) relataram que infecções virais orofaciais são comuns em pacientes imunocomprometidos. Os autores afirmaram que, embora o *HSV* seja o agente viral mais freqüente, outros vírus como *CMV*, *Varicella-Zoster vírus* e *Epstein-Barr vírus* também podem ser identificados na mucosa oral, chamando a atenção para a necessidade de estudos que identifiquem o papel patogênico desses vírus nas lesões orais desses pacientes.

LAMEY et al., (1989) destacaram, em artigo de revisão, a importância do diagnóstico das infecções virais com manifestação em cavidade oral, nos pacientes imunocomprometidos. Segundo os autores, dois grupos de viroses, relacionadas ao *HSV* e ao *Coxsackie*, são responsáveis pela maioria das infecções por vírus nesta região, manifestando-se clinicamente como úlceras na mucosa, comprometimento das glândulas salivares ou como hiperplasia epitelial. MCCULLOUGH et al., (2005) também apontaram o *Coxsackie* como um dos vírus freqüentemente encontrado na mucosa oral.

1.2.2- Agentes bacterianos envolvidos na mucosite oral

As infecções bacterianas podem causar grande morbidade nos pacientes com doenças oncológicas, submetidos à quimioterapia. Infecções sistêmicas são a maior causa de morbidade e mortalidade em pacientes neutropênicos e, em alguns casos, a cavidade oral é o foco de entrada para bactérias patogênicas (RUESCHER et al., 1998; DUNCAM & GRANT, 2003).

Os componentes bacterianos presentes na cavidade oral apresentam-se de maneira variada e incluem bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, facultativas e microorganismos anaeróbios. Frequentemente estão relacionados a infecções que se manifestam quando há o desequilíbrio entre o hospedeiro e o microorganismo, provocando dor e febre nesses pacientes (PIZZO, 1993).

Lesões orais também podem ser colonizadas por bacilos Gram-negativos, favorecendo o desenvolvimento de bacteremia. Os *Streptococcus* alfa-hemolíticos também podem ter disseminação sanguínea, através da ruptura de membrana mucosa em pacientes com mucosites graves (ELTING et al., 2001).

Na cavidade oral é elevada a frequência do *Streptococcus viridans* (ROZKIEWICZ et al., 2006) estando relacionado às infecções que ocorrem nos pacientes que recebem altas doses de Citarabina, com destaque àquelas em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda (OKAMOTO et al., 2003; HUANG et al., 2007; REILLY & LANGE, 2007). Dentre as bactérias deste grupo, destaca-se uma espécie em particular, a do *Streptococcus mittis*, que está aparentemente associada a episódios de complicações pulmonares após o uso da Citarabina (LUCAS et al., 1997). Estes microorganismos são encontrados em abundância na língua, com produção de enzimas que facilitam a disseminação da infecção (NOLTE, 1977; COHEN et al., 1983; KHAN & WINGARD, 2001). Outra espécie de *Streptococcus* muito frequente na cavidade oral é o *Streptococcus salivarius*, encontrado na saliva e língua, sendo pouco encontrado na placa bacteriana dentária (NOLTE, 1977).

Outra espécie bacteriana que merece destaque é o *Staphylococcus aureus*, encontrado em várias regiões do organismo incluindo a orofaringe, sendo o agente mais comum das infecções piogênicas.

Muitos outros componentes da microbiota oral possuem propriedades patogênicas, podendo causar infecções, que podem manifestar-se quando há o desequilíbrio entre hospedeiro e microorganismo. As diferenças bacteriológicas da cavidade oral de uma pessoa sadia e a de um indivíduo doente são essencialmente quantitativas. A cavidade oral de um indivíduo doente pode conter uma população bacteriana de 5 a 10 vezes maior que a de uma pessoa sadia (MACHADO, 1993).

Recente revisão sobre o assunto examinou o papel da microbiota oral no desenvolvimento da mucosite secundária à quimioterapia, realçando que a incidência e intensidade das inflamações orais estão parcialmente relacionadas a mudanças na microbiota oral (NAPENNAS et al., 2007). Entretanto, nessa revisão não foi possível identificar nenhum modelo ou método para avaliar as mudanças qualitativas ou quantitativas da microbiota oral.

1.2.3- Agentes fúngicos envolvidos na mucosite oral

Os fungos são freqüentemente relacionados a infecções em pacientes com doenças oncológicas (AYERS & COLQUHOUN, 2000). É pouco clara a diferença entre os fungos colonizantes e aqueles patogênicos, com distinção entre colonização pela *Candida spp* e o processo inflamatório da mucosa, com ou sem invasão do tecido conjuntivo, possuindo limites pouco definidos (LACASSE et al., 1990; MALIC et al., 2007).

O gênero *Candida* é, sem dúvida, um dos tipos de leveduras de maior importância no desenvolvimento de infecções hospitalares. É relatada a incidência de 57 a 89% de culturas positivas para espécies de *Candida* nos pacientes com câncer (WILKES, 1998).

Vários tipos de lesões da mucosa oral podem ser causados pela colonização e infecção por espécies de *Candida*, incluindo a candidíase pseudomembranosa, candidíase hiperplásica crônica, candidíase crônica eritematosa e queilite angular, oferecendo grande risco de disseminação sistêmica ao paciente (SQUIER, 1990).

Estudo realizado por SEPÚLVEDA et al. (2005) em 15 crianças submetidas à quimioterapia e que apresentaram úlceras orais, referiram a identificação da *Candida albicans* em 30% das lesões, sem, no entanto, pesquisar a relação entre a intensidade da mucosite e a presença deste microorganismo.

Outros fungos como o *Aspergillus*, o *Histoplasma*, os *Blastomicetos*, podem causar infecções orgânicas graves nos pacientes com câncer, mas estes raramente são responsáveis por alterações na mucosa oral.

NUCCI et al., em artigo de revisão publicado em 2005, afirmaram que cepas de *Aspergillus* são atualmente importantes causas de infecções em pacientes imunossuprimidos.

MYOKEN et al. (2006) isolaram espécies de *Aspergillus* na cavidade oral de 9 pacientes neutropênicos. Os mesmos autores avaliaram 198 pacientes com leucemia aguda e neutropenia. Identificaram 15 casos de infecção gengival por *Aspergillus* (MYOKEN et al., 2002).

O *Histoplasma* é relatado como agente patogênico nas infecções de pacientes com câncer. **ADDERSON (2004)** avaliou 57 pacientes pediátricos com câncer, que apresentaram 61 episódios de histoplasmose. Nenhum dos pacientes foi a óbito em função da histoplasmose, mas a terapia antineoplásica sofreu interferências por conta da infecção.

Segundo **DREIZEN et al. (1992)**, fungos oportunistas que raramente infectam pessoas saudáveis podem causar graves infecções em pacientes imunossuprimidos. A aspergilose é a segunda infecção de maior prevalência em face e boca nestes pacientes.

DIXON et al. (1996) comentaram que populações imunossuprimidas, como os pacientes em tratamento oncológico, apresentam risco elevado para o desenvolvimento de infecções por *Aspergillus*. Essas infecções acarretam grande morbidade e mortalidade nesses indivíduos.

1.3- Aspectos microbiológicos de alguns elementos da microbiota oral

1.3.1- Caracterização do *HSV-1*

A classificação dos vírus em famílias é feita de acordo com a estrutura, composição e forma de replicação. Hierarquicamente, a classificação dos vírus obedece à seqüência: ordem, família, subfamília, gênero, espécie e tipo (**INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES, 2007**).

Todos os vírus contêm material genético (RNA ou DNA) e material protéico (capsídeo). Essas duas estruturas formam o nucleocapsídeo, que pode ser icosaédrico, helicoidal ou de simetria complexa.

Os herpesvírus humanos fazem parte da família *Herpesviridae*. O nome Herpes vem do grego “*Herpein*”, que significa crônico, latente, recorrente. Desde a antiguidade são descritas lesões herpéticas. Contudo, só no século XIX é que se definiram como entidades clínicas, sendo sua etiologia estabelecida (**FERREIRA & SOUSA, 2002**). Estes vírus estão envolvidos nas principais causas de morbidade em humanos e os membros

dessa família induzem grande variedade de doenças, sendo as infecções frequentemente benignas, podendo, entretanto, levar à morte nos doentes imunocomprometidos. Atualmente foram identificadas aproximadamente 130 espécies nesta família (WAGNER & HEWLETT, 1999; FERREIRA & SOUSA, 2002).

A família *Herpesviridae* está dividida em 3 sub-famílias, que se distinguem por suas características virais e estruturais, bem como pelo seu poder patogênico. Somente alguns tipos infectam o ser humano. São eles:

- 1- Sub família *Alphaherpesviridae* (*α-herpesviridae*), que inclui os herpesvírus simples tipos I e II, que são os agentes primários de lesões, respectivamente, faciais e genitais. Inclui também o vírus *Varicela/zóster* (HHV-3).
- 2- Sub família *Betaherpesviridae* (*β – herpesviridae*), que inclui os herpesvírus de tipo 5, 6 e 7.
- 3- Sub família *Gammaherpesviridae* (*γ – herpesviridae*), que inclui os herpesvírus de tipo 4 e 8.

No Quadro 1 estão resumidos os dados da família *Herpesviridae*, que infectam o ser humano.

Quadro 1- Subdivisão da família *Herpesviridae* e os tipos que infectam o ser humano

<i>Alphaherpesvirinae</i>	
<i>Simplexvirus</i>	<i>human herpesvirus 1, 2 (HSV-1, HSV-2)</i>
<i>Varicellavirus</i>	<i>human herpesvirus 3 (VZV)</i>
<i>Betaherpesvirinae</i>	
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>human herpesvirus 5 (CMV)</i>
<i>Muromegalovirus</i>	<i>mouse cytomegalovirus 1</i>
<i>Roseolovirus</i>	<i>human herpesvirus 6, 7 (HHV-6, HHV-7)</i>
<i>Gammaherpesvirinae</i>	
<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>human herpesvirus 4 (EBV)</i>
<i>Rhadinovirus</i>	<i>human herpesvirus 8 (HHV-8)</i>

Microbiology and Immunology on line. University of South Carolina. Disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>. Acesso em 20 de novembro de 2007.

No Quadro 2 apresentam-se resumidamente as células-alvo, os distintos locais de latência, como também as fontes de transmissão dos diferentes sub-tipos da família *Herpesviridae*, que infectam o ser humano.

Quadro 2- Distribuição dos membros da família *Herpesviridae* que infectam o ser humano de acordo com células-alvo, localização no estado de latência e fontes de transmissão.

Tipo	Nome	Sub família	Principais células-alvo	Localização em estado de latência	Fontes de transmissão
1	<i>Herpes simplex-1 (HSV-1)</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Células mucoepiteliais	Neurônio	Contato direto
2	<i>Herpes simplex-2 (HSV-2)</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Células mucoepiteliais	Neurônio	Contato direto, via sexual
3	<i>Varicella Zoster virus (VSV)</i>	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Células mucoepiteliais	Neurônio	Contato direto ou via respiratória
4	<i>Epstein-Barr Virus (EBV)</i>	<i>Gammapherpesvirinae</i>	Linfócito B e células epiteliais	Linfócito B	Saliva
5	<i>Cytomegalovirus (CMV)</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	Células epiteliais, monócitos e linfócitos	Monócitos, linfócitos e possivelmente outras células	Contato direto, transfusão sanguínea, transplante, transplacentária, durante o parto
6	<i>Herpes lymphotropic virus</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	Linfócito T e outras células	Linfócito T e outras células	Contato direto ou via respiratória
7	<i>Human herpes virus-7 (HHV-7)</i>	<i>Betaherpesvirinae</i>	Linfócito T e outras células	Linfócito T e outras	Desconhecida
8	<i>Human herpes virus-8 (HHV-8)</i> <i>Kaposi's sarcoma-associated herpes virus (KSHV)</i>	<i>Gammapherpesvirinae</i>	Células endoteliais	Desconhecida	Troca de fluidos corporais

Adaptado de Microbiology and Immunology on line. University of South Carolina. Disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>. Acesso em 20 de novembro de 2007.

Todos os tipos de vírus inseridos nesta família contêm genomas de DNA, com dupla cadeia de grandes dimensões (contendo entre 60 a 120 genes). Os diferentes tipos de herpesvírus compartilham de semelhantes estruturas genômica e de arquitetura, com elevada incidência de regiões com seqüências repetidas invertidas (*inverted repeat sequences*). O tamanho do genoma varia entre 80 a 240 kbp (1kbp = 1.00pares de bases), sendo a replicação do seu genoma, do tipo nuclear (WAGNER & HEWLETT, 1999; MADIGAN et al., 2000).

Estruturalmente, conforme representado na Figura 1, o *Herpesvirus* é constituído por nucleóide (formado essencialmente pelo genoma e por proteínas), capsídeo icosaédrico ou núcleocapsídeo (formada pelos capsômeros), tegumento de estrutura fibrilar (liga o capsídeo ao invólucro) e envelope lipídico (formado por bicamada lipídica, de natureza celular e glicoproteínas, de origem viral), o que lhes confere alguma fragilidade (JAWETZ et al., 1973; WAGNER & HEWLETT, 1999; FERREIRA & SOUSA, 2002). A estrutura icosaédrica apresenta vinte faces idênticas e simetria rotatória de 5:3:2. O ácido nucléico (DNA) encontra-se aglutinado e protegido pelo capsídeo. As proteínas no interior do capsídeo aglutinam-se e associam-se em unidades estruturais, que são conhecidas como capsômeros. Os vírus maiores contêm mais capsômeros (FERREIRA & SOUSA, 2002).

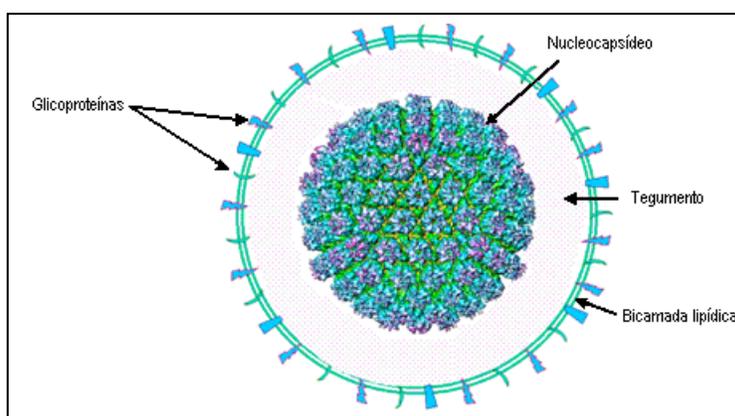


Figura 1- Representação esquemática da estrutura do *Herpesvirus*

A transmissão do *Herpesvirus* ocorre por contato direto entre indivíduos, por compartilhamento de objetos contaminados e por auto-inoculação (WAGNER & HEWLETT, 1999; MADIGAN et al., 2000; FERREIRA & SOUSA, 2002). Após a transmissão do vírus, este multiplica-se no local da inoculação, difunde-se através de nervos sensitivos, de vasos linfáticos ou, menos freqüentemente, pelo sangue circulante. Tem como primeiras “células-alvo” as células epiteliais, ou, mais raramente, os neurônios dos gânglios sensoriais dorsais, o cérebro ou as meninges (FERREIRA & SOUSA, 2002). É um vírus de crônica longevidade, com caráter propenso a recidivas, permanecendo no hospedeiro ao longo de toda a sua vida, de forma assintomática (períodos de latência).

Apesar dos diferentes tipos de *Herpesvirus* possuírem características comuns, apresentam algumas diferenças clínicas e patogênicas significativas. O *Herpesvirus* estabelece no hospedeiro uma infecção primária com sintomas geralmente ligeiros, que pode estimular uma resposta imunitária eficiente, o que impede uma nova infecção. Contudo, o vírus não é totalmente eliminado, sendo o seu genoma preservado em determinadas “células-alvo” sem que haja uma resposta inflamatória, mas, sim, uma infecção latente, onde não se pode detectar este vírus. O tropismo viral por determinado tecido ou célula é definido pelas proteínas de ancoragem que o vírus expressa e pelos receptores de superfície específicos de cada célula. As infecções latentes podem ser ativadas por fatores internos como o estresse, a menstruação e a gravidez. O estado de latência também pode ser alterado por fatores externos, como exposição às radiações ultra-violetas naturais. Estas ativações do *Herpesvirus* permitem a multiplicação e disseminação do vírus, uma vez que se verifica contínua produção dos viriões (WAGNER & HEWLETT, 1999; MADIGAN et al., 2000; FERREIRA & SOUSA, 2002).

Esta reativação do *Herpesvirus* permite a contaminação de novos hospedeiros e o indivíduo infectado mantém-se como um reservatório do vírus, para toda a vida. Geralmente, as infecções decorrentes do *Herpesvirus* caracterizam-se por apresentar estados repetitivos de latência e de recorrência. Após a infecção primária, o *Herpesvirus* desloca-se pelos nervos sensoriais até o gânglio sensorial correspondente. Os gânglios trigeminal, cervical e sacral abrigam o vírus no estado latente (HAD et al., 1998; ARTHUR et al. 2001).

Durante a fase de latência nas células neuronais, o DNA viral é mantido como um epíssome, não integrado, com expressão limitada dos genes específicos do vírus requeridos para a manutenção da latência. O equilíbrio delicado da latência pode ser alterado por vários distúrbios, físicos ou psicológicos. A reativação do *Herpesvirus* latente conduz à doença recorrente, ocasião em que o vírus faz o caminho inverso percorrendo os nervos sensoriais em direção à superfície do corpo e replica-se, causando reações inflamatórias no tecido (PEREIRA, 2002).

Uma lesão herpética típica inicia-se com pequena área pápulo-erimatosa, que, posteriormente se transforma numa vesícula, contendo, em seu interior, um líquido rico em partículas virais infecciosas. Essas lesões regridem em poucos dias, não deixando, com frequência, cicatrizes. Contudo, em zonas úmidas do corpo, tais lesões podem formar úlceras devido ao atrito, como é o caso da mucosa oral. Em indivíduos imunocompetentes, as lesões cicatrizam-se, no máximo, em três semanas (FERREIRA & SOUSA, 2002; YARON et al., 2005)

O nível de gravidade e o tempo de duração das infecções por *Herpesvirus* dependem da imunocompetência do indivíduo, como, também da presença ou ausência de anticorpos para esses vírus. Os pacientes submetidos ao tratamento antineoplásico apresentam infecções por *Herpesvirus* com elevada frequência. Em indivíduos com o sistema imunológico normal, a PI herpética é, geralmente, mais dolorosa comparativamente às infecções recorrentes (FERREIRA & SOUSA, 2002).

Dentre os *Herpesvirus*, os vírus *Herpes simplex-1 (HSV-1)* e *Herpes simplex-2 (HSV-2)* são vírus muito semelhantes. Os dois tipos diferem pelo modo de transmissão e pelo tipo de lesões que provocam no indivíduo afetado.

Em geral, as infecções por *HSV-1* situam-se acima da cintura. O local de replicação é a zona orofaríngea, sendo os gânglios do nervo trigêmeo, invariavelmente, atingidos (FERREIRA & SOUSA, 2002). O *HSV-1* está frequentemente associado ao herpes labial. Contudo, é possível que o herpes labial também seja devido ao *HSV-2*.

No herpes oral e labial, a PI é imperceptível em 80 a 85% dos casos. Após a PI, os surtos subseqüentes são, normalmente, acompanhados de edema em cavidade bucal, com vesículas muito dolorosas que podem ocorrer no palato duro, faringe, gengivas,

mucosa bucal e língua, acompanhadas de adenopatias e febre. As lesões recorrentes em nível oral, caracterizam-se pelo aparecimento de vesículas na semi-mucosa labial, na junção cutâneo-mucosa, e são designadas vulgarmente por “botão de febre”. Esses tipos de lesões podem aparecer, também, nas proximidades das narinas. Com frequência, as lesões referidas transformam-se em pequenas úlceras rasas, em dois a três dias após o surgimento, desaparecendo em cerca de uma semana (FERREIRA & SOUSA, 2002).

A prevalência do *HSV-1* varia de acordo com a idade do indivíduo, país, região do país e grupos populacionais (VYSE et al., 2000; IBRAHIM et al., 2000; ISACSOHN et al., 2002). Revisão da literatura de 2.500 citações, utilizando como unitermos “*HSV-2*, *HSV-1*, herpes, prevalência e epidemiologia” mostrou que a prevalência do *HSV-1* no grupo de pacientes com menos de 20 anos variou de 17 a 69%. A identificação do *HSV-1* em todos os estudos publicados foi realizada por sorologia (SMITH & ROBINSON, 2002). Recentemente, XU et al. (2007) avaliaram 2.989 crianças saudáveis, nos Estados Unidos, entre 6 e 13 anos e encontraram a prevalência do *HSV-1* em 31,1% dos indivíduos. Neste estudo, a identificação do *HSV-1* também foi realizada por sorologia.

1.3.2- Caracterização das bactérias da cavidade oral

As características da cavidade oral, como alta umidade, temperatura relativamente constante (34 a 36°C), pH próximo da neutralidade, grande disponibilidade de nutrientes, permitem o estabelecimento de uma microbiota altamente complexa, composta por grupos bacterianos que habitam, seletivamente, as diversas áreas da boca (MACHADO, 1993). A composição da microbiota oral varia com a idade do hospedeiro, hábitos alimentares, hormônios, fluxo salivar, condições imunológicas e outros fatores, como higienização e alcoolismo. Podem ser encontrados microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos e anaeróbios. Na mucosa oral jugal há predomínio de tipos facultativos, principalmente *Streptococcus viridans*. Na gengiva predominam anaeróbios e microorganismo facultativos. A superfície dentária tem características que facilitam a

instalação de agentes aeróbios, anaeróbios e microorganismos facultativos. Embora a circulação do ar na cavidade oral pareça excluir a possibilidade de crescimento de microorganismos anaeróbios, as tensões do oxigênio variam nos diferentes sítios intra-orais. Assim, espécies anaeróbias podem ser encontradas, freqüentemente, nas placas sub-gengivais, nos sulcos periodontais e capuzes peri-coronários **(MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994)**.

O termo microbiota indígena refere-se à população de microorganismos que habita as superfícies e mucosas de pessoas sadias **(BARBOSA et al., 2006)**. A população bacteriana indígena compreende aquelas espécies que estão quase sempre presentes em percentual maior que 1%, em determinado sítio particular, como a placa supragengival e a superfície da língua. Esta população é composta predominantemente por bactérias anaeróbias e facultativas, as quais exibem crescimento ótimo em torno de 37°C. Alguns gêneros, como *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Neisseria*, são encontrados na cavidade oral de grande parte dos animais, como cães, gatos, bovinos, suínos e nos seres humanos. As culturas de saliva refletem a população encontrada sobre os tecidos moles da cavidade oral e nos dentes **(NISENGARD & NEWMAN, 1994)**.

A microbiota oral pode variar quantitativa e qualitativamente, dependendo da localização na cavidade oral. Na placa dentária podem ser encontrados *Streptococcus* facultativos, *Difteroides* facultativos, *Leptotrichia buccallis*, *Veillonella spp*, *Fusobacterium* e *Neisseria*. As superfícies dentárias favorecem o desenvolvimento de *Streptococcus sanguis* e *mutans*, *Nocardia* e *Actinomyces* **(MACHADO, 1993)**.

Pouca atenção tem sido dispensada à tensão do oxigênio da cavidade oral, como um determinante ecológico. A atmosfera gasosa sobre as superfícies dentogengivais é principalmente anaeróbica, particularmente nos sítios em que as placas gengivais se formam. Um ambiente de baixa tensão de oxigênio e rico em nutrientes, como o do sulco periodontal, cria condições favoráveis para o crescimento e proliferação de anaeróbios, espiroquetas, *Fusobacterium*, bacteróides, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e outras formas facultativas **(MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994)**.

A microbiota encontrada na língua é constituída por *Streptococcus* facultativos (principalmente *S. salivarius* e *S. mittis*), *Veillonella spp*, *Staphylococcus spp*, Bacteroides, Neisseria, *Fusobacterium* e alguns cocos e bastonetes Gram-negativos.

A microbiota da saliva é resultante do deslocamento de microorganismos a partir das outras estruturas da cavidade oral. O estreptococo mais freqüente na saliva é o *S. salivarius* (MACHADO, 1993).

Os *Streptococcus* são microorganismos Gram-positivos e constituem a principal população de microorganismos da cavidade oral, com espécies distintas associadas a diferentes nichos na boca. Por exemplo, *Streptococcus sanguis* e *S. mutans* são encontrados na placa dentária, enquanto o *S. salivarius* é encontrado principalmente na língua e *S. mitis*, em outros tecidos mucosos (MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Outro grupo de microorganismos Gram-positivos, freqüentemente encontrados na cavidade oral são os *Staphylococcus*. As duas principais espécies de *Staphylococcus* são o *S. aureus* e *S. epidermidis*. O *S. aureus* é um patógeno potencial e pode ser encontrado assintomaticamente na nasofaringe dos indivíduos. É, provavelmente, a partir desse sítio que a bactéria alcança a cavidade oral. Essa espécie não possui papel patogênico significativo nas infecções intra-orais (MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Os membros do gênero *Actinomyces* e outras bactérias Gram-positivas fazem parte da microbiota indígena, que coloniza a cavidade oral dos seres humanos. São microorganismos comensais, que emergem como patógenos oportunistas, envolvidos em infecções de tecidos moles e dentes (MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

O gênero *Haemophilus* exhibe pronunciada especificidade para o hospedeiro. Nos humanos, são encontrados em membranas mucosas do trato respiratório superior, saliva e placa dentária. Cepas de *Haemophilus*, importantes à microbiologia oral, incluem *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. parainfluenzae* e *H. segnis*. Estes organismos são Gram-negativos, normalmente encontrados na cavidade oral.

Contudo, após seu deslocamento do habitat normal, tornam-se patógenos oportunistas. Os *Haemophilus* orais são anaeróbios facultativos (MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

A maioria das espécies de *Neisseria* isoladas em humanos são saprófitas em oro e nasofaringe, de indivíduos saudáveis JAWETZ et al. (1973). São microorganismos Gram-negativos. Ross (1971), estudando 50 crianças saudáveis com idade entre sete e doze anos, identificou a prevalência da *Neisseria spp* em 84% dos casos.

A família *Enterobacteriaceae* é composta por bactérias Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, na forma de bacilos não esporulados. As bactérias dessa família variam em sua patogenicidade. O sítio preferencial desses microorganismos é o trato intestinal, mas podem ser levados à cavidade oral, pelo contato com a boca de mãos ou objetos contaminados (MACHADO, 1993; NISENGARD & NEWMAN, 1994).

1.3.3- Caracterização da *Candida spp* em cavidade oral

Os fungos são seres uni ou multicelulares, que habitam diversos ecossistemas, sendo classificados em um dos 5 reinos da natureza, o Reino Fungi (BARROS, 2005). São microorganismos eucariotas cuja classificação é baseada, principalmente, nas características dos esporos sexuais e dos corpos de frutificação, na natureza de seus ciclos de vida e nas características morfológicas de seus micélios vegetativos ou de suas células. Estruturalmente sua célula é composta por parede celular, membrana citoplasmática, núcleo e elementos citoplasmáticos. Os micologistas dividem o Reino Fungi em 3 principais grupos: os fungos limosos, os fungos inferiores flagelados e os fungos terrestres. Existem 4 principais grupos de fungos terrestres: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* e *Deuteromycetes* (DAVIS et al., 1990).

A cavidade oral humana apresenta grande quantidade e variedade de microorganismos. A compatibilidade da coexistência dessa população microbiana com a saúde individual do hospedeiro, representa uma condição de simbiose, garantida através de mecanismos imunológicos e uma variedade de mecanismos de proteção (UZEDA, 2002).

O epitélio oral atua como barreira física, e a renovação epitelial contribui para a manutenção do equilíbrio entre os microrganismos e o hospedeiro. Além disso, a mucosa oral é constantemente lubrificada pela saliva, que possui função diluente, enxaguatória e antimicrobiana, pela presença de enzimas como a lisozima, a lactoferrina e a lactoperoxidase, as quais constituem uma barreira contra os microrganismos (CHALLACOMBE, 1994). Os fungos constituem uma pequena parte desta microbiota, da qual a maior proporção é formada por leveduras do gênero *Candida* (MARSH, 2004).

O gênero *Candida* faz parte do filo *Deuteromycetes* e compreende mais de 150 espécies de leveduras. Na micromorfologia podem ser observadas ao microscópio estruturas como blastoconídios com ou sem brotamentos, clamidoconídios e pseudo-hifas - que se formam quando os blastoconídios que nascem alogam-se e não se despreendem da célula que o originou (ABI-SAID et al., 1997; HÖFLING & ROSA, 1999)

De modo semelhante aos demais fungos, as espécies de *Candida* são organismos eucariotos, não fotossintéticos, possuindo organelas citoplasmáticas, parede celular, e uma membrana plasmática rica em esteróis, usualmente o ergosterol (AKPAN & MORGAN, 2002). Esse gênero compreende mais de 150 espécies, que crescem bem em temperaturas variando entre 20°C a 38°C, e numa faixa de pH de 2,5 a 7,5 (WEBSTER & ODDS, 1987).

Poucas espécies de *Candida* estão implicadas em doenças humanas. Essas espécies apresentam diferentes habilidades patogênicas e baixa virulência, as quais podem ser isoladas a partir de várias formas clínicas, incluindo infecções sistêmicas graves. Provavelmente os fatores de virulência incluem a habilidade de aderir em tecidos hospedeiros, o potencial para produzir enzimas, principalmente proteases e fosfolipases, e capacidade de transformação morfológica em formas que confirmam maior resistência contra o sistema de defesa do hospedeiro. Acredita-se que a adesão dos microrganismos em tecidos hospedeiros seja pré-requisito para o desenvolvimento da infecção, como parte de um processo que protege os mesmos da remoção natural conferido pelo sistema de limpeza e defesa do hospedeiro (HAYNES, 2001).

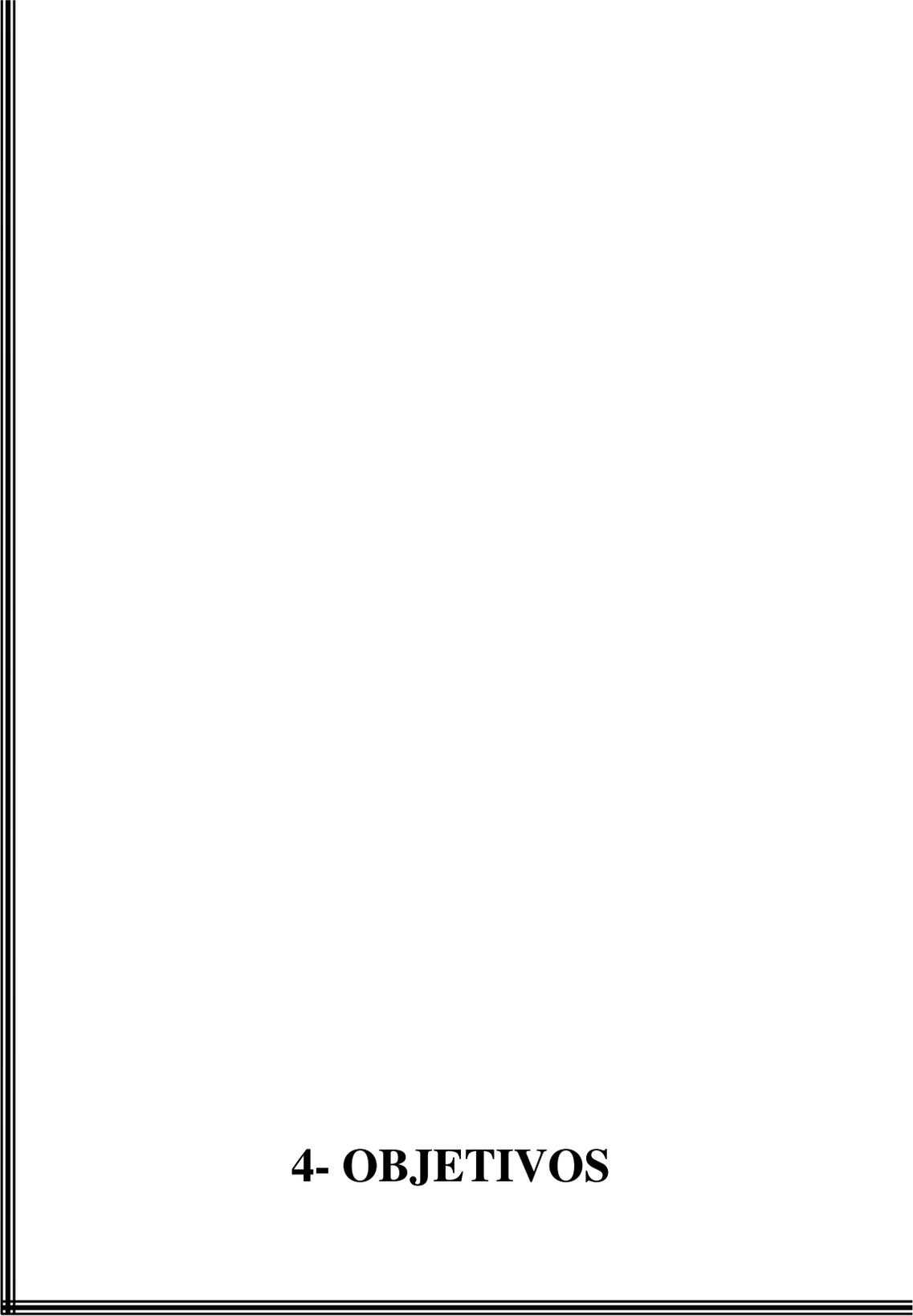
Os quadros de imunodeficiência constituem estados predisponentes às infecções graves pelos fungos, que fazem parte da população comensal. A espécie mais freqüentemente implicada nas infecções na cavidade oral é a *Candida albicans*. Tais microorganismos são considerados saprófitas inofensivos das membranas mucosas. No entanto, quando o epitélio é lesado por traumas ou na presença endocrinopatias, como diabetes mellitus e hipotireoidismo, uso de anticoncepcionais, imunossupressão, discrasias sanguíneas, pode ocorrer a invasão da submucosa (**CANNON et al., 1995; JORGE et al., 1997; ODDS, 1988**).

2- JUSTIFICATIVAS

- Ausência de registros na literatura consultada, quanto a estudos que avaliem, de forma sistemática, a relação entre a microbiota oral e a intensidade da mucosite oral.
- Identificação da necessidade de estudar a relação da presença do *HSV-1*, da *Candida spp* e de bactérias na cavidade oral, com a prevalência e a intensidade das mucosites orais em pacientes pediátricos submetidos à quimioterapia.

3- HIPÓTESES

- Existe associação entre a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, e a intensidade de mucosite oral em pacientes pediátricos com LLA, submetidos ao tratamento quimioterápico, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99 (**BRANDALISE et al., 2004**).
- A presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral aumenta o risco estimado para mucosite em pacientes pediátricos com LLA, submetidos ao tratamento quimioterápico mencionado.



4- OBJETIVOS

- Analisar a associação entre a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, e a intensidade de mucosite oral em pacientes pediátricos com LLA, submetidos ao tratamento quimioterápico, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99 (**BRANDALISE et al., 2004**).
- Estimar o risco para o grau da mucosite oral relacionado à presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral em pacientes pediátricos com LLA, submetidos ao tratamento quimioterápico mencionado.

5- CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1- População do estudo

Foram avaliados setenta e um pacientes com LLA, sem tratamento prévio, admitidos consecutivamente no Centro Infantil Boldrini, que se enquadraram nos critérios de elegibilidade.

O hospital é especializado no tratamento de doenças onco-hematológicas na infância e adolescência. O atendimento aos pacientes oncológicos é global, realizado por equipe de saúde composta por médicos, enfermeiros, dentistas, fisioterapeutas, nutricionistas, psicólogos e outros profissionais envolvidos no cuidado integral do paciente.

O cuidado odontológico, especificamente, abrange a universalidade dos pacientes com câncer seguidos na instituição.

Todos os pacientes foram tratados de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99 (**BRANDALISE et al., 2004**).

5.2- Desenho do estudo

Foi realizado estudo clínico e prospectivo, do tipo coorte.

5.3- Critérios de inclusão

- Paciente com diagnóstico de LLA, sem tratamento antineoplásico prévio;
- Pertencer à faixa etária entre 0 e 19 anos;
- Estar em tratamento quimioterápico no Centro Infantil Boldrini de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99 (ANEXO II) (**BRANDALISE et al., 2004**);
- Apresentar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO III) para o estudo, devidamente preenchido e assinado.

5.4- Critérios de exclusão

- Ter realizado tratamento antineoplásico prévio ou seguir outro plano terapêutico que não o Protocolo GBTLI LLA-99;
- Possuir idade maior que 19 anos;
- Apresentar outro tipo de neoplasia;
- Não apresentar o Termo de Consentimento para o estudo, devidamente preenchido e assinado.

5.5- Variáveis do estudo

Foram analisadas as seguintes variáveis:

- intensidade da mucosite oral;
- presença do *HSV-1*;
- contagem de bactérias/mm³;
- presença de *Candida spp*;
- contagem de *Candida spp*/mm³;

5.6- Procedimentos da pesquisa clínica

O diagnóstico da LLA nos pacientes do estudo seguiu os critérios morfológicos, citotóxicos, de imunofenotipagem e citogenéticos, internacionalmente recomendados (PUI et al., 2004).

A classificação de risco de recaída para os pacientes seguiu os critérios do NCI (NCI, 2007a).

O valor de corte adotado para as variáveis contagem de *Candida spp*/mm³ (1.700) e contagem de bactérias/mm³ (510.000) foi estabelecido pela mediana do número total de unidades formadoras de colônias.

Todos os pacientes do estudo foram tratados de acordo com o protocolo GBTLI LLA-99. As coletas de saliva foram realizadas por meio de bochecho e as células da mucosa oral foram coletadas por meio *swab*. As coletas foram realizadas nos seguintes momentos: 14º dia da terapia de Indução (D14) e 56º da terapia, no momento da Intensificação (D56). A seleção desses momentos da coleta deveu-se ao fato de que, nestas fases a quimioterapia é mais intensa, com administração de antracíclicos e corticóide, que têm importante papel na toxicidade da mucosa oral. Como procedimento de rotina, os pacientes receberam o atendimento odontológico e as mesmas orientações quanto à higiene oral. Foram recomendados bochechos com soro fisiológico não glicosado a 0,9% ou solução salina a 1% (preparada com água fervida), como parte dos procedimentos preventivos para a mucosite. A partir da segunda semana de tratamento, os pacientes iniciavam a profilaxia para o *Pneumocystis carinii* com sulfametoxazol + trimetopima, três dias por semana.

As informações clínico-laboratoriais coletadas foram armazenadas em formulário de pesquisa, desenvolvido especificamente para este estudo (ANEXO IV).

Os exames e as coletas de material da cavidade oral foram realizados pelo pesquisador responsável no consultório odontológico, no ambulatório de quimioterapia ou nos setores da internação, de acordo com as condições clínicas do paciente. Durante o período da internação, os pacientes incluídos no estudo foram avaliados diariamente, com o objetivo de identificar e classificar os episódios de mucosite oral. A classificação da intensidade das mucosites foi realizada segundo os critérios de toxicidade, estabelecidos pelo NCI, versão 3.0 (NCI, 2007b). São definidos cinco graus, especificados resumidamente no Quadro 3.

Quadro 3- Classificação das mucosites, de acordo com o NCI, 2006

Gradação	Sintomas
Grau 0 (Sem mucosite)	Sem sintomas
Grau 1	Eritema da mucosa, ou dor leve. Sintomas respiratórios mínimos, mas não interferem funcionalmente.
Grau 2	Eritema doloroso, edema, úlceras ou pseudomembranas, mas o paciente pode se alimentar. Necessidade de dieta modificada. Sintomas respiratórios interferindo funcionalmente.
Grau 3	Eritema doloroso, edema, úlceras ou pseudomembranas confluentes. Sangramento ao menor trauma. O paciente não pode se alimentar ou ingerir líquidos adequadamente.
Grau 4	Úlceras extensas. Necrose tecidual. Sangramento espontâneo significativo. Necessita de suporte enteral ou parenteral. Risco de vida.
Grau 5	Morte

Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0. Disponível em: <http://ctep.cancer.gov>. NCI. Publish Date: August 9, 2006. Acesso em 25 de outubro de 2007.

5.6.1- Coleta de células da mucosa jugal para identificação do *HSV-1*

Foi coletado material da mucosa jugal, na região dos molares até incisivos de cada paciente, por meio de *swab* estéril, percorrendo toda a área. Antes da coleta do material, foram feitos bochechos com água estéril, para remoção de possíveis resíduos de alimentos.

A presença do *HSV-1* foi demonstrada pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR). A PCR é um dos métodos mais utilizados para a detecção dos herpesvírus humanos, uma vez que permite amplificação do ácido desoxirribonucleico (DNA) viral. A técnica de PCR foi escolhida para ser utilizada neste estudo em função da sua alta sensibilidade, rapidez nos resultados e sua precisa identificação da seqüência molecular das partículas virais, quando comparada com outras técnicas convencionais, tais como culturas virais e técnicas para imunodiagnósticos (XU et al., 2000). A técnica da PCR tem sido realizada com sucesso para o diagnóstico de agentes causadores de uma série de doenças infecciosas, através do uso de amostras de diferentes tecidos, sangue e alguns fluidos corporais (AKHTAR et al., 1999; XU et al., 2000).

Para a realização da PCR, a amostra do *swab* foi transferida para um tubo cônico contendo 3mL NaCl 0,9%, que foi homogeneizado em agitador tipo *vortex* e centrifugado a 1.800 rpm a temperatura ambiente, por 10 minutos, para obtenção do *pellet* das células bucais. O sedimento celular (*pellet*) foi lavado em PBS, com a mesma centrifugação citada acima, antes da extração dos ácidos nucleicos (**SAMBROOK et al., 1989**).

5.6.1.1- Técnica da PCR

A PCR é uma reação enzimática que resulta na amplificação do material genético. Pela técnica da PCR é possível obter-se cópias do material genético, em quantidade suficiente, que permite detectar e analisar a sequência alvo do estudo. Para a execução da técnica da PCR, é preciso que se tenha conhecimento prévio da sequência do ácido nucleico que se deseja amplificar. A partir disso, desenham-se dois oligonucleotídeos para iniciar-se o processo de síntese (**WEITGASSER et al., 2002**).

5.6.1.2- Extração do DNA das amostras de células bucais dos pacientes

O DNA do sedimento celular, obtido conforme descrito no item 5.6.1., foi ressuspensionado em 500µl do tampão de lise e incubado a 56°C por 2 horas. O tampão de lise foi composto por 5 mL de S.T.E. (0,01M Tris-HCl, 0,001M EDTA [pH 8], cloreto de sódio 0,1 M), 50µL de proteinase K (10 mg/mL) e 250µL de S.D.S 10%. O DNA foi extraído com a mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24: 1) e precipitado com etanol absoluto e acetato de sódio (0,3M; pH 5,2), como detalhado em **SAMBROOK et al. (1989)**. O sedimento foi ressuspensionado em TE, que é um tampão de conservação do DNA, composto por 2M Tris-HCl e 0,2M EDTA. A concentração do DNA foi obtida pela da leitura de absorbância a 260 nm.

5.6.1.3- Sequência dos oligonucleotídeos para estudo do vírus *HSV* pela técnica de PCR

O *HSV-1* foi amplificado com oligonucleotídeos que reconhecem o sorotipo *HSV-1* dentre os demais tipos (LÖRH et al., 1990). Como controle interno da qualidade do DNA, foi utilizado um par de oligonucleotídeos designado a amplificar um produto constitutivo comum a todas as células, o gene da β -globina, o qual foi usado para demonstrar adequada extração dos ácidos nucléicos, excluindo-se, deste modo, os resultados falso-negativos (LÖRH et al., 1985). A relação dos oligonucleotídeos de cada vírus, e da β -globina, está representada no **Quadro 4**.

Quadro 4- Sequência do oligonucleotídeo e região no genoma utilizada para o desenho do mesmo, e tamanho do fragmento amplificado para o vírus *HSV-1*.

Vírus	oligonucleotídeos	Sequência (5'→3')	Região no genoma	Fragmento (pb)
<i>HSV-1</i>	<i>HSV</i> -sense	CTCATGATCCTCATCGAGGGCATC	^(a) UL40	322
	<i>HSV</i> -anti-sense	CGCACGTAGTTTTCGATGGCCGCC		
β -globina	PCO3	CTTCTGACACAACGTGTGTTCACTAGC	Região exônica do gene	123
	PCO4	TCACCACCAACTTCATCCAGCTTCACC		

(a) oligonucleotídeo derivado de uma pequena sub-unidade do gene da ribonucleotídeo redutase; (pb) número de pares de base do fragmento; C, citosina; T, timina; G, guanina; A, adenina

5.6.1.4- Realização da técnica da PCR

As condições da reação da PCR para a identificação do *HSV-1* foram as seguintes: 100-200ng do DNA da amostra de *HSV-1*, uma vez diluído (1X) do tampão da Taq DNA polimerase, 0,4 mM de dNTP, 0,2 μ M do oligonucleotídeo, 1U da Taq DNA polimerase, para uma reação com volume final de 25 μ L. Para o gene da β -globina, as condições para a reação da PCR foram iguais às utilizadas para a reação da PCR do *HSV-1*, com exceção da concentração do oligonucleotídeo para a β -globina, que foi de 0,3 μ M.

A relação dos parâmetros dos ciclos da PCR para a amplificação do *HSV-1* e do gene da β -globina, com definição da temperatura e tempo de desnaturação inicial (*hot start*), número de ciclos, temperatura e tempo das etapas de cada ciclo (desnaturação, ligação e extensão), temperatura e tempo da extensão final, estão descritas no **Quadro 5**.

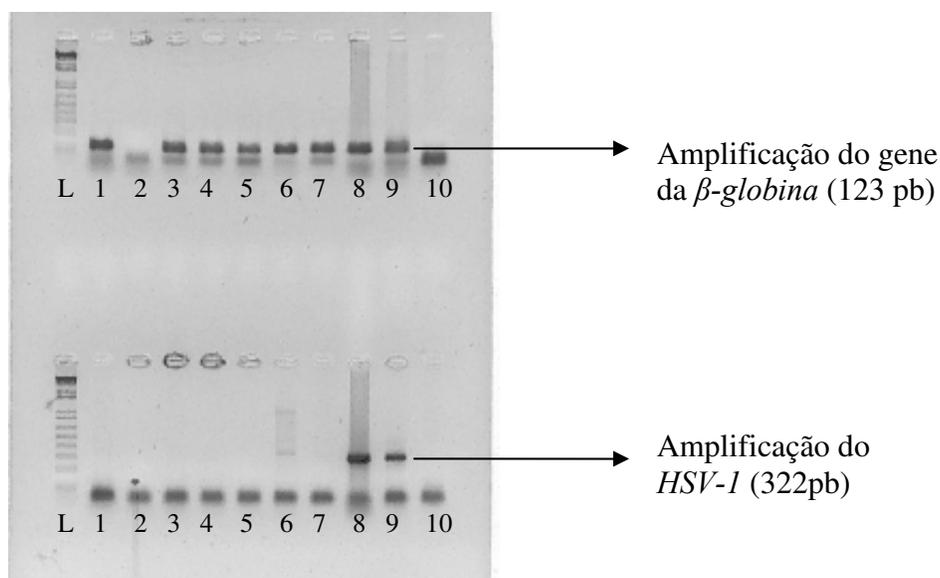
Quadro 5- Parâmetros dos ciclos da PCR e tamanho do fragmento amplificado, para a identificação do *HSV-1* e do gene da β -globina.

Parâmetros dos ciclos de PCR												
Vírus	“Hot start”		Ciclos	Desnaturação		Ligação		Extensão		Extensão final		Fragmento
	°C	T	N	°C	T	°C	T	°C	T	°C	T	pb
<i>HSV-1</i>	94	2'	40	94	30''	60	45''	72	1'	72	5'	322
β -globina	94	2'	40	94	30''	60	45''	72	1'	72	5'	123

°C, temperatura; T, tempo ('=minuto, ''= segundos); N, número do ciclos; **pb**, pares de base do fragmento.

5.6.1.5- Análise do produto da técnica da PCR

Para a análise do produto da PCR, uma alíquota de 10 μ l da reação de cada amostra da PCR foi separada em gel de agarose 2% por eletroforese horizontal a 100V, em tampão TBE 1X (tris+ácido bórico 0,089M e EDTA 0,02M). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), para visualização em transluminador de luz ultravioleta (UV). A determinação do tamanho dos fragmentos da PCR amplificados, foi realizada por comparação com o marcador de peso molecular “1Kb Plus DNA ladder” e controle positivo do agente viral estudado. A documentação dos resultados foi feita através do sistema fotográfico EDAS 290 da Kodak. A Figura 2 mostra a documentação do resultado da técnica da PCR, utilizando o sistema fotográfico EDAS 290 da KODAK[®], com amostras coradas com brometo de etídio e visualizadas em gel de agarose a 2%.



- L. PADRÃO DE PESO MOLECULAR – LADDER 1KB PLUS
- 1. WRS614
 - 2. RFS150
 - 3. GSS918
 - 4. JPA911
 - 5. AAG658
 - 6. JBM798
 - 7. KSA910
 - 8. KMB725
- } Pacientes do estudo
- 9. CONTROLE POSITIVO
 - 10. CONTROLE NEGATIVO – H₂O₂ – Amostras sem DNA do paciente

Figura 2- Documentação do resultado da técnica da PCR, com amostras coradas com brometo de estúdio

Medidas de precaução foram tomadas, para evitar a contaminação das amostras. Estas foram processadas em laboratório separado daquele onde foi realizada a PCR. As reações da PCR foram preparadas em fluxo laminar, descontaminado com luz UV por 15 minutos, antes do uso. Os reagentes foram individualmente aliqüotados. As luvas de borracha foram trocadas durante a preparação da reação, sempre que houve contaminação da luva por DNA de vírus. Para todos os exames foram utilizados controles positivos e negativos.

5.7- Coleta de amostras de saliva para identificação dos fungos e das bactérias

5.7.1- Preparo do sedimento

Foi realizado estudo piloto com 28 crianças da presente amostra, no D14, comparando a utilização de bochechos e *swab* para a pesquisa de bactérias e fungos em cavidade oral. Foram comparadas as médias do número de colônias de cada grupo de microorganismos encontrados e a média geral da somatória de colônias identificadas por cada técnica. Como não foi observada diferença estatisticamente significativa em qualquer variável avaliada, optou-se por utilizar o bochecho para esta pesquisa, já que esta técnica é menos invasiva e dolorosa. No caso das crianças muito pequenas, que não conseguiam fazer o bochecho, foi utilizada a técnica de coleta com o *swab*.

Para coleta da saliva e posterior identificação dos agentes bacterianos e fúngicos, os pacientes realizaram 1 ou mais bochechos, dependendo da cooperação da criança., com 10mL de água destilada estéril, eliminando o conteúdo em recipiente estéril. Este volume foi transferido para um tubo cônico estéril de 15 mL e centrifugado por 15 minutos a 3000rpm. Finalizada essa etapa, o sobrenadante foi desprezado e obtida amostra de 1mL (do sedimento), que foi utilizada para a microscopia e a semeadura. A coleta sempre foi realizada antecedendo o momento de alimentação do paciente.

5.7.2- Identificação dos microorganismos da saliva

A avaliação das bactérias e fungos foi determinada por métodos convencionais de microscopia e cultura.

A avaliação bacteriana foi determinada por bacterioscopia pela coloração de Gram e pela cultura. O valor de corte foi determinado pela mediana.

A presença dos fungos foi determinada por microscopia pelo Exame Direto e pela cultura. O valor de corte foi determinado pela mediana.

Para a microscopia, foram utilizados 20 µl do sedimento e preparadas duas lâminas, de 10µl cada, coradas pelo método de Gram. A amostra foi delicadamente espalhada de modo homogêneo, na superfície de uma lâmina de microscopia, fixada com calor e submetida à coloração. A segunda lâmina, igualmente preparada, foi guardada como reserva.

Para a semeadura, foram utilizados 40 µl da solução mencionada no item 5.7.1. As culturas foram realizadas nos meios Ágar Sangue, Ágar Chocolate, Ágar McConkey e Ágar Sabouraud Dextrose, utilizando 10 µl em cada placa de Petri.

5.7.2.1- Cultura de amostras para o isolamento de fungos

Foi utilizado o Ágar Sabouraud Dextrose, que é meio tradicionalmente indicado para o cultivo e crescimento de espécies de *Candidas* e fungos filamentosos, particularmente associados a infecções superficiais, e caracterização macroscópica do fungo filamentoso (colônia gigante) (BALOWS et al., 1991).

O meio de cultura foi pesado e hidratado de acordo com instruções do fabricante (OXOID®), ajustado a pH a 5,6 e esterilizado em autoclave a 121°C. Após a esterilização, foi resfriado a 50°C e distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. As amostras foram semeadas em movimentos de estrias sobre a superfície do Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas à temperatura de 37°C. O material foi observado após 24 horas de incubação. Quando o resultado foi negativo para o crescimento de fungos, o material foi observado diariamente, por mais nove dias.



Figura 3- Paciente IGR (n°4), 4 anos. Crescimento fúngico em meio de Agar Sabouraud Dextrose

Após o crescimento, foi realizada a identificação fenotípica dos microorganismos. Como a morfologia macroscópica das leveduras não apresenta diversidade tão rica quanto àquela dos fungos filamentosos, não sendo parâmetro suficiente para identificação, de cada colônia morfologicamente distinta foi realizado o isolamento em Ágar Sabouraud Dextrose. Foram utilizadas provas para identificação presuntiva (Prova do Tubo germinativo) e confirmatória (Prova da presença do clamidósporo em Ágar Fubá e Auxonograma), de acordo com normas preconizadas pela *American Society for Microbiology* (MURRAY et al., 2003).

A Prova do Tubo germinativo consiste em fazer uma suspensão do microorganismo em estudo, em 0,5 mL de soro humano contido em tudo de ensaio. Após a incubação, a 37°C durante período máximo de 3 horas, uma gota dessa suspensão é depositada sobre lâmina, coberta com lamínula e observada em microscopia de luz. O resultado positivo, com presença de filamentação em forma de tubo, é presuntivo para identificação de *Candida albicans*.

Essa técnica baseia-se no princípio de que leveduras, quando incubadas num meio com o surfactante Tween-80 (SYNTH®), apresentam a capacidade de filamentar, formando pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. Pelas características morfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie da levedura implicada na identificação.

Após a observação do crescimento de clamidósporos em Ágar Fubá, para determinar a capacidade das leveduras de assimilar carboidratos, foi realizado o Auxonograma. Utilizou-se um meio à base de nitrogênio livre de carboidratos e discos de papel impregnados com carboidratos, nos quais observou-se o crescimento ao redor, após o período de incubação de 24 a 72 horas.

O detalhamento das técnicas da Prova do Tubo germinativo, Prova da presença do clamidósporo e Auxonograma, consta do ANEXO V.

Para todos os microorganismos isolados foram utilizadas as provas confirmatórias, mesmo tendo apresentado a prova presuntiva positiva.

Como há similaridade na identificação fenotípica entre as espécies *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, e não foram utilizadas provas de identificação genotípica, adotou-se a terminologia *Candida spp* para todos os microorganismos isolados, mesmo com provas presuntivas e confirmatórias positivas.

5.7.2.2- Cultura de amostras para o isolamento de bactérias

5.7.2.2.1- Meios de cultura

As amostras foram semeadas em movimentos de estrias sobre a superfície dos meios de cultura. O material foi observado por 24 horas, à temperatura de 37°C. Para todos os meios, quando o resultado foi negativo para crescimento bacteriano, o material foi observado diariamente por mais quatro dias.

5.7.2.2.1.1- Meio de Ágar Chocolate

O meio de Ágar Chocolate é amplamente utilizado para o cultivo de microorganismos exigentes, como *Haemophilus spp*, *Neisseria spp*, *Branhamella catarrhalis* e *Moraxella spp*. À base do meio, é adicionado sangue de cavalo, carneiro ou coelho em temperatura alta, o que faz com que as hemácias litem, liberando hemina e hematina, compostos fundamentais para o crescimento desses microorganismos (BALOWS et al., 1991). Neste estudo foi utilizado sangue de carneiro.

O meio de cultura foi pesado e hidratado de acordo com instruções do fabricante (ACUMEDIA[®]) e esterilizado em autoclave. Após a esterilização, foi resfriado a 80°C e adicionados de 5mL de sangue desfibrinado de carneiro, para cada 100mL de base. Posteriormente, foi homogeneizado até a lise total das hemácias, apresentando cor castanho escuro, e distribuído em placas de 90 mm de diâmetro, para a realização da semeadura.

O crescimento de colônias de tamanho pequeno a médio, com pigmento amarelo, foi presuntivo da presença de *Neisseria spp*, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* ou *Moraxella spp*. O crescimento de colônias pequenas e delicadas, com pigmento creme claro, foi presuntivo da presença de *Haemophilus spp*.

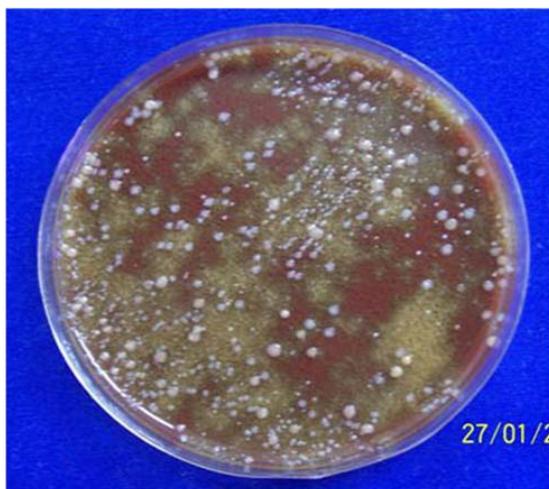


Figura 4- Paciente JRA (nº 26), 2 anos. Crescimento de microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos em meio de Agar Chocolate

5.7.2.2.1.2- Meio de Ágar Sangue

O meio de Ágar Sangue, usando uma base rica, oferece ótimas condições de crescimento da maioria dos microrganismos. A conservação dos eritrócitos íntegros favorece a formação de nítidos halos de hemólise, úteis para a diferenciação de *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*. A utilização desse tipo de meio é indicada para os casos de verificação de hemólise dos *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp*; prova de satelitismo (para identificação presuntiva de *Haemophilus spp*) e para o isolamento de microrganismos não fastidiosos (BALOWS et al., 1991).

O meio de cultura foi pesado e hidratado de acordo com instruções do fabricante (HIMEDIA[®]) e esterilizado em autoclave. Após esterilização, foi resfriado a 50°C e adicionados 5mL de sangue desfibrinado de carneiro, para cada 100mL de base. Posteriormente foi homogeneizado, delicadamente, para não formar bolhas e distribuído em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, para a realização da semeadura. No final da semeadura, o meio foi perfurado com a alça, para verificar hemólise em profundidade.

A visualização de halo transparente ao redor das colônias semeadas indicava presença de beta hemólise, com lise total dos eritrócitos. Quando se observou halo esverdeado ao redor das colônias semeadas, houve a indicação de alfa hemólise, com lise parcial dos eritrócitos. A última situação observada foi a ausência de halo ao redor das colônias, sem hemólise.



Figura 5- Paciente MEA(n° 65), 4 anos. Crescimento de microorganismos Gram-positivos em meio de Agar Sangue

5.7.2.2.1.3- Meio de Ágar McConkey

O meio de Ágar McConkey é indicado para isolar bacilos Gram-negativos (enterobactérias e não fermentadores) e verificar a fermentação da lactose (BALOWS et al., 1991).

O meio de cultura foi pesado e hidratado de acordo com instruções do fabricante (OXOID®) e aquecido sob agitação, até fundir completamente o Agar. Foi realizada esterilização em autoclave. Após esterilização, foi resfriado a 50°C e distribuído em alíquotas de 25mL em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, para posterior realização da semeadura. A visualização de colônias cor de rosa indicou a presença de bactérias fermentadoras de lactose. O crescimento de colônias incolores indicou a presença de bactérias não fermentadoras de lactose.

A partir do crescimento nos meios de cultura Ágar sangue e/ou Ágar chocolate, foram realizadas as séries bioquímicas específicas, para identificação fenotípica do microorganismo. Para todas as identificações dos microorganismos seguiu-se a identificação de colônias isoladas, a fim de garantir a identificação correta do gênero e espécie. Os testes para identificação foram realizados de acordo com as normas preconizadas pela *American Society for Microbiology* (MURRAY et al., 2003).



Figura 6- Crescimento de microorganismos Gram-negativos em meio de Ágar McConkey

5.8- Aspectos éticos

Os responsáveis legais pelos pacientes incluídos neste estudo receberam as informações relacionadas aos objetivos da pesquisa, bem como sobre os métodos e procedimentos utilizados para o seu desenvolvimento. Os pacientes com mais de

sete anos de idade, e cujo nível de compreensão permitiu, também foram devidamente esclarecidos quanto aos aspectos relacionados à pesquisa. Todos os pacientes ou responsáveis legais, consentiram previamente com sua inclusão no estudo. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro Infantil Boldrini e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/CONEP. O estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com o projeto registrado sob o número 04/11274-5.

Para preservar a identidade do paciente, o formulário de coleta de dados não conteve o nome ou o número do prontuário. Foram indicados somente as iniciais do nome dos pacientes e um número de registro, que foi vinculado ao número do prontuário. A utilização destes últimos ocorreu nas situações em que houve a necessidade de checagem de dados para os exames laboratoriais. Esta ficha de controle é apresentada no ANEXO VI.

Foram rigorosamente seguidos todos os aspectos éticos, especificamente determinados pelas diretrizes e normas da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra teve como base a prevalência de *HSV-1*. Dessa maneira, assumindo-se o nível de significância de 5%, temos que:

n =	$Z^2_{1-\alpha/2} P(1-P)$
	ε^2

Onde:

Z = valor da distribuição normal padrão com respectivo nível de confiança

P = 50%

ε = 13%

Portanto, foi necessário que se avaliasse, no mínimo, 57 crianças. Considerando-se recomendável aumentar o tamanho da amostra em 10%, o mesmo passou a ser de $n = 63$ ($57 + 5.7$), no caso de ocorrer informações perdidas. O tamanho final da amostra foi estipulado como, no mínimo, de 63 crianças.

O banco de dados foi construído com a utilização do programa SAS[®], versão 8.2. Para todos os testes estatísticos foi adotado erro alfa de 5%.

Foi realizada estatística descritiva dos dados, com apresentação da distribuição de frequências, medidas de tendência central e medidas de dispersão.

O teste Exato de Fisher foi utilizado para analisar a associação entre os graus da intensidade da mucosite e a presença da microbiota oral. A estimativa de riscos para o grau de mucosite foi calculada por regressão logística.

7- RESULTADOS

No D14 foram avaliados 71 pacientes quanto ao grau da mucosite. No D56 foram avaliados 67 pacientes, pois três [MPS (n°1), HSC (n°17) e GGA (n°61)] foram a óbito e um foi perdido de seguimento, pois foi transferido para continuar o tratamento em outro hospital [MEA (n°65)].

Os dados relativos à idade, gênero, graus da mucosite, valores das frequências do *HSV-1*, *Candida spp* e contagem total de bactérias, nos pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia, nos dois momentos de avaliação (D14 e D56), estão sumarizados na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Discriminação da idade, gênero, graus da mucosite, valores das frequências do *HSV-1*, *Candida spp* e contagem total de bactérias, nos pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia, nos dois momentos de avaliação (D14 e D56).

Nº	Iniciais	Idade (meses)	Gênero	Grau da mucosite D14	<i>HSV-1</i> D14	Total de UFC/mm ³ de bactérias D14	Tipo do fungo presente D14	Total de UFC/mm ³ de fungos D14	Grau da mucosite D56	<i>HSV-1</i> D56	Total de UFC/mm ³ de bactérias D56	Tipo do fungo presente D56	Total de UFC/mm ³ de fungos D56
1	MPS	216	Masculino	3	Positivo	201700	Ausente	0	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
2	AOR	120	Masculino	0	Negativo	1100000	Ausente	0	1	Negativo	120000	Ausente	0
3	KJA	96	Feminino	3	Negativo	300000	Ausente	0	2	Negativo	100000	Ausente	0
4	IGR	48	Masculino	1	Negativo	140000	Candida	30000	1	Ausência de β-globina	110000	Ausente	0
5	JCSC	144	Masculino	1	Negativo	25400	Ausente	0	0	Negativo	100000	Ausente	0
6	LGD	24	Feminino	1	Negativo	10030000	Candida	900	0	Ausência de β-globina	300000	Candida	1600
7	MFB	48	Feminino	1	Negativo	200000	Ausente	0	1	Negativo	2000000	Ausente	0
8	BDS	204	Masculino	1	Negativo	260000	Ausente	0	1	Negativo	500000	Ausente	0
9	MCD	36	Feminino	0	Negativo	106000000	Ausente	0	2	Negativo	400000	Ausente	0
10	TDS	156	Feminino	1	Negativo	170000	Amostra inadequada	0	1	Negativo	22000	Ausente	0
11	YQ	18	Masculino	1	Negativo	350000	Ausente	0	1	Negativo	350000	Ausente	0
12	JVSA	21	Masculino	2	Negativo	20000000	Ausente	0	0	Negativo	200000	Ausente	0
13	JRD	81	Feminino	1	Negativo	200000	Ausente	0	2	Negativo	101000	Ausente	0
14	ABBS	150	Masculino	1	Negativo	150000	Ausente	0	1	Negativo	250600	Candida	3600
15	EANM	178	Feminino	1	Ausência de β-globina	105000	Ausente	0	3	Negativo	60800	Ausente	0
16	RAA	168	Masculino	3	Positivo	907000	Candida	2700	3	Positivo	1300000	Ausente	0
17	HSC	204	Feminino	2	Negativo	500000	Ausente	0	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
18	VKK	3	Masculino	0	Negativo	300900	Ausente	0	1	Negativo	104000	Ausente	0
19	CATF	228	Masculino	2	Negativo	205000	Ausente	0	1	Negativo	500000	Ausente	0
20	SOG	58	Masculino	1	Negativo	600000	Ausente	0	3	Negativo	120000	Ausente	0
21	ASC	216	Feminino	1	Negativo	180000	Ausente	0	0	Negativo	900000	Ausente	0
22	MPS	77	Feminino	3	Positivo	210200	Candida	10600	0	Negativo	300000	Ausente	0
23	FV	190	Masculino	1	Negativo	138000	Ausente	0	0	Negativo	243700	Ausente	0
24	ISS	25	Feminino	1	Positivo	300900	Ausente	0	3	Positivo	110000	Ausente	0
25	DJD	223	Masculino	2	Negativo	200000	Candida	75000	0	Negativo	500000	Candida	2900
26	JRA	31	Masculino	2	Negativo	130000	Ausente	0	0	Negativo	120000	Ausente	0
27	CKS	119	Feminino	0	Negativo	380000	Ausente	0	0	Negativo	360000	Candida	200
28	CAFS	82	Masculino	3	Positivo	20100000	Candida	116000	2	Negativo	280000	Ausente	0
29	WSM	132	Masculino	1	Negativo	280000	Ausente	0	0	Negativo	530000	Ausente	0
30	LAD	84	Masculino	1	Negativo	570000	Ausente	0	0	Negativo	180000	Candida	5400
31	LHB	112	Masculino	1	Negativo	350000	Candida	100	2	Positivo	603000	Ausente	0
32	LES	92	Feminino	1	Negativo	273000	Candida	1300	2	Negativo	615000	Ausente	0
33	JTCS	175	Feminino	1	Negativo	200000	Ausente	0	3	Negativo	420000	Ausente	0
34	DHO	156	Masculino	1	Negativo	10004130	Candida	32000	1	Negativo	350000	Ausente	0

Tabela 1 (cont.) – Discriminação da idade, gênero, graus da mucosite, valores das frequências do *HSV-1*, *Candida spp* e contagem total de bactérias, nos pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia, nos dois momentos de avaliação (D14 e D56).

Nº	Iniciais	Idade (meses)	Gênero	Grau da mucosite D14	<i>HSV-1</i> D14	Total de UFC/mm ³ de bactérias D14	Tipo do fungo presente D14	Total de UFC/mm ³ de fungos D14	Grau da mucosite D56	<i>HSV-1</i> D56	Total de UFC/mm ³ de bactérias D56	Tipo do fungo presente D56	Total de UFC/mm ³ de fungos D56
35	MLS	50	Masculino	1	Negativo	98000	Ausente	0	1	Negativo	120000	Ausente	0
36	VMRA	57	Feminino	1	Negativo	600000	Ausente	0	0	Negativo	350000	Ausente	0
37	VHA	72	Masculino	3	Positivo	1015000	Candida	1000	1	Negativo	23000	Ausente	0
38	TYGF	65	Masculino	1	Negativo	700000	Ausente	0	1	Negativo	600000	Ausente	0
39	KSSA	37	Feminino	1	Negativo	380000	Ausente	0	0	Negativo	450000	Ausente	0
40	JBM	146	Masculino	3	Positivo	530000	Candida	14000	1	Negativo	209000	Ausente	0
41	VFM	60	Masculino	2	Positivo	630000	Candida	2400	0	Negativo	900000	Ausente	0
42	RCM	39	Masculino	3	Positivo	170000	Candida	40000	3	Positivo	570000	Candida	1600
43	RFS	110	Masculino	1	Negativo	320000	Ausente	0	1	Negativo	800000	Ausente	0
44	WRS	93	Masculino	2	Negativo	325000	Candida	5000	2	Negativo	250000	Candida	15000
45	JPA	119	Feminino	1	Negativo	500000	Ausente	0	1	Negativo	330000	Candida	2400
46	AA	213	Masculino	1	Negativo	530000	Ausente	0	0	Negativo	230000	Candida	5000
47	BBCC	106	Masculino	0	Negativo	640000	Ausente	0	1	Negativo	250000	Ausente	0
48	GCM	156	Feminino	1	Negativo	200000	Ausente	0	0	Negativo	128000	Ausente	0
49	BMPB	83	Feminino	1	Negativo	530000	Ausente	0	0	Negativo	140000	Ausente	0
50	ESM	70	Masculino	1	Negativo	302500	Ausente	0	1	Negativo	80000	Ausente	0
51	FMC	93	Masculino	1	Negativo	190000	Ausente	0	0	Negativo	270000	Ausente	0
52	CP	76	Feminino	1	Negativo	400000	Ausente	0	0	Negativo	600000	Ausente	0
53	MCA	23	Masculino	1	Negativo	630000	Ausente	0	1	Negativo	280000	Ausente	0
54	MTL	71	Feminino	1	Negativo	500000	Ausente	0	0	Negativo	450000	Ausente	0
55	VRSM	34	Feminino	0	Negativo	260000	Candida	1700	1	Negativo	450000	Ausente	0
56	GVB	28	Masculino	1	Negativo	600000	Ausente	0	0	Negativo	800000	Ausente	0
57	HCP	47	Masculino	1	Negativo	118400	Ausente	0	0	Negativo	120000	Ausente	0
58	TGB	6	Masculino	2	Negativo	1000000	Ausente	0	1	Negativo	8026000	Ausente	0
59	GMBVM	86	Feminino	1	Negativo	520000	Ausente	0	1	Negativo	70000	Candida	10000
60	KRMC	16	Masculino	1	Negativo	600000	Ausente	0	0	Negativo	370000	Ausente	0
61	GGA	21	Feminino	1	Ausência de β-globina	600000	Candida	500	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito	Óbito
62	IDP	74	Masculino	1	Negativo	550000	Ausente	0	0	Negativo	260000	Ausente	0
63	GVLLA	38	Feminino	1	Negativo	730000	Ausente	0	1	Negativo	170000	Ausente	0
64	NWS	22	Feminino	1	Negativo	240000	Ausente	0	0	Negativo	600000	Ausente	0
65	MEA	59	Masculino	1	Negativo	380000	Ausente	0	Transferido	Transferido	Transferido	Transferido	Transferido
66	NNNV	46	Masculino	1	Negativo	417.000	Ausente	0	0	Negativo	190000	Ausente	0
67	SPD	19	Masculino	2	Negativo	620000	Ausente	0	1	Negativo	540000	Ausente	0
68	ALA	39	Masculino	1	Negativo	350000	Ausente	0	0	Negativo	320000	Ausente	0
69	BCFS	209	Feminino	1	Negativo	150000	Ausente	0	0	Negativo	313000	Ausente	0
70	TCTS	151	Feminino	2	Negativo	400000	Ausente	0	1	Negativo	100000	Ausente	0
71	GLMSS	94	Masculino	1	Negativo	530000	Candida	200	0	Negativo	500000	Ausente	0

A idade dos pacientes incluídos neste estudo variou entre 3 a 228 meses, com a média de $93,1 \pm 63,4$ e a mediana de 79 meses (Figura 7).

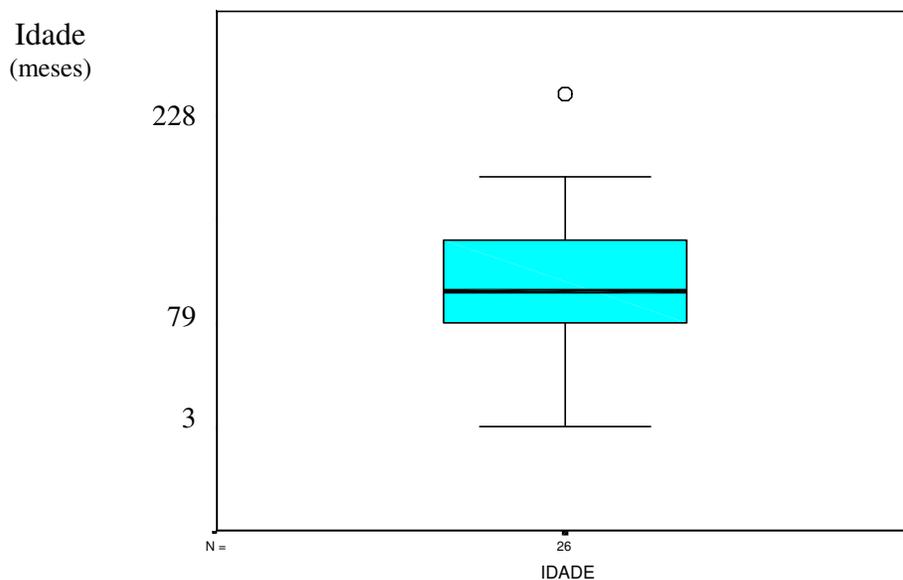


Figura 7- Distribuição da frequência das idades (em meses) dos pacientes com LLA, submetidos à quimioterapia.

A distribuição dos pacientes quanto ao gênero demonstrou que 61,1% eram masculinos (Figura 8).

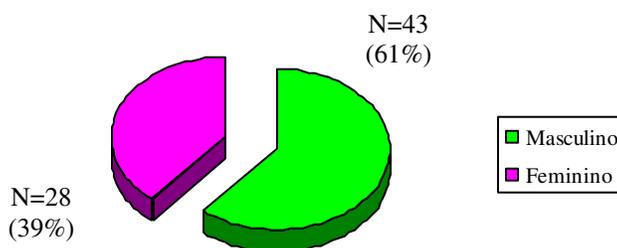


Figura 8- Distribuição dos pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia, de acordo com o gênero

Ocorreram 103 episódios de mucosite nos pacientes do estudo, sendo 65 na avaliação do D14 e 38 na avaliação do D56. A distribuição dos graus da mucosite e os achados da microbiota oral dos pacientes do estudo, avaliados em dois momentos definidos (D14 e D56), estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição da frequência absoluta (N) e relativa (%) dos graus da mucosite, valores das frequências do *HSV-1*, *Candida spp* e contagem total de bactérias, nos pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia, nos dois momentos de avaliação (D14 e D56), de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

Momentos da avaliação Graus da mucosite e elementos da microbiota oral	D14 (71 pacientes)		D56 (67 pacientes)	
	N	%	N	%
HSV -1				
Presente	9	12,9	4	6,3
Ausente	61	87,1	61	93,7
Candida spp				
Presente	18	25,7	10	14,9
Ausente	52	74,3	57	85,1
Total de UFC de Candida spp /mm³				
<1.700	58	82,8	54	80,0
≥1.700	12	17,2	13	20,0
Total de UFC de Bactérias /mm³				
< 510.000	44	62,9	52	77,6
≥ 510.000	27	37,1	15	22,4
Grau da mucosite (critérios NCI)				
0	6	8,3	29	43,3
1	47	65,3	25	37,4
2	10	13,9	7	10,5
3	8	11,1	6	8,8
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

*UFC=unidades formadoras de colônias; N=valor absoluto; %=valor percentual; D=dia;
NCI=National Cancer Institute

Os pacientes que desenvolveram úlceras apresentaram lesões em mucosa jugal, assoalho de boca, lábio e palato duro (Figuras 9 e 10). As lesões se acompanhavam de dor, hiperemia e fibrina, com apresentação clínica variando conforme sua intensidade. Os pacientes obtiveram a regressão da mucosite no período médio de 9 dias (5 a 13 dias).



Figura 9- Paciente MPS (n°22), 6 anos, com lesões ulceradas circinadas, hiperemiadas, presença do *HSV-1*



Figura 10- Paciente JPA (n°45), 9anos, úlceras pouco hiperemiadas, presença de pseudomembrama, presença de *Candida spp*

A frequência da ocorrência das mucosites no D14 foi de 90,3%, 65,3% foram classificadas como grau 1, 13,9% como grau 2, 11,1% como grau III e nenhuma classificada como grau 4 ou 5. Seis pacientes não desenvolveram mucosite neste momento da avaliação, sendo classificados como grau 0.

No D14 não foi possível avaliar a presença do *HSV-1* em um paciente (EANM, n°15), pois não havia DNA viável. Também não foi possível avaliar a presença de *Candida spp* em outro paciente (TDS, n° 10), pois a cultura foi comprometida por contaminação por *Penicilium spp*, sendo descartada. Dentre os 9 casos com identificação do *HSV-1* no dia 14 da terapia de Indução, 7 apresentaram mucosite grau 3 (87,5%).

No D56 da terapia, 38 (56,7%) apresentaram mucosite, sendo 37,4% classificadas como grau 1 (25 pacientes), 10,5% como grau 2 (7 pacientes), 8,8% como grau 3 (6 pacientes). Nenhum paciente teve mucosite classificada como grau 4 ou 5. Nesse momento, não foi possível avaliar a presença do *HSV-1* em dois pacientes (IGR, n°4 e LGD, n°6), pois não havia DNA viável na amostra coletada. O *HSV-1* foi identificado em 4 pacientes, sendo 3 deles com mucosites grau 3.

As bactérias identificadas com maior frequência, nos dias 14 e 56 da terapia, foram o *Streptococcus viridans* (71 e 67 pacientes, respectivamente) e *Neisseria sp* (68 e 64 pacientes, respectivamente). A distribuição dos diferentes grupos bacterianos identificados, nos dia 14 e 56 da terapia, está demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3- Distribuição da frequência absoluta (N) e relativa (%) das bactérias isoladas em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia, conforme protocolo GBTLI LLA 99, avaliados nos dias 14 e 56 da terapia

Bactérias isoladas	D14		D56	
	N	%	N	%
<i>Streptococcus viridans</i>	71	100	67	100
<i>Neisseria spp</i>	68	95,7	64	95,5
<i>Corynebacterium spp</i>	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	2	2,8	3	4,5
<i>Moraxella</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1,4	0	0
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	13	8,3	3	4,5
<i>Streptococcus beta-hemolíticos</i>	0	0	0	0
<i>Haemophilus</i>	19	26,7	16	23,8
<i>Streptococcus</i> grupo não D	3	4,2	3	4,5
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	1,4	0	0

N=valor absoluto; %=valor percentual; D=dia

A análise da associação entre os graus da mucosite e a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da microbiota oral, na avaliação do D14, consta na Tabela 4. No D14 foi observada associação estatisticamente significativa entre a intensidade da mucosite e a presença do *HSV-1* ($p < 0,0001$), *Candida spp* ($p = 0,0078$) e número de colônias de *Candida spp* ($p = 0,0012$). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre UFC de bactérias e graus de mucosite ($p = 0,7512$).

Tabela 4- Análise da associação entre os graus da mucosite e a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral na avaliação do D14 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

Elementos da microbiota oral	Grau da Mucosite no D14								Valor-p**
	Grau 0		Grau 1		Grau 2		Grau 3		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>HSV-1</i>									
Negativo	6	100,0	44	97,8	9	90,0	1	12,5	< 0,0001
Positivo	0	0,0	1	2,2	1	10,0	7	87,5	
Sem DNA viável	0	-	2	-	0	-	0	-	
<i>Candida spp</i>									
Presente	5	83,3	38	82,6	7	70	2	25,0	0,0078
Ausente	1	16,7	8	17,4	3	30	6	75,0	
Amostra inadequada	0	-	1	-	0	-	0	-	
UFC* de <i>Candida spp</i>/mm³									
< 1 700	5	83,3	43	93,5	7	70	3	37,5	0,0012
≥ 1 700	1	16,7	3	6,5	3	30	5	62,5	
Amostra inadequada	0	-	1	-	0	-	0	-	
UFC de Bactérias/mm³									
< 510 000	3	50,0	31	66,0	6	60,0	4	50,0	0,7251
≥ 510 000	3	50,0	16	34,0	4	40,0	4	50,0	

*UFC= unidades formadoras de colônias; **Teste Exato de Fisher; N=valor absoluto; %=valor percentual; D=dia

No cálculo da estimativa de risco, observou-se que, no D14, foram considerados fatores para o aumento do grau da mucosite a presença de *Candida spp* (Odds Ratio=15; IC95% 1,03 - 218,31) e a presença do *HSV-1*. A estimativa de risco para os graus 1, 2 e 3 da mucosite oral, no D14, está discriminados nas figuras 11, 12 e 13, a seguir.

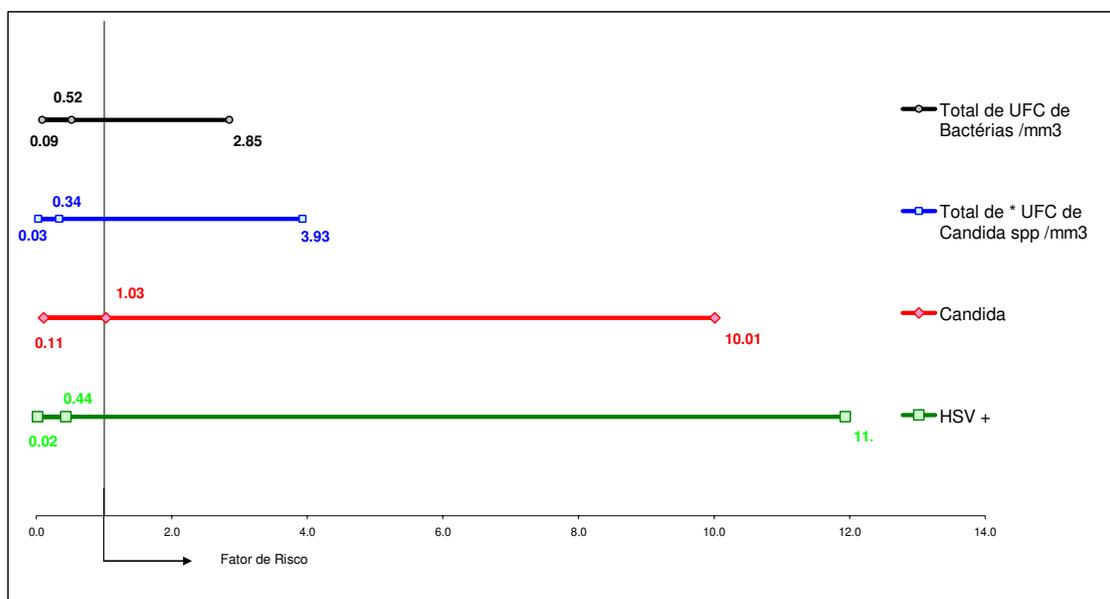


Figura 11- Estimativa de risco para mucosite grau 1, de acordo com a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia (IC=95%), no D14 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

Conforme demonstrado na Figura 11, nenhuma das variáveis analisadas foi considerada fator de risco para o desenvolvimento de mucosite grau 1 no D14. O total de UFC de bactérias/mm³ apresentou Odds Ratio = 0,52; 0,09 – 2,85; IC95%. O total de UFC de *Candida spp*/mm³ apresentou Odds Ratio = 1,03; 0,11 – 10,11; IC95%. A positividade para *Candida spp* apresentou Odds Ratio = 0,44; 0,02 – 11,94; IC95%. A positividade para *HSV-1* apresentou Odds Ratio = 0,44; 0,02 – 11,94; IC95%.

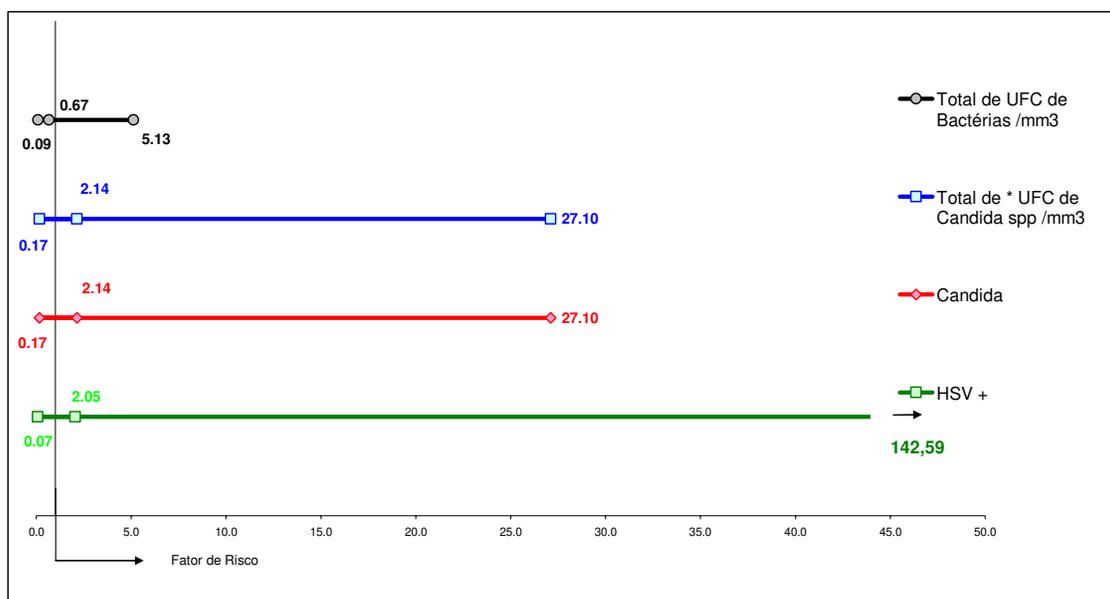


Figura 12- Estimativa de risco para mucosite grau 2, de acordo com a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia (IC=95%), no D14 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

A Figura 12 demonstra que nenhuma das variáveis analisadas foi considerada fator de risco para o desenvolvimento de mucosite grau 2 no D14.

O total de UFC de bactérias/mm³ apresentou Odds Ratio = 0,67; 0,09 – 5,13; IC95%. O total de UFC de *Candida spp*/mm³ apresentou Odds Ratio = 2,14; 0,17 – 27,10; IC95%.

A positividade para *Candida spp* apresentou Odds Ratio = 2,14; 0,17 – 27,10; IC95%. A positividade para *HSV-1* apresentou Odds Ratio = 0,44; 2,05 – 142,59; IC95%.

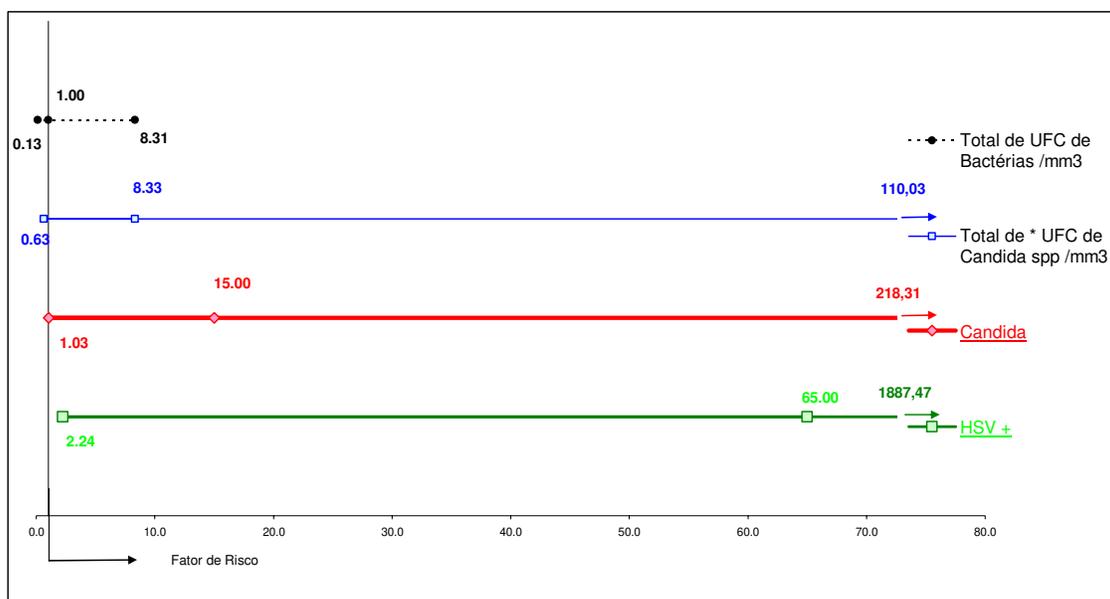


Figura 13- Estimativa de risco para mucosite grau 3, de acordo com a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia (IC=95%), no D14 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

A Figura 13 apresenta as estimativas de risco para a mucosite grau 3 no D14. O total de UFC de bactérias/mm³ apresentou Odds Ratio = 1,0; 0,13 – 8,31; IC95%. O total de UFC de *Candida spp*/mm³ apresentou Odds Ratio = 8,33; 0,63 – 110,03; IC95%. Essas variáveis não foram consideradas fatores de risco para a mucosite grau 3, no D14.

A positividade para *Candida spp* (Odds Ratio = 15,0; 1,3 – 218,31; IC95%) e a positividade para *HSV-1* (Odds Ratio = 65,0; 2,24 – 1888,47; IC95%) foram consideradas fatores de risco para mucosite grau 3, no D14.

A análise da associação entre os graus da mucosite e a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da microbiota oral, na avaliação do D56, consta na Tabela 5. Nesse momento, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a intensidade da mucosite e presença de *HSV-1* no D14 ($p < 0,0001$), a presença do *HSV-1* no D56 ($p < 0,0001$) e UFC de *Candida spp* ($p = 0,0247$). Não foi observada associação estatisticamente significativa entre UFC de bactérias e graus de mucosite ($p = 0,5028$).

Tabela 5- Análise da associação entre os graus da mucosite e a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral na avaliação do D56 da terapia de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

Elementos da microbiota oral	Grau da Mucosite no D56								Valor- <i>p</i> **
	Grau 0		Grau I		Grau II		Grau III		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
<i>HSV-1</i> no D14									
Negativo	27	93,1	23	92,0	7	100,	1	20,0	0,0001
Positivo	2	6,9	2	8,0	0	0	4	80,0	
Sem DNA viável	0	-	0	-	0	0,0	1	-	
<i>HSV-1</i>									
Negativo	28	100,	24	100,0	6	85,7	3	50,0	< 0,0001
Positivo	0	0	0	0,0	1	14,3	3	50,0	
Sem DNA viável	1	0,0	1	-	0	-	0	-	
<i>Candida spp</i>									
Presente	5	17,2	3	12,0	1	14,3	1	16,7	0,9491
Ausente	24	82,8	22	88,0	6	85,7	5	83,3	
UFC* de <i>Candida spp</i>/mm³									
< 1 700	26	89,7	22	88,0	6	85,7	6	100,0	0,0247
≥ 1 700	3	10,3	3	12,0	1	14,3	0	0,0	
UFC de Bactérias/mm³									
< 510 000	23	79,3	20	80,0	5	71,4	4	66,7	0,5028
≥ 510 000	6	20,7	5	20,0	2	28,6	2	33,3	

*UFC= unidades formadoras de colônias; **Teste Exato de Fisher; N=valor absoluto; %=valor percentual; D=dia

Chama atenção a relação entre o grau da mucosite no D56 e a presença do *HSV-1* no D14, com associação estatística fortemente significativa.

Quando se calculou a estimativa de risco, observou-se que no D56 foram considerados fatores para o aumento do grau de mucosite a presença do *HSV-1* no D14 (Odds Ratio=54; IC95% 3,93 - 741,83) e a presença de *HSV-1* no D56 (Odds Ratio=57; IC95% 2,41 - 1349,40).

A estimativa de risco para os graus 1, 2 e 3 da mucosite oral na avaliação do D56 estão apresentados nas figuras 14, 15 e 16, a seguir.

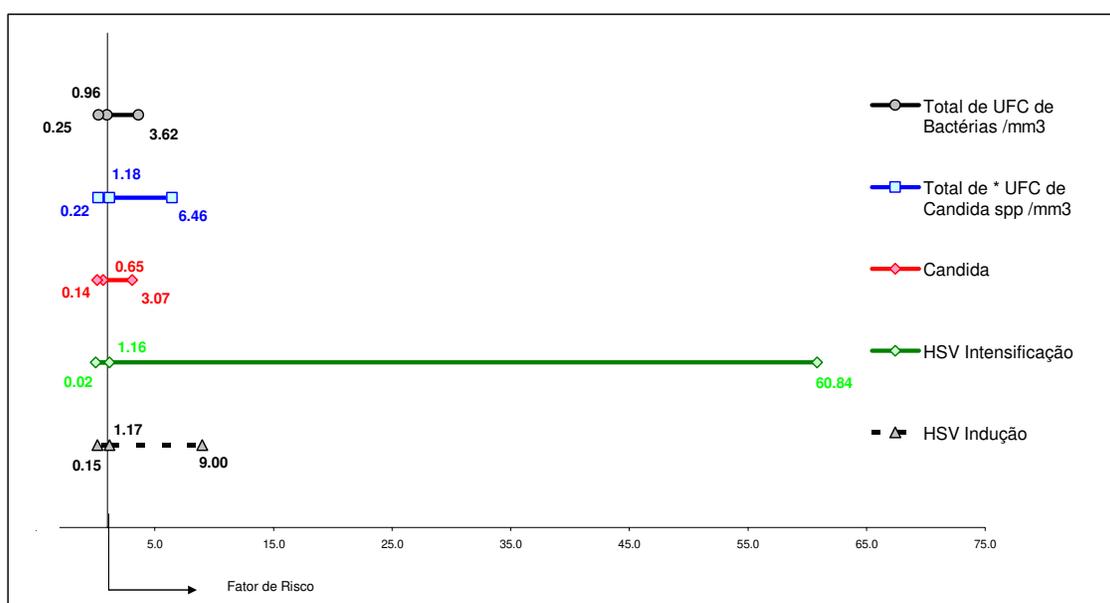


Figura 14- Estimativa de risco para mucosite grau 1, de acordo com a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia (IC=95%), no D56 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

Conforme demonstrado na Figura 14, nenhuma das variáveis analisadas foi considerada fator de risco para o desenvolvimento de mucosite grau 1, no D56. O total de UFC de bactérias/mm³ apresentou Odds Ratio = 0,96; 0,25 – 3,62; IC95%. O total de UFC de *Candida spp*/mm³ apresentou Odds Ratio = 0,22; 0,18 – 6,46; IC95%. A positividade

para *Candida spp* apresentou Odds Ratio = 0,65; 0,14 – 3,07; IC95%. A positividade para *HSV-1* no D56 apresentou Odds Ratio = 1,16; 0,02 – 60,84; IC95%. A positividade para *HSV-1* no D14 apresentou Odds Ratio = 1,17; 0,15 – 9,0; IC95%.

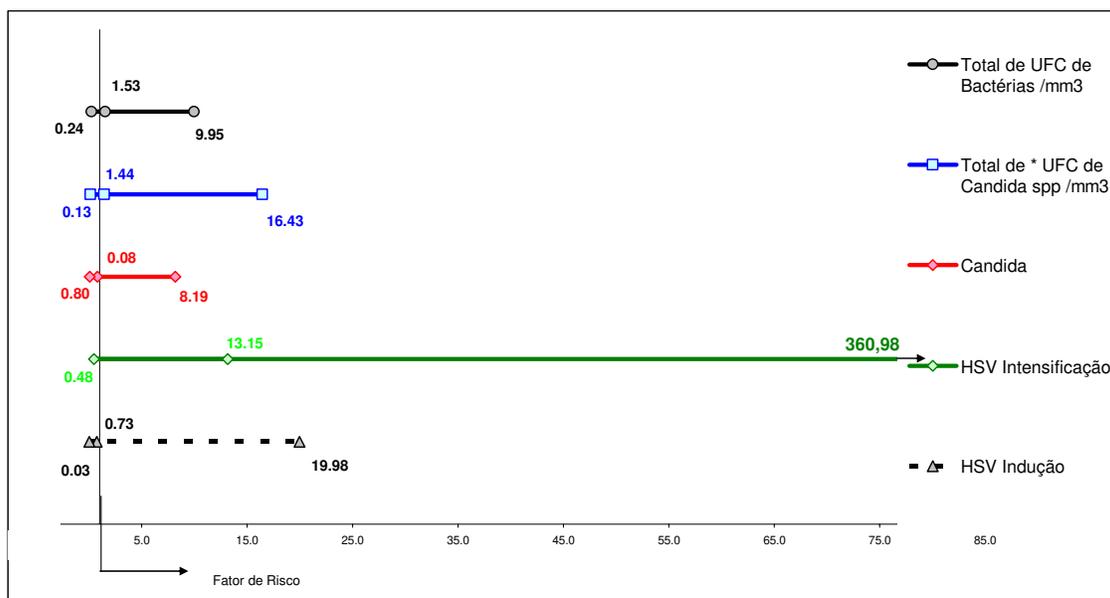


Figura 15- Estimativa de risco para mucosite grau 2, de acordo com a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia (IC=95%), no D56 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

A Figura 15 demonstra que nenhuma das variáveis analisadas foi considerada fator de risco para o desenvolvimento de mucosite grau 2, no D56. O total de UFC de bactérias/mm³ apresentou Odds Ratio = 1,53; 0,24 – 9,95; IC95%. O total de UFC de *Candida spp*/mm³ apresentou Odds Ratio = 1,44; 0,13 – 16,43; IC95%. A positividade para *Candida spp* apresentou Odds Ratio = 0,80; 0,08 – 8,19; IC95%. A positividade para *HSV-1* no D56 apresentou Odds Ratio = 13, 15; 0,48 – 360,98; IC95%. A positividade para *HSV-1* no D14 apresentou Odds Ratio = 0,73; 0,03 – 19,98; IC95%.

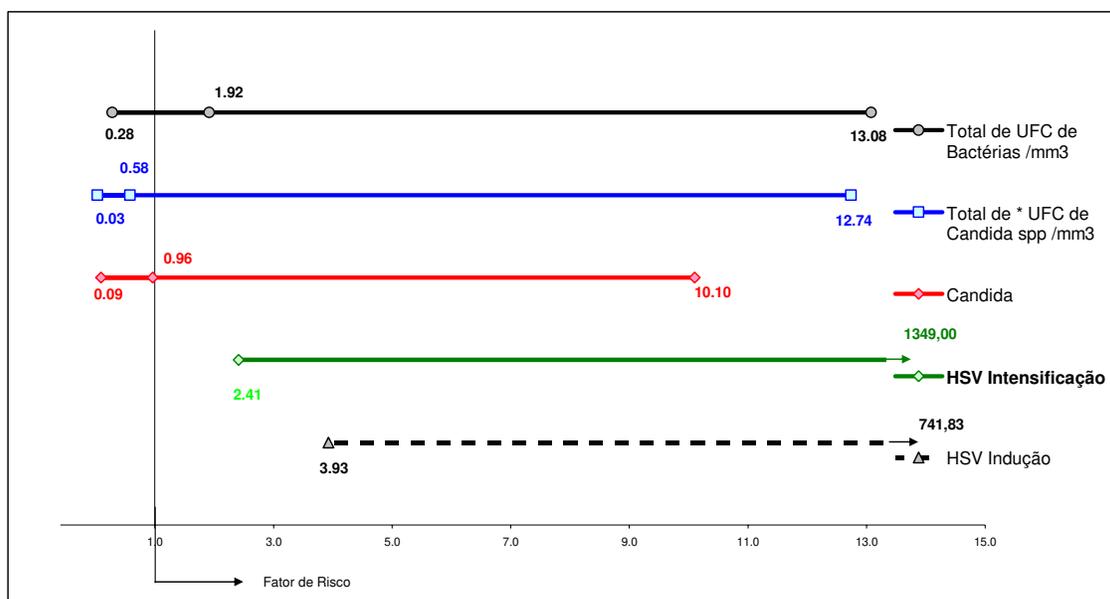


Figura 16- Estimativa de risco para mucosite grau 3, de acordo com a presença do *HSV-1*, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos com LLA, submetidos à quimioterapia (IC=95%), no D56 da terapia, de acordo com o Protocolo GBTLI LLA-99

A Figura 16 apresenta as estimativas de risco para a mucosite grau 3, no D56. O total de UFC de bactérias/mm³ apresentou Odds Ratio = 1,92; 0,28 – 13,08; IC95%. O total de UFC de *Candida spp*/mm³ apresentou Odds Ratio = 0,58; 0,03 – 12,74; IC95%. A positividade para *Candida spp* apresentou Odds Ratio = 0,96; 0,09 – 10,10; IC95%. Estas variáveis não foram consideradas fatores de risco para a mucosite grau 3, no D14.

A positividade para *HSV-1* no D56 (Odds Ratio = 57,0; 2,41 – 1349,40; IC95%) e a positividade para *HSV-1* no D14 (Odds Ratio = 54,0; 3,93 – 741,83; IC95%) foram consideradas fatores de risco para mucosite grau 3, no D14.

8- DISCUSSÃO

A casuística deste estudo é uma das maiores encontradas na literatura consultada. Não foram encontrados estudos, com avaliação prospectiva em momentos sistematizados, que pesquisassem a associação entre os graus da mucosite e presença do HSV-1, *Candida spp* e bactérias da cavidade oral, em pacientes pediátricos submetidos à quimioterapia. Dessa forma, a presente casuística revestiu-se de importância, pela avaliação prospectiva sistemática da ocorrência das mucosites em pacientes pediátricos com LLA. A escolha dos períodos de indução e de intensificação decorreu da associação da Dexametasona, Daunoblastina, Doxorubicina, L-asparaginase, Vincristina, Metotrexato e Citarabina, que, em associação, estão relacionados ao desenvolvimento das mucosites (CAMITTA et al, 1989; NAPENAS et al, 2007a).

O discreto predomínio da LLA nos meninos (1,5 masculino: 1,0 feminino) está de acordo com a literatura (NCI, 2007c). Normalmente observa-se um pico de incidência em crianças entre os 2 e 3 anos de idade (SMITH et al, 1999). A idade média desses 71 pacientes, de 7,7 anos, está acima da faixa etária prevalente, o que pode ter ocorrido ao acaso.

No presente estudo, o tempo de recuperação da mucosite (9 dias, em média) foi compatível com GALVÃO et al (2006), que relataram quadro clínico de mucosite em criança com leucemia linfóide aguda, com tempo de duração de 7 dias. No entanto, foi menor que na maioria dos trabalhos encontrado na literatura consultada (WILLIAMS & LEE, 1991; AYERS & COLQUHOUN, 2000; SONIS, 2004). FADDA et al. (2006) comentam que a mucosite oral geralmente é observada após 7 a 14 dias após o início da quimioterapia. Segundo os autores, durante as próximas duas semanas ocorre a perda da estrutura e integridade do epitélio, com o desenvolvimento de úlceras, mas destacam que a maior parte dos estudos sobre mucosite foi realizada com sujeitos adultos, requerendo o desenvolvimento de mais estudos sobre o assunto em grupos pediátricos.

Dentre os trabalhos que pesquisaram a relação entre os graus de mucosite oral já instalada e a presença do *HSV-1*, poucos tiveram como casuística a faixa etária pediátrica. RAMPHAL et al. (2007) estudaram 75 crianças com câncer, em terapia, e demonstraram prevalência do *HSV-1* em 9% da população estudada, quando a coleta das

células da mucosa oral foi realizada por *swab*. Esse resultado está de acordo com os observados no presente estudo, cuja prevalência observada do *HSV-1* na mucosa oral foi de 12,93% no D14 e de 6,2% no D56 da terapia antineoplásica.

Embora **RAMPHAL et al. (2007)** tenham estabelecido os momentos de avaliação somente durante os episódios de neutropenia febril, buscando sistematizar a pesquisa, a principal diferença para o nosso estudo é que a prevalência do *HSV-1* foi investigada pelos referidos autores nos casos de mucosite instalada. Os mesmos autores demonstraram a relação entre a presença do *HSV-1* e a ocorrência de mucosite oral, somente durante episódios de neutropenia febril ($p=0,04$). Naquele estudo, das 25 crianças que desenvolveram mucosite, 20% apresentavam positividade para o *HSV-1*. Na presente investigação, dentre os 103 episódios de mucosite do estudo, em 13 % o *HSV-1* foi positivo.

Durante a terapia de indução, somente 8,5% dos pacientes não apresentaram nenhum grau de inflamação das mucosas orais. Nesse período, a neutropenia é quase rotineiramente grave ($<500/\text{mm}^3$), com plaquetopenia, fatores que decisivamente comprometem a integridade da barreira mucosa. O uso concomitante da associação de agentes citotóxicos altera o equilíbrio entre os microorganismos da cavidade oral, exacerbando a mucosite pela produção de endotoxinas bacterianas, que contribuem para o agravamento do quadro (**SVANBORG et al., 1999; DONNELLY et al., 2003a**). O emprego dos antibióticos de amplo espectro também pode repercutir na modificação, quantitativa ou qualitativa, da microbiota oral local (**SIXOU et al., 1998; NAPÊNAS et al., 2007b**).

O *HSV-1* esteve presente em somente 12,9% das mucosites, nesta fase inicial do tratamento (D14), reduzindo a prevalência para 6,3% na fase mais tardia, na terapia de intensificação (D56). Entretanto, quando se analisam os 6 pacientes com mucosite grau 3 na avaliação do D56, 3 deles eram positivos para *HSV-1* (RAA, n°16; ISS, n°24 e RCM, n°42).

SEPÚLVEDA et al. (2005) estudaram 20 lesões ulcerativas, em 15 crianças submetidas à quimioterapia e identificaram que em 12 úlceras (60%) o resultado foi positivo para a pesquisa do *HSV-1*. No entanto, essa pesquisa não teve como objetivo

estudar a relação entre a gravidade das úlceras encontradas e a presença desse vírus. Os autores afirmaram que, apesar do *HSV-1* ter sido isolado nas úlceras na mucosa oral em 60% delas, a relação causal entre o surgimento das lesões e o *HSV-1* não pôde ser estatisticamente demonstrada.

Em estudo prévio, **SEPÚLVEDA et al. (2003)**, estudando 19 crianças e adolescentes em tratamento quimioterápico, identificaram a presença do *HSV-1* em 33% das 30 úlceras estudadas. Esses resultados aproximam-se da prevalência encontrada no presente estudo, nos pacientes com mucosites acompanhadas de úlceras (graus 2 e 3), cuja identificação do *HSV-1* ocorreu em 44% dos casos no D14 e em 31% dos casos no D56.

Resultados comparáveis aos da presente pesquisa foram obtidos por **CARREGA et al. (1994)**, que avaliaram a ocorrência de úlceras em 20 crianças submetidas à quimioterapia. Isolaram o *HSV-1* em 50% das lesões ulceradas. Sugeriram que a mucosite em crianças é um problema multifatorial, apontando o *HSV-1* como potencial co-fator. Embora os mecanismos de reativação do *HSV* ainda não sejam bem estabelecidos, é reconhecido que pacientes com vírus *Herpes simplex* soropositivos apresentam maior risco para desenvolver lesões por este vírus, durante a imunossupressão (**EPSTEIN et al., 1990**).

Poucos estudos pesquisaram a presença do *HSV-1* utilizando o *swab* oral para realizar a coleta das células da mucosa oral. Dentre os estudos encontrados na literatura consultada que utilizaram essa técnica, a prevalência observada do *HSV-1* foi de 57,1% (**RAND et al., 1982**), 36,7% (**SETO et al., 1985**), 48,3% (**MONTGOMERY et al., 1986**), 50,0% (**GREENBERG et al., 1987**) e 13,3% (**REEDING & MONTGOMERY, 1989**). A casuística naqueles estudos variou entre 15 a 30 pacientes adultos. Em dois deles, os pacientes haviam recebido o transplante de medula óssea.

A prevalência do *HSV-1* observada no presente estudo foi menor que na maioria de outros estudos realizados em crianças com câncer. Embora **SEPÚLVEDA et al., (2003; 2005)** e **CARREGA et al., (1994)** tenham coletado as amostras para análise do *HSV-1* utilizando *swab* oral, técnica também adotada no presente estudo, o fato da pesquisa para

identificação do vírus ter sido realizada em presença de úlceras, aumentando a chance de que o *HSV-1* estivesse fora do seu estado de latência, pode ter contribuído para a maior prevalência deste elemento viral, nos referidos estudos.

SMITH & ROBINSON (2002), em revisão da literatura, apresentaram a prevalência do *HSV-1* variando de 17 a 69% na população geral, com a prevalência identificada por sorologia. **LOUTFY et al., (2006)** **SMITH & ROBINSON (2002)**, **LOUTFY et al., (2006)** demonstraram que 25% de 68 crianças com LLA apresentavam sorologia positiva para o *HSV-1*. Quando comparamos a prevalência do *HSV-1* de 13% em nosso estudo, com os estudos acima referidos, observa-se que a prevalência desse vírus, com a utilização da técnica do *swab* para a coleta de células, é menor do que quando se utiliza a sorologia.

É conhecida a relação entre a duração e a intensidade da imunossupressão e o herpes (**MONTGOMERY et al., 1986; REDDING & MONTGOMERY, 1989; BERGMANN et al., 1990**). Embora a reserva medular no D56 seja maior, com maior número de neutrófilos e plaquetas, nesse período é maior a imunossupressão. Chama a atenção que no D56, onde a imunossupressão é mais evidente, a prevalência do *HSV-1* foi menor que no D14 (6,2% e 13%, respectivamente). Não conseguimos interpretar esse fato. Do ponto de vista metodológico, o rígido controle da PCR excluiu os resultados falso-negativos. Considerando-se que no período de latência o *HSV-1* encontra-se em planos profundos e a técnica do *swab* só coleta células da superfície da mucosa, é possível levantar a hipótese de que a opção por sistematizar os momentos da análise, realizando a pesquisa do vírus independentemente da presença das mucosites ulcerativas e utilizando-se a técnica de coleta por *swab* oral, pode limitar-se a identificação do *HSV-1*.

Não foram encontrados, na literatura consultada, estudos que estimassem o risco para o desenvolvimento de cada grau de mucosite oral, em momentos pré-estabelecidos para avaliação. Nenhuma das variáveis analisadas foi considerada fator de risco para o desenvolvimento da mucosite grau 1 ou 2, tanto no D14 quanto no D56.

Nesta pesquisa, no D14, a presença do *HSV-1* esteve relacionada com o risco estimado para o desenvolvimento da mucosite grau 3 de, no mínimo, 2,24 vezes. Outro fator de risco identificado foi a presença da *Candida spp.* Embora a presença desse

microorganismo esteja relacionada com o risco para o desenvolvimento da mucosite grau 3 de, no mínimo, 1,3 vezes, a quantidade total de UFC de colônias de *Candida spp*/mm³ não esteve relacionada ao aumento do risco estimado para mucosite grau 3 neste momento de avaliação.

No D56, o único microorganismo identificado como fator de risco para o desenvolvimento de mucosite grau 3 foi o *HSV-1*. A presença do *HSV-1* no D14 esteve relacionada com o risco estimado para o desenvolvimento da mucosite grau 3 no D56 de, no mínimo, 3,93 vezes. A presença do *HSV-1* no D56 também foi identificada como fator de risco para o desenvolvimento de mucosite grau 3, com probabilidade de ocorrência de, no mínimo, 2,41 vezes.

Alguns estudos demonstram que o estado de imunossupressão, após a terapia antineoplásica, favorece as infecções pelos agentes oportunistas, entre eles a *Candida* (WILKES, 1998; KANDA et al., 2000).

Clinicamente, a presença de *Candida spp* está associada com lesões pseudomembranosas, eritematosas ou hiperplásicas (REICHART et al., 2000). Na casuística do presente estudo, as lesões da mucosa oral, na presença da *Candida spp*, também se apresentaram com o aspecto pseudomembranoso. No entanto, é importante considerar que, em pacientes imunossuprimidos, essas lesões podem manifestar-se de forma atípica e o diagnóstico precoce da lesão é essencial para o estabelecimento do tratamento adequado.

Não foram encontrados, na literatura consultada, estudos, sistemáticos ou não, que analisassem a associação entre os graus da mucosite e a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) da *Candida spp* na faixa etária pediátrica. No presente estudo o valor de corte adotado foi de 1700 UFC/mm³.

A prevalência de *Candida spp* encontrada no D14 foi de 26% e no D56 foi de 15%. A definição da linha de corte foi estabelecida pela mediana das UFC. Tanto no D14 do tratamento quanto no D56 da terapia, observou-se associação estatisticamente significativa entre a intensidade da mucosite e a quantidade de UFC de *Candida spp* (p=0,0012 e p=0,0247, respectivamente). Nos 14 episódios de mucosites grau 3,

em 50% foi detectada a presença da *Candida spp.* Um estudo que estabeleceu associação estatisticamente significativa entre a quantidade de UFC de leveduras (sem especificação da espécie) e a presença de lesões de mucosite, foi o de **WAHLIN et al., (1998)**. No entanto, não foi possível comparar seu resultados com os da presente pesquisa, pois a população do referido estudo, embora composta por alguns pacientes pediátricos, apresentava mediana de idade de 42 anos.

WAHLIN et al., (1998) estudaram a microbiota oral de 20 pacientes com leucemia, com idades variando entre 5 e 74 anos. Os autores coletaram amostras de saliva e não identificaram associação estatisticamente significativa entre a contagem de bactérias da cavidade oral e a presença de lesões de mucosite.

WANANUKUL (2005) estudou 51 episódios de neutropenia febril em crianças com LLA. Identificou a presença de *Candida* em 7 dos 17 casos em que havia mucosite oral. O único estudo encontrado, na literatura consultada, que procurou demonstrar a relação entre a presença de *Candida* e mucosite oral em crianças, foi o de **SEPÚLVEDA et al., (2005)**, que avaliaram 15 crianças submetidas à quimioterapia e com úlceras orais, identificando a *Candida albicans* em 30% das lesões. Esse estudo avaliou a mucosite já instalada, com presença de úlceras, e somente registrou a prevalência da *Candida albicans*, sem analisar estatisticamente a associação entre a intensidade da mucosite e a presença desse microorganismo. No presente estudo, a frequência da *Candida spp* foi de 20,2%. Foi feita a opção de incluir a variável “contagem de UFC/mm³”, já que não foram encontrados estudos, na literatura consultada, que relacionassem os valores de UFC/mm³ relacionados ao aumento do grau da mucosite oral.

Durante a fase indutória do tratamento da LLA, são frequentes os episódios febris, que instalados nos pacientes neutropênicos, demandam a utilização dos antibióticos de amplo espectro, acarretando significativas mudanças na composição da microbiota oral e aumentando o risco de infecções por *Candida* e bactérias provenientes da cavidade oral (**MEUNIER et al., 1992; DONOWITZ et al., 2001; WANANUKUL et al., 2005**).

Na população do presente estudo, as bactérias identificadas com maior frequência, nos dias 14 e 56 da terapia, foram o *Streptococcus viridans* e *Neisseria spp*, em 100% e 95% dos casos, respectivamente. O *Streptococcus viridans* é o patógeno de

grande importância em pacientes submetidos à quimioterapia mais agressiva, como aquelas com altas doses de ARA-C e antracíclicos, como os pacientes com leucemias (**BRUCKNER & GIGLIOTTI, 2006**). O *Haemophilus* foi a bactéria Gram-negativo isolado, neste estudo, em 26% dos pacientes no D14 e 23% dos casos, no D56.

LUCAS et al., (1997), avaliando 20 crianças saudáveis, com média de idade de 8,4 anos, encontraram 95% de prevalência de *Streptococcus* do grupo *viridans*, sem o desenvolvimento de infecções associadas. A maioria das espécies de *Neisseria* isoladas em humanos são saprófitas em oro e nasofaringe de indivíduos saudáveis (**MURRAY et al., 2003**). **ROSS (1971)**, estudando 50 crianças saudáveis com idade entre 7 e 12 anos, que não estavam recebendo nenhum tipo de medicamento, identificou prevalência semelhante à encontrada no presente estudo, de *Neisseria spp* em 84% dos casos, *Streptococcus* do grupo *viridans* em 98% e *Staphylococcus aureus* em 2%. Em contraposição aos dados identificados por **ROSS (1971)**, que observaram a prevalência de *Corynebacteria* nas amostras de 78% dos pacientes avaliados, em nosso estudo não foi identificada a presença desta bactéria em amostra alguma.

RIBAS & VICENTE (2002) estudaram a microbiota oral de 16 crianças com leucemia (linfóide aguda e mielóide aguda) e identificaram a prevalência de 81,2% de bactérias do gênero *Staphylococcus*, 62,5% de *Neisseria spp*, 37,5% de *Streptococcus* e 18,5% de *Haemophilus*. Dos 16 pacientes do estudo, 87 % estavam em tratamento para LLA e 12,5% para leucemia mielóide aguda. Os protocolos utilizados no referido estudo foram o BFM-87, BFM-90, GBTLI LLA-93 e R11 St. Jude Hospital. Esses resultados não estão de acordo com as frequências observadas em nossa casuística. No entanto, como os protocolos de tratamento utilizados foram diferentes do protocolo GBTLI LLA-99, a comparação dos resultados apresenta limitações metodológicas.

É importante ressaltar que infecções bacterianas estão associadas com taxas consideráveis de morbidade e mortalidade em pacientes com câncer. Segundo **BRUCKNER & GIGLIOTTI (2006)**, em pacientes imunossuprimidos, o dano à mucosa oral parece ser a principal porta de entrada para o desenvolvimento de bacteremia por *Streptococcus* do grupo *viridans*. **BOCHUD et al., (1994)** identificaram a mucosite oral como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de bacteremia em pacientes com

câncer e neutropênicos. **BLIJLEVENS et al., (2000)** destacaram a ocorrência de migrações de bactérias provenientes da cavidade oral, propiciando a instalação de quadros clínicos de septicemia em pacientes neutropênicos.

Não temos conhecimento de estudos, na esfera pediátrica, que tenham estabelecido valores de corte para a população bacteriana total na cavidade oral e sua relação com a mucosite oral, dificultando a comparação quantitativa com os valores estabelecidos no presente estudo. No presente estudo, o valor de corte adotado foi de 510.000 UFC/mm³.

WAHLIN et al., (1998) estudaram a microbiota oral de 20 pacientes com leucemia, com idades variando entre 5 e 74 anos. Os autores coletaram amostras de saliva e não identificaram associação estatisticamente significativa entre a contagem de bactérias da cavidade oral e a presença de lesões de mucosite.

SIXOU et al., (1998) avaliaram a população anaeróbia da placa bacteriana supragengival de 16 crianças em tratamento de leucemia e linfoma. Foram realizadas coletas por *swab* e identificada associação estatisticamente significativa entre a proporção de Capnocytophaga e lesões de mucosite. No entanto, não foi identificada associação estatisticamente significativa entre a quantidade total de UFC de bactérias anaeróbias e a presença de mucosite oral.

Neste estudo não foi demonstrada relação direta entre a contagem de UFC bacterianas na cavidade oral e a intensidade de mucosite, nos D14 e D56 ($p=0,7251$ e $p=0,5028$, respectivamente). **NAPENAS et al., (2007 b)** realizaram revisão sistemática da literatura e concluíram que ainda não há consenso quanto à relação entre a microbiota oral (qualitativa ou quantitativamente) e o desenvolvimento de mucosite oral.

Alguns estudos pesquisaram o uso de antimicrobianos para diminuir a população bacteriana e a intensidade de mucosite oral (**DONNELLY et al., 2003a; VOKURKA et al., 2006; POTTING et al., 2006; WORTHINGTON et al., 2007**), baseando-se na hipótese de que, quanto menor a quantidade de bactérias, menor será o grau da mucosite. No entanto, nenhum desses estudos demonstrou, estatisticamente, a relação entre a quantidade de bactérias da cavidade oral e a intensidade de mucosite.

Uma hipótese para que a relação entre a contagem de UFC bacterianas na cavidade oral e a intensidade de mucosite não tenha sido estabelecida em nosso estudo é que, a partir da segunda semana de tratamento, os pacientes usaram profilaticamente a associação de sulfametoxal + trimetropima, o que pode ter interferido quantitativamente na microbiota bacteriana (**ELTING et al., 1992; RAZONABLE et al., 2002**). Outra possível explicação para a ausência desta associação é que os pacientes receberam tratamento odontológico desde sua admissão, “adequando” a cavidade oral e, possivelmente, diminuindo a população bacteriana. Considerando que as bactérias contribuem para a intensificação dos efeitos citotóxicos da quimioterapia, com a liberação de endotoxinas que ajudam a amplificar a resposta inflamatória inicial, o controle de sua população possibilitaria a redução dos eventos inflamatórios locais.

O cuidado odontológico é a prática rotineira para todos os pacientes do serviço, embasada em trabalhos que demonstram a importância da boa condição bucal para minimizar os efeitos secundários à quimioterapia em mucosa oral, quando se controlam as outras variáveis como grau de neutropenia ou tipo de quimioterápico, para os diferentes graus de mucosite (**BONNAURE-MALLET et al., 1998; CHENG et al., 2001; DJURIC et al., 2005; McGUIRE et al., 2006; RECOLONS et al., 2006; CRUZ et al., 2007; KEEFE et al., 2007b**).

Inúmeros fatores, que vão desde a atuação direta do quimioterápico sobre a célula, passando pela liberação ativação da cascata de eventos submucosos, até a ação dos microorganismos presentes na cavidade oral, são mencionados na fisiopatogenia da mucosite oral. É necessário entender-se melhor o papel da microbiota na patogenia da mucosite, juntamente com a clara definição dos fatores de risco para o desenvolvimento e intensidade da lesão. A melhor compreensão da ocorrência e do manuseio das mucosites, em muito contribuirá para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

9- CONCLUSÃO

- 1) No dia 14 da terapia de Indução, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os graus da mucosite e a presença do *HSV-1* ($p < 0,001$), a presença de *Candida spp* ($p = 0,0078$) e o total de UFC de *Candida spp/mm*³ ($p = 0,0012$);
- 2) Na avaliação do D14, as presenças do *HSV-1* (OR 65,00; IC 2,24 a 1887,47) e da *Candida spp* (OR 15,00; IC 1,03 a 218,31) estiveram relacionadas com maior estimativa de risco para o desenvolvimento da mucosite grau 3;
- 3) No dia 56 da terapia antineoplásica, foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os graus de mucosite e a presença do *HSV-1 no D56* ($p < 0,0001$), a presença do *HSV-1 no D14* ($p < 0,0001$) e o total de UFC de *Candida spp/mm*³ ($p = 0,0047$);
- 4) Na avaliação do D56, a presença do *HSV-1 no D14* (OR 54,00; IC 3,93 a 741,83) e a presença do *HSV-1 no D56* (OR 57,00; IC 2,41 a 1349,40) estiveram relacionadas com maior estimativa de risco para o desenvolvimento da mucosite grau 3.

10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Said, D., E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzowski, and S. Vartivarian. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. **Clin. Infect. Dis.**, 1997; 24:1122-1128.

Adderson EE. Histoplasmosis in a pediatric oncology center. **J Pediatr.**, 2004; 144(1): 100-6.

Akhtar N, Ni J, Stromberg D, Rosenthal GL, Bowles NE, Towbin JÁ. Tracheal aspirate as a substrate for polymerase chain reaction detection of viral genome in childhood pneumonia and myocarditis. **Circulation**, 1999; 99: 2011-2018.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J.** 2002; 78(922): 455-9). Aquerreta I, Aldaz A, Giraldez J, Sierrasesumaga L. Pharmacodynamics of high-dose methotrexate in pediatric patients. **Ann Pharmacother.**, 2002; 36(9): 1344-1350.

Arthur JL; Scarpini CG; Connor U et al. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. **J Virol.**, 2001; 75(8): 3885-3895.

Ayers KM, Colquhoun AN. Leukaemia in children. Part I: Orofacial complications and side-effects of treatment. **N Z Dent J.**, 2000; 96(424): 60-65.

Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. **Manual of clinical microbiology.** Washington. ASM Press; 1991. 1634 p.

Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. **Oral Oncol.**, 2003; 39(3): 91-100.

Barbosa Ferreira FH, Bambirra Silva FH, Santos FM, Nicoli JR. **Efeito antagonista de um Peptostreptococcus sp. da microbiota fecal humana frente a Clostridium difficile – avaliação “in vitro”, “ex vivo” e “in vivo” em camundongos gnotoxênicos.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra* [en línea] 2006, 6 (001): Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=50060101>> ISSN 1519-5228. Acesso em 03 de novembro de 2007.

Bergmann OJ, Mogensen SC, Ellegaard J. Herpes Simplex Virus and intraoral ulcers in immunocompromised patients with haematologic malignancies. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 1990; 9(3): 184-190.

Blijlevens NM, Donnelly JP, De Pauw BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. **Bone Marrow Transplant.**, 2000; 25(12):1269-1278.

Bitsko MJ, Stern M, Dillon R, Russell EC, Laver J. Happiness and time perspective as potential mediators of quality of life and depression in adolescent cancer. **Pediatr Blood Cancer.**, 2007; Sep 18 [Epub ahead of print].

Brandalise S, Viana M, Pereira V, Lee M, Lopes L, Vianna S, Bruniera P, Souza M, Carvalho E, Werneck F, Loggeto S, Sant' Anna R, Morais V, Colturato V, Tono L, Odone V, Brunetto A, Lustosa D, Tobos K, Guedes G, Dobbin, J, Masutti C, Albiero A, Matheus A, Souza D. Comparison of intermitent versus continuous methotrexate plus 6-MP in maintenance regimens of standard risk acute lymphoblastic leukemia in children (GBTLI ALL - 99). **Pediatric Blood & Cancer.**, 2004; 43(4): 377.

Barasch A, Peterson DE. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. **Oral Oncol.**; 2003; 39(3): 91-100.

Barros, LM. Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases [Tese – Doutorado]. Piracicaba (SP): Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2005.

Bonnaure-Mallet M, Bunetel L, Tricot-Doleux S, Guerin J, Bergeron C, LeGall E. Oral complications during treatment of malignant diseases in childhood: effects of tooth brushing. **Eur J Cancer.**, 1998; 34(10): 1588-1591.

Bochud PY, Eggiman P, Calandra T, Van-Melle G, Saghafi L, Francioli P. Bacteremia due to viridans streptococcus in neutropenic patients with cancer: clinical spectrum and risk factors. **Clin Infect Dis.**, 1994; 18(1): 25-31.

Brenner H, Coebergh J, Parkin D, Izarzugaza I, Clavel J, Arndt V, Steliarova-Foucher E. Up-to-date monitoring of childhood cancer long-term survival in Europe: leukaemias and lymphomas. **Ann Oncol.**, 2007; 18(9):1569-1577.

Bruckner L, Gigliotti F. Viridans group streptococcal infections among children with cancer and the importance of emerging antibiotic resistance. **Semin Pediatr Infect Dis.**, 2006; 17(3): 153-160.

Camitta B, Leventhal B, Lauer S et al. Intermediate-dose intravenous methotrexate and mercaptopurine therapy for non-T, non-B acute lymphocytic leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. **J Clin Oncol.**, 1989; 7(10): 1539-1544.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral Candida: clearance, colonization, or candidiasis? **J. Dent. Res.**, 1995; 74(5): 1152-1161.

Carrega G, Castagnola E, Canessa A, Argenta P, Haupt R, Dini G, Garaventa A. Herpes simplex virus and oral mucositis in children with cancer. **Support Care Cancer.**; 1994; 2(4): 266-269.

Challacombe, S.J. Immunologic aspects of oral candidiasis **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1994; 78(2):202-10.

Cheng KK, Molassiotis A, Chang AM, Wai WC, Cheung SS. Evaluation of an oral care protocol of intervention in the prevention chemotherapy-induced oral mucositis in paediatric cancer patients. **Eur J Cancer.**, 2001; 37(16): 2056-2063.

Chiappelli F. The molecular immunology of mucositis: implications for evidence-based research in alternative and complementary palliative treatments. **Evid Based Complement Alternat Med.**, 2005; 2(4): 489-494.

Clarkson JE, Worthington HV, Eden OB. Interventions for treating oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; (3):CD000978. Review. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2006;(2):CD000978.

Cohen J, Donnelly JP, Worsley AM, Catovsky D, Goldman JM, Galton DA. Septicaemia caused by viridans streptococci in neutropenic patients with leukaemia. **Lancet.**, 1983; Dec 24-31; 2(8365-66):1452-4.

Cruz LB, Ribeiro AS, Rech A, Rosa LGN. Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. **Pediatr Blood Cancer.**, 2007; 48(4): 435-440.

Davis, PW, Solomon E, Berg LR. **The World of Biology.** Saunders College Publishing; 1990. 928p.

Dazzi C, Cariello A, Giovanis P, Monti M, Vertogen B, Leoni M, Tienghi A, Turci D, Rosti G, Nanni O, Rondoni C, Marangolo M. Prophylaxis with GM-CSF mouthwashes does not reduce frequency and duration of severe oral mucositis in patients with solid tumors undergoing high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation rescue: a double blind, randomized, placebo-controlled study. **Ann Oncol.**, 2003; 14(4): 559-563.

Dixon DM, McNeil MM, Cohen ML, Gellin BG, La Montagne JR. Fungal infections: a growing threat. **Public Health Rep.**, 1996; 111(3): 226–235.

Dodd MJ, Miaskowski C, Dibble SL, Paul SM, Macphail L, Greens Shiba G. Factors influencing oral mucositis in patients receiving chemotherapy. **Cancer Pract.**, 2000; 8(6): 291-297.

Donnelly JP, Bellm LA, Epstein JB, Sonis ST, Symonds RP. Antimicrobial therapy to prevent or treat oral mucositis. **Lancet Infect Dis.**, 2003 a; 3(7): 405-412.

Donnelly JP, Blijlevens NMA, Verhagen CAH. Can anything be done about oral mucositis? **Ann Oncol.**, 2003 b; 14(4): 505-507.

Donowitz GR, Maki DG, Crnich CJ, Pappas PG, Rolston KV. Infections in the neutropenic patient. New views and old problem. **Hematology**, 2001; 113-139.

Dreizen S, Keating MJ, Beran M Orofacial fungal infections. Nine pathogens that may invade during chemotherapy. **Postgrad Med.**, 1992; 91(5): 349-350, 353-354, 357-360 passim.

Duncam M, Grant G. Review article: Oral and intestinal mucositis – causes and possible treatments. **Aliment Pharmacol Ther.**, 2003; 18(9): 853-874.

Djuric M, Hillier-Kolarov V, Belic A, Jankovic L. Mucositis prevention by improved dental care in acute leukemia patients. **Support Care Cancer.**, 2006; 14(2): 137-146.

Earle EA, Eiser C. Children's behaviour following diagnosis of acute lymphoblastic leukaemia: a qualitative longitudinal study. **Clin Child Psychol Psychiatry.**, 2007; 12(2): 281-293.

Eilers J, Million R. Prevention and management of oral mucositis in patients with cancer. **Semin Oncol Nurs.**, 2007; 23(3): 201-212.

Elting LS, Bodey GP, Keefe BH. Septicemia and shock syndrome due to viridans streptococci: a case-control study of predisposing factors. **Clin Infect Dis.**, 1992; 14(6): 1201-07.

Elting LS, Bodey GP, Keefe BH. In: Rolston KVI, Rubenstein EB. **Textbook of febrile neutropenia.** London. Martin Dunitz; 2001. 155p.

Elting LS, Cooksley C, Chambers M, Cantor SB et al. The burdens of cancer therapy. Clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. **Cancer.**, 2003; 98(7): 1531-1539.

Epstein JB, Sherlock C, Page JL et al. Clinical study of herpes simplex virus infection in leukemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1990; 70(1): 38-43.

Epstein JB, Hancock PJ, Nantel S. Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: an outcome-based analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, 2003; 96(2): 154-163.

Fadda G, Campus G, Lugliè P. Risk factors for oral mucositis in paediatric patients receiving alkylant chemotherapy. *BMC Oral Health*, 2006; 6: 13.

Ferreira W, J Sousa. **Microbiologia – volume III**. Lisboa. Lidel – edições técnicas. 2002. 466p.

Gabriel DA, Shea T, Olajida O, Serody JS, Comeau T. The effect of oral mucositis on morbidity and mortality in bone marrow transplant. *Semin Oncol.*, 2003; 30 (6 Suppl 18): 76-83.

Galvão V, Cruz de Castro CHB, Consolaro A. Mucosite severa em paciente com leucemia: uma abordagem terapêutica. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.*, 2006; 6(2): 35-40.

Gandemer V, Deley MC, Dollfus C et al. Multicenter Randomized Trial of Chewing Gum For Preventing Oral Mucositis in Children Receiving Chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.*, 2007; 29(2): 86-94.

Graham KM, Pecoraro DA, Ventura M, et al. Reducing the incidence of stomatitis using a quality assessment and improvement approach. *Cancer Nurs.*, 1993; 16: 117-122.

Greenberg MS, Cohen SG, Boosz B, Friedman H. Oral herpes simplex infections in patients with leukemia. *J Am Dent Assoc.*, 1987; 114(4): 483-486.

Hay KA; Edris WA; Gaydos A et al. Herpes simplex virus latency after direct ganglion virus inoculation. *J Neurovirol.*, 1998; 4(5): 531-538.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.*, 2001; 9(12), 591-596.

Höfling JF, Rosa EAR. Main techniques employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. *Alpe Adria Microbiol J.*, 1999; 8(1): 5-23.

Huang WT, Chang LY, Hsueh PR, Lu CY, Shao PL, Huang FY, Lee PI, Chen CM, Lee CY, Huang LM. Clinical features and complications of viridans streptococci bloodstream infection in pediatric hemato-oncology patients. *J Microbiol Immunol Infect.*, 2007; 40(4): 349-354.

Ibrahim AI, Kouwatli KM, Obeid MT. Frequency of herpes simplex virus in Syria based on type-specific serological assay. **Saudi Med J.**, 2000; 21(4): 355–360.

International Union of Microbiological Societies, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>. Acesso em 20 de novembro de 2007.

Isacsohn M, Smetana Z, Ronen ZZ, Raveh D, Diamant Y, Samueloff A, Shaya M, Mendelson E, Slater P, Rudenski B, On EB, Morag A. A sero-epidemiological study of herpes virus type 1 and 2 infection in Israel. **J Clin Virol.**, 2002; 24(1-2): 85-92.

Jawetz E, J Melnick, E. Adelberg. **Manual de Microbiologia Médica.** México. El Manual Moderno. 2005. 786p.

Jorge AOC, Ito-Koga CY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, 1997; 11(4): 279-284.

Kanda Y, Yamamoto R, Chizuka A, Hamaki T, Suguro M, Arai C, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Kern W, Kami M, Akiyama H, Hirai H, Togawa H. Prophylactic action of oral fluconazole against fungal infection in neutropenic patients. **Cancer**; 2000; 89(7): 1611-1625.

Keefe DM. Intestinal mucositis: mechanisms and management. **Curr Opin Oncol.**, 2007 **a**; 19(4): 323-7.

Keefe DM, Schubert MM , Elting LS , Sonis ST, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, Migliorati CA, McGuire DB, Hutchins RD , Peterson DE ; Mucositis Study Section of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer and the International Society for Oral Oncology. Updated clinical practice guidelines for the prevention and treatment of mucositis. **Cancer.**, 2007 **b**; 109(5): 820-831.

Khan SA, Wingard JR. Infection and mucosal injury in cancer treatment. **J Natl Cancer Inst Monogr.**, 2001; (29): 31-6.

Kostler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. **CA Cancer J Clin.**, 2001; 51(5): 290-315.

Lacasse M, Fortier C, Trudel L et al. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. **J Oral Pathol Med.**, 1990; 19(3): 136-41.27.

Lamey PJ, Lewis MA. Oral medicine in practice: viral infection. **Br Dent J.**, 1989; 167(8): 269-274.

Lockhart PB, Sonis ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapy agents. A histologic study. **J Dermatol Surg.**, 1981; 7(12): 1019-1025.

Lloid ME, Schubert MM, Myerson D, Bowden R, Meyers JD, Hackman RC. Cytomegalovirus infection of the tongue following marrow transplantation. **Bone Marrow Transplant.**, 1994; 14(1): 99-104.

Lörh JM, Nelson JA, Oldstone MBA. Is Herpes Simplex Virus associated with peptic ulcer disease? **J Virol.**, 1990; 64(5): 2168-2174.

Loutfy SA, Alam El-Din HM, Ibrahim MF, Hafez MM. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus in children with acute lymphoblastic leukemia in Egypt. **Saudi Med J.**, 2006; 27(8): 1139 –1145.

Lucas VS, Beighton D, Roberts GJ, Challacombe SJ. Changes in the oral streptococcal flora of children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. **J Infect.**; 1997; 35(2): 135-141.

Luglie PF, Mura G, Mura A, Angius A, Soru G, Farris A. Prevention of periodontopathy and oral mucositis during antineoplastic chemotherapy. Clinical study. **Minerva Stomatol.**; 2002; 51(6): 231-239.

Machado FA. Mucosite oral [Monografia]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas; 1993.

Madigan M, J Martinko, J Parker. **Brock – Biology of Microorganisms**. New Jersey. Prentice Hall. 2000. 991p.

Malic S, Hill KE, Ralphs JR et al. Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. **Oral Microbiol Immunol.**, 2007; 22(3):188-94.

Marsh P, Martin M. **Oral Microbiology**. London. Chapman e Hall. 1992. 249p.

McCullough MJ, Savage NW. Oral viral infections and the therapeutic use of antiviral agents in dentistry. **Aust Dent J.**, 2005; 50(4 Suppl 2): S31-35.

McGuire DB, Correa MEP, Johnson J, Wienandts P. The role of basic oral care and good clinical practice principles in the management of oral mucositis. **Support Care Cancer.**, 2006; 14(6): 541–547.

Meunier F, Aoun M, Bitar N. Candidemia in immunocompromised patients. **Clin Infect Dis.**, 1992; 14(Suppl 1): S49-53.

Microbiology and Immunology on line. University of South Carolina. Disponível em <http://pathmicro.med.sc.edu/virol/herpes.htm>. Acesso em 20 de novembro de 2007.

Montgomery MT, Reeding WR, LeMaistre CF. The incidence of oral herpes simplex virus infection in patients undergoing cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1986; 61(3): 238-242.

Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. **Manual of clinical microbiology**. Washington. ASM Press. 2003. 2113p.

Myoken Y, Sugata T, Kyo T, Fujihara M, Mikami Y. Antifungal susceptibility of *Aspergillus* species isolated from invasive oral infection in neutropenic patients with hematologic malignancies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, 1999; 87(2): 174-179.

Myoken Y, Sugata T, Kyo T, Fujihara M, Mikami Y. Itraconazole prophylaxis for invasive gingival aspergillosis in neutropenic patients with acute leukemia. **J Periodontol.**, 2002; 73(1): 33-38.

Naidu MU, Ramana GV, Rani PU, Mohan IK, Suman A, Roy P. Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis--complicating the treatment of cancer. **Neoplasia.**, 2004; 6(5): 423-431.

Napenas JJ, Shetty KV, Streckfus CF. Oral mucositis: review of pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. **Gen Dent.**, 2007 **a**; 55(4): 335-344; quiz 345-6, 376.

Napenas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK et al. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, 2007 **b**; 103(1): 48-59.

National Cancer Institute. **a. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment Health. Cellular classification and prognostic variables.** Disponível em http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/childALL/healthprofessional/allpages/print#Section_1. Acesso em 07 de novembro de 2007.

National Cancer Institute. **b. Cancer Therapy Evaluation Program. Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.** Disponível em: <http://ctep.cancer.gov> Publish Date: August 9, 2006. Acesso em 25 de outubro de 2007.

National Cancer Institute. **c. SEER Surveillance Epidemiology and End Results Cancer Stat Fact Sheets.** Disponível em: http://seer.cancer.gov/statfacts/html/aly1_print.html. Acesso em 03 de novembro de 2007.

Nicola P, Romani C, Cupelli L et al. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. **Haematologica**, 2007; 92(2): 222-231.

Nisengard RJ, Newman MG. **Oral microbiology and immunology.** Saunders Company. Philadelphia. 1994. 477p.

Nolte WA. The oral microflora. In Nolte, WA (editor). **Oral microbiology with basic microbiology and immunology**. Saint Louis. The CV Mosby Company; 1977. p197-233.

Nucci M, Marr KA. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis.**, 2005; 41(4): 521-526.

Odds FC. Factors that predispose the host to candidiasis. In: *Candida and candidosis*. London. Baillié Tindall; 1988. p93-114.

Okamoto Y, Ribeiro RC, Srivastava DK, Shenep JL, Pui CH, Razzouk BI. Viridans streptococcal sepsis: clinical features and complications in childhood acute myeloid leukemia. **J Pediatr Hematol Oncol.**, 2003; 25(9): 696-703.

Pereira MBC. **Detecção do herpes vírus humano 1 e 2 e do citomegalovírus nos gânglios trigeminais de cadáveres, através da técnica imunoenzimática, utilizando anticorpos monoclonais** [Dissertação - Mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2002.

Pizzo PA, Poplack P, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 5th ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

Pizzo PA. Granulocytopenia and cancer therapy: past problems, current solutions, future challenges. **Cancer.**, 1984; 54(Suppl 11): 2649-61.

Pizzo PA. Management of fever in patients with cancer and treatment-induced neutropenia. **N Engl J Med.**, 1993; 328(18): 1323-32.

Potting CM, Uitterhoeve R, Op Reimer WS, Van Achterberg T. The effectiveness of commonly used mouthwashes for the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis: a systematic review. **Eur J Cancer Care**, 2006; 15(5): 431-439.

Pui CH, Schrappe M, Ribeiro RC, Niemeyer CM. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2004; 118-45.

Ramphal R, Grant RM, Dzolganovski B, Constantin J, Tellier R, Allen U, Weitzman S, Matiow A, Petric M, Sung L. Herpes simplex virus in the febrile neutropenic children undergoing chemotherapy for cancer: a prospective cohort study. **Pediatr Infect Dis.**, 2007; 26(8): 700-704.

Rand KH, Kramer B, Johnson AC. Cancer chemotherapy associated symptomatic stomatitis: role of Herpes simplex virus (HSV). **Cancer.**, 1982; 50(7): 1262-1265.

Razonable RR, Litzow MR, Khaliq Y et al. Bacteremia due to viridans group Streptococci with diminished susceptibility to Levofloxacin among neutropenic patients receiving levofloxacin prophylaxis. **Clin Infect Dis.**, 2002; 34: 1469-1474.

Recolons MMS, López JL, Campillo MERR, Küstner EC, Vidal JMC. Buccodental health and oral mucositis. Clinical study in patients with hematological diseases. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 2006; 11(6): E497-502.

Redding SW, Montgomery MT. Acyclovir prophylaxis for oral herpes simplex virus infection in patients with bone marrow transplants. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1989; 67(6): 680-683.

Reilly AF, Lange BJ. Infections with viridans group streptococci in children with cancer. **Pediatr Blood Cancer.**, 2007; 49(6): 774-780.

Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. **Oral Dis.**, 2000; 6(2): 85-91.

Ribas, Marina de Oliveira. Estudo quantitativo e qualitativo da microbiota da boca dos pacientes com leucemia na infância. **Revis Odonto Ciência**, 2002; 17(36): 146-157.

Rojas de Morales T, Zambrano O, Rivera L, Navas R, Chaparro N, Bernardoni C, Rivera F, Fonseca N, Tirado DM. Oral-disease prevention in children with cancer: testing preventive protocol effectiveness. **Med Oral.**, 2001;6(5): 326-234.

Rozkiewicz D, Daniluk T, Sciepek M, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Luczaj-Cepowicz E, Milewska R, Marczuk-Kolada G, Stokowska W. Prevalence rate and antibiotic susceptibility of oral viridans group streptococci (VGS) in healthy children population. **Adv Med Sci.**, 2006; 51(Suppl 1): 191-195.

Ross PW. Quantitative studies on the salivary flora. **J Clin Pathol.**, 1971; 24(8):717-720.

Ruescher TJ, Sodefi A, Scrivani SJ, Kaban LB, Sonis ST. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. **Cancer**; 1998; 82(11): 2275-2281.

Ruiz-Arguelles GJ, Coconi-Linares LN, Garces-Eisele J, Reyes-Nunez V. Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. **Hematology.**, 2007;12(5): 387-391.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**; 1985; 230(4732): 1350-1354.

Samonis G, Mantadakis E, Maraki S. Orofacial viral infections in the immunocompromised host. **Oncol Rep.**, 2000; 7(6): 1389-1394.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT software changes and enhancements through release 8.2**. Cary, NC: SAS Institute, Inc. 1999-2001.

Sepúlveda E, Meier UB, Moraga MJ et al. Herpes simplex virus detection in oral mucosa lesions in patients undergoing oncologic therapy. **Med Oral.**, 2003; 8(5): 329- 33.

Sepúlveda E, Brethauer U, Rojas J et al. Oral ulcers in children under chemotherapy: clinical characteristics and their relation with Herpes Simplex Virus type 1 and Candida Albicans. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, 2005; 1(10Suppl1): E1-E8.

Seto BG, Kim M, Wolinsky L, Mito RS, Champlin R. Oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplantation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1985; 60(5): 493-497.

Smith MA, Ries LA, Gurney JG, et al.: Leukemia. In: Ries LA, Smith MA, Gurney JG, et al., eds. **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995**. Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, 1999. NIH Pub.No. 99-4649, p 17-34.

Smith JS, Robinson NJ. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. **J Infect Dis.**, 2002; 186(Suppl 1): S3-28.

Siqueira JF, Bilge HS. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 2004; 97(5): 632-641.

Stiff P. Mucositis associated with cell transplantation: current status and innovative approaches to management. **Bone Marrow Transplant.**, 2001; 27(Suppl 2): S3-S11.

Sixou JL, de Medeiros-Batista O, Gandemer V, Bonnaure-Mallet M. The effect of chemotherapy on the supragingival plaque of pediatric cancer patients. **Oral Oncol.**, 1998; 34(6): 476-483.

Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. **Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças GBTLI LLA-99.** São Paulo, 2000.

Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M. Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1992; 74(6): 749-755.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB; Mucositis Study Section of the Multinational Association for Supportive Care in Cancer; International Society for Oral Oncology. Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. **Cancer**, 2004; 100(9 Suppl): 1995-2025.

Sonis S, Clark J. Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. **Oncology**, 1991; 5(12):11-18.

Squier CA. Mucosal alterations. **NCI Monogr**, 1990; 9: 169-172.

Stuart-Harris C. The epidemiology and clinical presentation of herpes virus infections. **J Antimicrob Chemother.**, 1983; 12(Suppl B): 1-8.

Svanborg G, Godaly G, Hedlund M. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. **Curr Opin Microbiol.**, 1999; 2(1): 99-105.

Vokurka S, Bystricka E, Koza V, Scudlova J, Pavlicova V, Valentova D, Visokaiova M, Misaniova L. Higher incidence of chemotherapy induced oral mucositis in females: a supplement of multivariate analysis to a randomized multicentre study. **Support Care Cancer**, 2006; 14(9): 974-976.

Uzeda M. **Microbiologia oral**. São Paulo. Editora Médica e Científica Ltda. 2002. 104p.

Vyse AJ, Gay NJ, Slomka MJ, et al. The burden of infection with HSV-1 and HSV-2 in England and Wales: implications for the changing epidemiology of genital herpes. **Sex Transm Infect.**, 2000; 76(3): 183-7.

Wananukul S, Nuchprayoon I, Siripanich H. Mucocutaneous findings in febrile neutropenic children with acute leukemias. **J Med Assoc Thai.**, 2005; 88(6): 817-823.

Wagner E, M Hewlett. Basic Virology. Blackwell Science, Inc.; USA, 1999.

Wahlin YB, Holm AK, Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, 1988; 65(4): 411-417.

Webster CE, Odds FC. Growth of pathogenic Candida isolates anaerobically and under elevated concentrations of CO₂ in air. **J. Med. Vet. Mycol.**, 1987; 25(1): 47-53.

Weitgasser U, Haller EV, El-Shabrawi Y. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of adenoviruses in conjunctival swab specimens using degenerate primers in comparison with direct immunofluorescence. **Ophthalmologica**, 2002; 216(5): 329-332.

Williams MC, Lee GT. Childhood leukemia and dental considerations. **J. Clin. Pediatr Dent.**, 1991; 15(3): 160-164.

Wilkes JD. Prevention and treatment of oral mucositis following cancer chemotherapy. **Semin Oncol.**, 1998; 25(5): 538-551.

Worthington HV, Clarkson JE, Eden OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. **Cochrane Database Syst Rev.** 2007 Oct 17;(4):CD000978.

Yarom N, Buchner A, Dayan D. Herpes simplex virus infection: part I - Biology, clinical presentation and latency. **Refuat Hapeh Vehashinayim.**, 2005; 22(1): 7-15, 84.

Xu F, Lee FK, Morrow RA, Sternberg MR, Luther KE, Dubin G, Markowitz LE. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 in children in the United States. **J Pediatr.**, 2007; 151(4): 374-377.

Xu W, McDonough MC, Erdman DD. Species-specific identification of human adenoviruses by a multiplex PCR assay. **J Clin Microbiology**, 2000; 38(11): 4114-4120.

11- ANEXOS

AGENTES PATOGÊNICOS PREDOMINANTES EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM DOENÇAS ONCOLÓGICAS

Bactérias gram-positivas
<i>Staphylococcus</i>
<i>Streptococcus</i>
<i>Entereococci</i>
<i>Corynebacteria</i>
<i>Listeria sp.</i>
<i>Clostridium difficile</i>
Bactérias gram-negativas
Enterobacterias (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i>)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (e similares organismos gram-negativos multiresistentes oxidase-positivos)
Anaeróbios
Fungos
<i>Candida spp</i>
<i>Aspergillus spp</i>
Zigomicetos
Cryptococos
Outros
<i>Pneumocystis carinii</i>
<i>Toxoplasma gondi</i>
<i>Strongyloides stercoralis</i>
<i>Cryptosporidium</i>
Virus
Herpes simples virus
Varicella-zoster
Cytomegalovírus
Epstein-Barr virus
Vírus respiratório sincicial
Adenovírus
Influenza e parainfluenza vírus

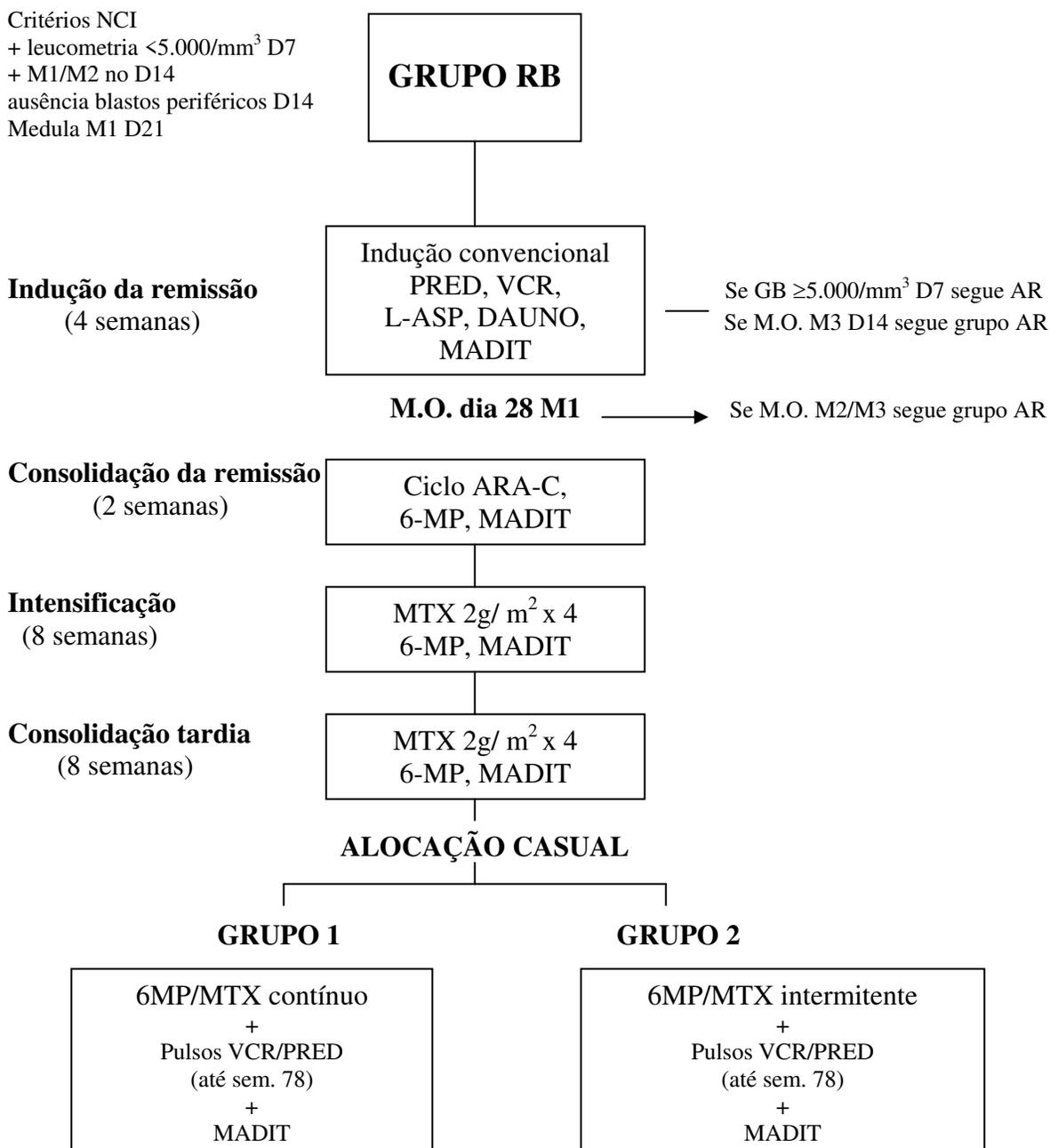
Fonte: Alexander et al., 2002. In: Principles and practice of pediatric oncology. 4º ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p.1239-83.

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROTOCOLO GBTLI LLA-99

(Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças GBTLI LLA-99)

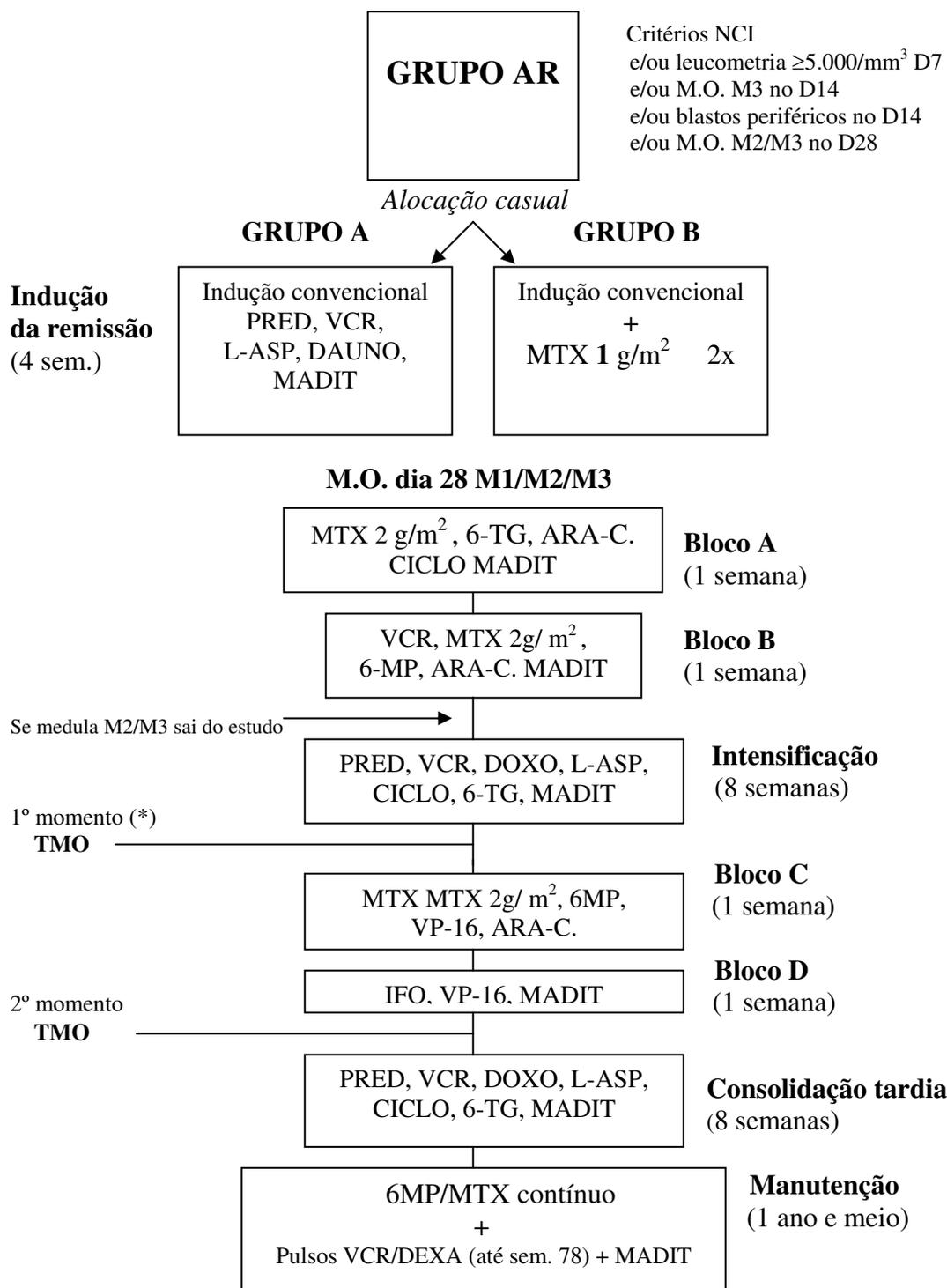
Planejamento da terapia

Esquema Grupo Baixo Risco



Planejamento da terapia

Esquema Grupo Alto Risco



*TMO alogênico indicado no grupo dos respondedores lentos (presença de blastos periféricos e/ou medula M3 D14) que apresentam ao diagnóstico alterações citogenéticas desfavoráveis (p. ex. Ph^+ , $t(4;11)$). Serão incluídos também os pacientes com falha indutória.



CENTRO INFANTIL DE INVESTIGAÇÕES HEMATOLÓGICAS
• DR. DOMINGOS A. BOLDRINI

Rua Dr. Gabriel Porto, 1.270 – Fone: (19) 3787-5000 – Fax: (19) 3289-3571
Barão Geraldo – Campinas - SP – CEP: 13083

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal

1. Nome do Paciente: _____

Documento de Identidade nº: _____ Sexo: M F
Data nascimento: ____/____/____
Endereço: _____ nº _____ Apto.: _____
Bairro: _____ Cidade _____ Estado _____
CEP: _____ - _____ Telefone: (____) _____

2. Responsável Legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.) _____
Documentos de Identidade nº _____ Sexo: M F
Data nascimento: ____/____/____
Endereço: _____ nº _____ Apto.: _____
Bairro: _____ Cidade _____ Estado _____
CEP: _____ - _____ Telefone: (____) _____

II. Dados sobre a Pesquisa Científica

1. Título do Projeto de Pesquisa: _____

Pesquisador: _____

Cargo/Função: _____ Inscrição Conselho Regional nº _____

Unidade do Centro Infantil Boldrini: _____

2. Avaliação do Risco da Pesquisa

Sem risco Risco mínimo Risco médio
 Risco baixo Risco maior

Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Associação entre a presença de microorganismos da microbiota oral e a intensidade da mucosite oral, em pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda, submetidos ao tratamento antineoplásico

Regina Maria Holanda de Mendonça – pesquisadora

Prof^ª. Dr^ª. Silvia Regina Brandalise – orientadora

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Por este instrumento, eu _____, declaro ter sido devidamente esclarecido pela cirurgiã dentista Regina Maria Holanda de Mendonça (fone: 019.3787-5077), que os objetivos desta pesquisa são verificar se existe relação entre o vírus Herpes Simples - 1, fungos e bactérias da boca, e a ocorrência e intensidade das mucosites orais. Afirmo ter conhecimento de que serão removidas células da mucosa oral (“bochecha”) através de uma raspagem que não causará dor ou sangramento, e também não trará riscos para meu filho (a). Fui ainda informado (a) de que as mucosites são as alterações orais mais frequentes durante o tratamento quimioterápico e que podem relacionar-se com quadros de infecção, e que a descoberta de alguns fatores específicos que causem ou agravem a mucosite pode permitir seu melhor tratamento. Estou ciente de que essas descobertas poderão ser utilizadas no futuro e que talvez meu filho (a) não se beneficie delas, mas outras crianças poderão ter mucosites menos graves. Fui comunicada ainda de que tenho a liberdade para escolher não autorizar a inclusão de meu filho (a) neste estudo sem que haja qualquer prejuízo para seu tratamento. Declaro que a decisão de participar desta pesquisa foi a mim facultada, e que, minha participação reflete o meu interesse em contribuir. Declaro ainda que tenho conhecimento de que os resultados desse trabalho serão utilizados na Tese de Doutorado da pesquisadora, podendo ser divulgados e tornados públicos através de publicações científicas, preservando-se a identidade de todos os participantes. Após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

Campinas, _____ de _____ de 2004.

Assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

FORMULÁRIO PARA A COLETA DE DADOS

“ASSOCIAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE MICROORGANISMOS DA
MICROBIOTA ORAL E A INTENSIDADE DA MUCOSITE ORAL,
EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA,
SUBMETIDOS AO TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO”

Pesquisador: Regina Maria Holanda de Mendonça

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Brandalise

Nome (iniciais): _____

Paciente n^o: _____ Idade: _____ Sexo: _____

14º dia → data: ____/____/____

PCR → HSV1: () Presente () Ausente

Mucosite oral (segundo NCI, 2003): () Sim () Não

Classificação da mucosite:

() G0 () GI () GII () GIII () GIV () GV () Não aplicável

Total de bactérias: _____

Fungos: _____

Total de fungos: _____

56º dia → data: ____/____/____

PCR → HSV1: () Presente () Ausente

Mucosite oral (segundo NCI, 2003): () Sim () Não

Classificação da mucosite:

() G0 () GI () GII () GIII () GIV () GV () Não aplicável

Total de bactérias: _____

Fungos: _____

Total de fungos: _____

PROVA DO TUBO GERMINATIVO

A prova do tubo germinativo é um teste que caracteriza rápida e presuntivamente a levedura da espécie *Candida albicans*. A técnica é muito simples e baseia-se, fundamentalmente, na semeadura de um pequeno inóculo dessa levedura em soro, que pode ser de várias espécies animais. Os soros recomendados são o humano, o fetal bovino ou de cavalo, podendo-se, ainda, utilizar albumina de ovo.

Técnica

- a- Com a ponta de uma pipeta Pasteur estéril, ou ainda, com uma alça de platina calibrada (0,001mL), retirar uma pequena porção de uma colônia de levedura e emulsioná-la de forma asséptica em 0,5 ml de soro. Evitar, se possível, o uso de soro humano, que pode ter anticorpos ou ainda antifúngicos;
- b- Incubar a 37oC por um período de 1,5-2 horas, em banho-maria, ou até 3 horas em estufa bacteriológica;
- c- Findo este período, deve-se remover uma gota da suspensão e montar uma preparação do tipo lâmina-lamínula, para observação microscópica. O tubo germinativo, quando o teste for positivo, aparecerá como filamento fino e cilíndrico, originado do blastoconídio da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constricção, quer na base ou ao longo de sua extensão.

MICROCULTIVO DE LEVEDURAS (PROVA DO CLAMIDÓSPORO)

Esta técnica baseia-se no princípio de que leveduras, quando incubadas num meio com Tween-80 apresentam a capacidade de filamentar, formando pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. Assim, pelas características morfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie de levedura implicada na identificação.

Técnica

Preparar Ágar Fubá e colocar 3 ml de meio, ainda líquido, sobre a lâmina do microcultivo, com pipeta estéril. Esperar solidificar. Com alça de platina, pegar um pouco da colônia de levedura crescida no Ágar e semear em estria no Ágar Fubá. Cobrir com lamínula estéril. Deixar 2 a 3 dias à 25oC e observar a preparação, da forma como está, em microscópio com aumento de 400x.

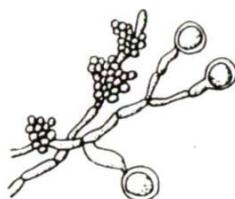
Material

Ágar Fubá:

- Farinha de milho amarela 6,25g
- Água 150 ml
- Ágar 1,9 g
- Tween 80 1,5 ml

Aquecer em banho-maria 60oC por 1 hora a farinha de milho e a água. Filtrar. Completar o volume, com água, para 150 mL. Acrescentar o ágar e o Tween e deixar em banho-maria fervendo até dissolver. Colocar em frascos com aproximadamente 3-5 mL. Autoclavar 121°C por 15 minutos.

Filamentação de *Candida albicans* em ágar fubá com TWEEN-80



AUXONOGRAMA

Assimilação de Carboidratos

Esta técnica baseia-se na capacidade que as leveduras apresentam de utilizar determinado carboidrato como única fonte de carbono, para sua viabilidade celular. Desta forma utiliza-se, nesta técnica, um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono (sem o qual a célula fúngica não pode crescer), onde será semeada a levedura que se deseja identificar. Após a semeadura, adiciona-se ao cultivo um carboidrato e observa-se a capacidade de utilização deste como fonte de carbono. Quando o carboidrato é assimilado pela levedura, observa-se crescimento desta ao redor da fonte de carbono.

Técnica

- Preparar o meio Yeast Nitrogen Base de acordo com as normas preconizadas pelo fabricante;
- Simultaneamente, preparar uma suspensão de leveduras com turvação equivalente ao tubo número 5 da escala de MacFarland;
- Toma-se uma alíquota de 1 ml da suspensão de leveduras e adiciona-se a 20 ml de meio basal fundido e resfriado. Transfere-se esta suspensão para uma placa de Petri homogeneizando suavemente;
- Aguarda-se a solidificação do meio e adiciona-se pequenas quantidades de açúcares em posições previamente demarcadas;
- Incubar as placas a 30°C por 24-48 horas;
- Observar regiões opacas ao redor dos açúcares adicionados.

Assimilação de Nitrogênio

A assimilação de nitrogênio demonstra a capacidade que algumas leveduras apresentam de assimilar nitrato de potássio (nitrogênio inorgânico), como única fonte de nitrogênio utilizado na sua viabilidade biológica.

Técnica

- Prepara-se o meio Yeast Carbon Base, de acordo com as indicações do fabricante;
- Após a preparação e autoclavação, o meio deve ser estocado em geladeira, até o momento do uso;
- No momento do uso, fundem-se 20 ml do meio, e após resfriar a uma temperatura de 45-50 oC acrescenta-se a este 1 ml da suspensão de levedura previamente preparada (com uma turvação correspondente ao tubo 5 da escala de MacFarland);
- Após movimentos delicados de agitação para homogeneizar o inóculo, despeja-se o meio numa placa de Petri;
- Após solidificação do meio, distribuir pequenas quantidades de compostos nitrogenados (nitrato de potássio e peptona);
- A peptona é aqui empregada como controle da viabilidade do inóculo, visto que todas as leveduras a utilizam como fonte nitrogenada.

