



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**QUANTIFICAÇÃO DO HSV-1 NA MUCOSA BUCAL DE  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

RENATA GUALBERTO DA CUNHA

Manaus – AM  
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**QUANTIFICAÇÃO DO HSV-1 NA MUCOSA BUCAL DE  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

RENATA GUALBERTO DA CUNHA

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

ORIENTADORA: Prof. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura  
CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Juliana Vianna Pereira

Manaus – AM  
2016

### Ficha Catalográfica

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

C972q Cunha, Renata Gualberto da  
Quantificação do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes  
pediátricos com leucemia linfoblástica aguda / Renata Gualberto da  
Cunha. 2016  
118 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Leucemia Linfoblástica Aguda. 2. Mucosite Bucal. 3. hsv-1. 4.  
Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real. I. Libório-  
Kimura, Tatiana Nayara II. Universidade Federal do Amazonas III.  
Título

RENATA GUALBERTO DA CUNHA

**QUANTIFICAÇÃO DO HSV-1 NA MUCOSA BUCAL DE  
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA  
LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, 26 de Fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dr. Nelson Abraham Fraiji, Membro  
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, Membro  
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Elza e Reinaldo

Por serem meu porto seguro, por me amarem incondicionalmente, pelo exemplo de honestidade e força e por terem me permitido sonhar. Eu amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus é pouco diante de tudo que Ele me proporciona. Agradeço especialmente por Ele ter colocado as pessoas certas no meu caminho, pessoas que me ajudaram a concretizar esse sonho.

À minha família que sempre me apoiou incondicionalmente, meus irmãos Everton e Edmilson, minhas cunhadas Jamile e Patrícia, meus sobrinhos, Wesley, Letícia, Ana Paula e Anne, minhas tias e tios, meus primos.

Aos meus avós Lourdes (*in Memoriam*), Ricardino (*in Memoriam*) e Ana, pelo amor e carinho e pelas orações que sempre fizeram por mim.

Ao Lucas, meu namorado, pelo apoio, compreensão e por compartilhar todo seu amor e felicidade comigo.

À minha querida orientadora Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura, por todo ensinamento, postura profissional, empenho, dedicação, compromisso com a pesquisa e confiança que depositou em mim. Você é minha inspiração.

À minha co-orientadora Dra. Juliana Vianna Pereira, por estar sempre disposta a ajudar, pelo apoio e incentivo. Sua contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. José Pereira de Moura Neto, pela orientação, disponibilidade, empenho, dedicação, compromisso, apoio e amizade. Sua participação foi imprescindível para a concretização desse trabalho. Tenho enorme admiração por você.

À Juliana Maria Oliveira, pela amizade, disponibilidade, incentivo e pela troca de conhecimento. Você é fera!

Aos meus amigos queridos, todos eles, especialmente Ana Carolina Cabrinha, Anderson Paz, Paloma Miranda, Alessandra Cavalcante, Lorena Lima, Grace Jardim, Alzemira Mascarenhas e Carol Falcão de Carvalho, pelo incentivo e por cuidarem de mim nos momentos difíceis.

Aos professores da Pós-Graduação em Odontologia da FAO/UFAM, pelo conhecimento transmitido e inspiração.

Aos meus colegas de turma, pelos bons momentos compartilhados durante as disciplinas. Agradeço especialmente ao Roberto Martinho e à Mariana Mena Barreto pela amizade, por todo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

À Fundação HEMOAM, por ter aberto as portas e concedido gentilmente o espaço para a realização deste trabalho.

À Dra Célia Maria Ferreira Bolognese e à Mirian, pela receptividade, orientação e disponibilidade frente aos pacientes.

À Dra Cristina Motta Ferreira, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Microbiologia da HEMOAM, pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos funcionários da Fundação HEMOAM, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho: Enfermeira Luiza Bruce, Enfermeira Rilza, Enfermeira Arlete e técnico Vander. Obrigada por me ajudarem no momento das coletas.

Ao Laboratório de Genômica da Fundação HEMOAM, pelo espaço e equipamentos utilizados na pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFAM, por ceder o espaço e os equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Lioney Cabral, por ter gentilmente cedido os controles positivos para as reações.

Aos mais do que colegas de trabalho, à família DPML, por todo apoio e incentivo que me deram durante esses dois anos. Agradeço especialmente pela amizade, Lucinha, Naíza, Leila, Tamara e Fátima.

À professora Neila Falcone, minha inspiração como docente. Obrigada por sua amizade incentivo e preocupação, sempre.

Ao CNPq pelo incentivo financiamento à pesquisa.

À FAPEAM, pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Aos meus queridos e pequeninos pacientes, sem os quais eu não conseguiria. Devo muito a cada um de vocês. Cada sorriso, cada brincadeira, cada beijo me deu forças para seguir, vocês me inspiraram e me ajudaram a ser melhor. Força!

RENATA GUALBERTO DA CUNHA. Quantificação do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda. 2016. 118 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

## RESUMO

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comum em crianças, principalmente do sexo masculino, sendo a quimioterapia o tratamento indicado para esses pacientes. Efeitos colaterais secundários decorrentes da terapia têm sido relatados, sendo a mucosite um dos mais comuns. Tem sido sugerido na literatura que o HSV-1 desempenha papel importante na severidade da mucosite bucal em pacientes com doenças onco-hematológicas. Este trabalho quantificou o HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos com LLA submetidos ao protocolo GBTLI LLA-2009, na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), correlacionando sua carga viral com as diferentes fases do tratamento e em relação a presença e graduação da mucosite bucal. Foram avaliados vinte pacientes por meio de exame clínico da mucosa bucal para identificação de lesões bucais, bem como a coleta de células da mucosa jugal em vários momentos das diferentes fases da quimioterapia. Foi realizada extração de DNA dessas amostras para posterior detecção e quantificação da carga viral do HSV-1 por meio da técnica de PCR em Tempo Real. Os dados foram analisados por meio dos testes de Mann Whitney e Kruskal Wallis com nível de significância de  $p \leq 0,05$ . Do total de pacientes, metade era do sexo masculino, a maioria com idade entre 1 e 6 anos (80%) e com LLA do tipo B de baixo risco (75%). Lábios ressecados (15%) e mucosite bucal (35%) foram as manifestações bucais encontradas. Detectou-se a presença do HSV-1 na mucosa bucal de 80% dos pacientes em algum momento do tratamento quimioterápico havendo predominância do vírus na fase de Intensificação somente no grupo de pacientes com LLA B alto risco, não havendo diferenças na carga viral do HSV-1 nas diferentes fases do tratamento no grupo de LLA B de baixo risco. Maior ocorrência de mucosite foi observada na préfase/indução (75%) ocorrendo valores mais altos de carga viral nesses pacientes em relação aos livres de mucosite, porém sem significância estatística. Sugere-se que a presença do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes com LLA B é frequente, e sua carga viral pode estar diferenciada nos subtipos de LLA B. No entanto, o papel do HSV-1 no surgimento da mucosite bucal ainda não está claro.

**Palavras-chave:** Leucemia Linfoblástica Aguda, Mucosite Bucal, HSV-1, Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real.

RENATA GUALBERTO DA CUNHA. Quantification of HSV-1 in the buccal mucosa of pediatric patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. 2016. 118 f. Master of Science submitted to the Graduate Program in Dentistry, Federal University of Amazonas, Manaus-AM.

## ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common malignancy in children, especially in males and chemotherapy is generally the treatment for these patients. Minor side effects of therapy have been reported, and mucositis is one of the most common. It has been suggested in the literature that HSV-1 plays an important role in the severity of oral mucositis in patients with onco-hematological diseases. This study quantified HSV-1 in the oral mucosa of pediatric ALL patients undergoing GBTLI ALL-2009 protocol, from the Foundation of Hematology of the Amazon (HEMOAM), correlating viral load to the different stages of treatment and also to the presence and grading of oral mucositis. We evaluated twenty patients by clinical examination of the oral mucosa to identify oral lesions and also collected cells from buccal mucosa in several times and phases of chemotherapy. These samples were submitted to DNA extraction followed by detection and quantification of HSV-1 using Real Time PCR. Data were analyzed using Mann-Whitney and Kruskal Wallis test with a significance level of  $p \leq 0.05$ . Of all patients, half of them were male, between 1 and 6 years (80%) and with ALL Type B low risk (75%). Dry mouth (15%) and oral mucositis (35%) were the oral lesions found. It was detected HSV-1 presence in the oral mucosa of 80% of patients at some stage of chemotherapy with predominance of the virus in the intensification phase only in patients with ALL B high risk, with no differences in viral load of HSV -1 at different stages of treatment in LLA B group of low risk. Higher incidence of mucositis was observed in prephase/induction (75%) with higher levels of the virus in these patients compared to those free of mucositis, but without statistical significance. It is suggested that HSV-1 is frequent in the buccal mucosa of patients with B ALL, and its viral load may be different in subtypes of ALL B. However, the role of HSV-1 at the onset of oral mucositis not it is certain.

**Key words:** Acute Lymphoblastic Leukemia, Oral Mucositis, HSV-1, Real Time Polymerase Chain Reaction.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ilustração demonstrando as fases de desenvolvimento e resolução da mucosite .....	37
<b>Figura 2.</b> Ilustração da abordagem de avaliação clínica e os momentos de realização das coletas na prefase + indução e na consolidação da remissão.....	49
<b>Figura 3.</b> Kit de extração de DNA viral utilizado (Kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit da Invitrogen®) .....	53
<b>Figura 4.</b> Ilustração esquemática mostrando a extração do DNA utilizando o kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit da Invitrogen®	55
<b>Figura 5.</b> Kit de extração de DNA genômico utilizado (Kit HiYield Genomic DNA Mini kit da BioAmerica) .....	55
<b>Figura 6.</b> Equipamento automatizado StepOne Plus Real System (Life Technologies, Foster City, CA) utilizado na técnica de PCR em Tempo Real.....	56
<b>Figura 7.</b> Reagentes que compõem o HSV1 Q - PCR Alert kit necessários para a análise qualitativa e quantitativa das amostras, através da técnica de PCR em Tempo Real.....	60
<b>Figura 8.</b> Microplaca com 96 poços utilizada para a realização da técnica de PCR em Tempo Real.....	60
<b>Figura 9.</b> Ilustração mostrando a organização da análise de 11 amostras.....	61

<b>Figura 10.</b> Curva padrão obtida a partir do KIT HSV1 Q - PCR Alert kit das diluições seriadas do HSV1 - PCR Standard variando de 10 <sup>2</sup> a 10 <sup>5</sup> cópias/uL.....	62
<b>Figura 11.</b> Regressão linear da curva padrão (R <sup>2</sup> = 0,991) .....	63
<b>Figura 12.</b> Regressão linear da curva padrão com amostras positivas ....	65
<b>Figura 13.</b> Mucosite bucal durante o tratamento quimioterápico .....	67
<b>Figura 14.</b> Quantificação absoluta da carga viral de todos os pacientes do estudo em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução .....	71
<b>Figura 15.</b> Quantificação absoluta da carga viral de todos os pacientes do estudo em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na consolidação da remissão .....	72
<b>Figura 16.</b> Figura A. Quantificação absoluta da carga viral para os pacientes com LLA B BR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução .....	73
<b>Figura 17.</b> Quantificação absoluta da carga viral os pacientes com LLA B BR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na consolidação da remissão .....	74
<b>Figura 18.</b> Quantificação absoluta da carga viral em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (D) nos pacientes com LLA B BR	76
<b>Figura 19.</b> Quantificação absoluta da carga viral nos pacientes portadores de LLA B BR com mucosite bucal em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução .....	77
<b>Figura 20.</b> Quantificação absoluta da carga viral nos pacientes portadores de LLA B BR com mucosite bucal em relação aos diferentes momentos (D)	

do tratamento quimioterápico na Consolidação da Remissão	78
.....	
<b>Figura 21.</b> Quantificação absoluta da carga viral em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (D) nos pacientes com mucosite bucal .....	80
<b>Figura 22.</b> Quantificação absoluta da carga viral do HSV-1 para os pacientes com LLA B BR em relação às diversas localizações, a graduação (OMS) e a classificação (Otmani, 2011) .....	81
<b>Figura 23.</b> Quantificação absoluta da carga viral para os pacientes com LLA B AR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução.....	82
<b>Figura 24.</b> Quantificação absoluta da carga viral os pacientes com LLA B AR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na consolidação da remissão .....	83
<b>Figura 25.</b> Quantificação absoluta da carga viral em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (D) nos pacientes com LLA B AR ..	85
<b>Figura 26.</b> Quantificação absoluta da carga viral no único caso de mucosite do grupo de pacientes portadores de LLA B AR.....	85

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Classificação das Leucemias Linfoblásticas Agudas, segundo OMS (2008) .....	27
<b>Quadro 2.</b> Critérios de inclusão dos pacientes nos subgrupos de baixo risco ou alto risco de recidiva da LLA B-derivada .....	31
<b>Quadro 3.</b> Representação do planejamento global do Protocolo GBTLI LLA-2009 para pacientes com leucemia linfoblástica aguda.....	35
<b>Quadro 4.</b> Classificação das mucosites conforme a Escala de Toxicidade Bucal da Organização Mundial de Saúde.....	47
<b>Quadro 5.</b> Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia B-Derivada do grupo de baixo risco de recidiva.....	50
<b>Quadro 6.</b> Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia B-Derivada do grupo de alto risco de recidiva .....	51
<b>Quadro 7.</b> Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia T-Derivada .....	51
<b>Quadro 8.</b> Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo .....	51
<b>Quadro 9.</b> Demonstração da programação dos ciclos utilizados na PCR em Tempo Real.....	62
<b>Quadro 10.</b> Valores de <i>Ct</i> obtidos em quatro corridas na PCR em Tempo Real .....	64
<b>Quadro 11.</b> Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os Casos consolidados de LLA. ....	71

<b>Quadro 12.</b> Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os casos consolidados de LLA .....	71
<b>Quadro 13.</b> Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B BR.....	73
<b>Quadro 14.</b> Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B BR.....	73
<b>Quadro 15.</b> Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando momentos isolados da prefase/indução (P/I e da consolidação da remissão (CR) em relação as demais fases do tratamento nos pacientes com LLA B BR.....	75
<b>Quadro 16.</b> Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias nos pacientes com LLA B BR.....	75
<b>Quadro 17.</b> Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento (D) dentro da prefase/indução e consolidação da remissão dos episódios de mucosite bucal nos pacientes com LLA B BR.....	77
<b>Quadro 18.</b> Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão dos episódios de mucosite bucal nos pacientes com LLA B BR.....	77

<b>Quadro 19.</b> Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando momentos isolados da prefase/indução (P/I) e da consolidação da remissão (CR) em relação as demais fases do tratamento nos pacientes com mucosite bucal.....	79
<b>Quadro 20.</b> Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias nos pacientes com mucosite bucal.....	79
<b>Quadro 21.</b> Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B AR.....	82
<b>Quadro 22.</b> Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B AR .....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Membros da família <i>Herpesviridae</i> que infectam o ser humano.	41
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos da $\beta$ -globina .....	56
<b>Tabela 3.</b> Dados referentes aos pacientes do estudo (ANEXO B).....	109
<b>Tabela 4.</b> Distribuição dos dados de acordo com o sexo, idade, tipo de LLA, manifestações bucais e presença de HSV1 nos diferentes momentos de cada fase do tratamento quimioterápico.....	68
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos dados de mucosite bucal de acordo com a ocorrência, sexo, idade, tipo de LLA, localização, graduação da OMS, classificação segundo Otmani et al (2011) e presença de HSV-1 nos diferentes momentos de cada fase do tratamento quimioterápico em que o paciente se encontrava.....	69
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos dados completos dos pacientes com mucosite (ANEXO C) .....	112
<b>Tabela 7.</b> Valores da quantificação do HSV-1 de maneira consolidada (ANEXO D) .....	113
<b>Tabela 8.</b> Valores da quantificação do HSV-1 para pacientes com LLA B AR (ANEXO E) .....	114
<b>Tabela 9.</b> Valores da quantificação do HSV-1 para pacientes com LLA B BR (ANEXO F) .....	115
<b>Tabela 10.</b> Revisão de trabalhos publicados na literatura (ANEXO G) .....	116

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ara-C</b>	Citarabine
<b>BCR/ABL</b>	Translocação dos genes BCR-ABL
<b>CMV</b>	Citomegalovírus
<b>CT</b>	Cycle Threshold
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EBV</b>	Epsten-Barr vírus
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FAO/UFAM</b>	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas
<b>FAM</b>	Fluoróforo
<b>FCF/UFAM</b>	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas
<b>GBTLI LLA</b>	Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância
<b>GpD</b>	Glicoproteína D
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HEMOAM</b>	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>HSV</b>	Herpes vírus simples
<b>HSV-1</b>	Herpes vírus simples tipo 1
<b>HSV-2</b>	Herpes vírus simples tipo 2
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$

<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LLA B</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda B- Derivada
<b>LLA B AR</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda B- Derivada de alto risco de
<b>LLA B BR</b>	recaída  Leucemia Linfoblástica Aguda B- Derivada de baixo risco de  recaída
<b>nMP</b>	Mercaptopurina
<b>NF-kB</b>	Fator Nuclear – Kb
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>Pb</b>	Pares de Base Nitrogenadas
<b>PCR</b>	Reação da Polimerase em Cadeia
<b>Ph+</b>	Cromossomo Filadélfia Positivo
<b>PPGO/UFAM</b>	Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade  Federal do Amazonas
<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TE</b>	Tampão Tris HCL+ EDTA
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>VIC</b>	Fluoróforo
<b>VZV</b>	Varicela zoster vírus
<b>1X</b>	Diluição de uma vez

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
2.1 Considerações gerais sobre Doenças Onco-Hematológicas.....	24
2.2 Leucemia Linfoblástica Aguda.....	25
2.2.1 Conceito.....	25
2.2.2 Epidemiologia.....	25
2.2.3 Classificação.....	26
2.3 Manifestações bucais da LLA.....	28
2.4 Protocolos de Tratamento para LLA.....	28
2.4.1 Protocolos Terapêuticos do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância (GBTLI LLA).....	28
2.5 Manifestações bucais pós-tratamento da LLA.....	36
2.5.1 Mucosite Bucal.....	36
2.6 HSV-1.....	40
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 Geral.....	43
3.2 Específicos.....	43
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Comitê de Ética em Pesquisa.....	44
4.2 Desenho do estudo.....	45
4.3 População de estudo.....	45
4.4 Casuística .....	45
4.5 Critérios de Inclusão.....	45
4.6 Critérios de Exclusão.....	46
4.7 Procedimentos de Pesquisa Clínica.....	46
4.7.1 Avaliação e graduação da mucosite bucal nos pacientes com LLA.....	47
4.7.2 Coleta das células epiteliais da mucosa bucal.....	48
4.7.3 Extração de DNA.....	52
4.7.3.1 Extração através de kit de DNA viral.....	52
4.7.3.2 Extração através de kit de DNA genômico.....	54
4.7.4 Qualidade do DNA.....	56
4.7.5 Verificação da presença do DNA homólogo do HSV-1.....	56
4.7.5.1 Controle positivo para a reação.....	57
4.7.5.2 Amplificação e Quantificação do DNA do HSV-1.....	57
4.7.5.3 Curva padrão.....	60
4.7.5.4 Otimização da curva padrão.....	61
4.7.5.5 Avaliação da curva padrão.....	61
4.7.5.6 Sensibilidade e reprodutibilidade.....	64
4.8 Análise estatística.....	65
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
5.1 Caracterização das amostras e detecção do HSV-1.....	66

5.2	Quantificação do HSV-1 .....	70
5.2.1	Correlação nos casos consolidados de Leucemia Linfoblástica Aguda B (LLA B).....	70
5.2.2	Correlação nos casos de LLA B de Baixo Risco (LLA B BR) .....	72
5.2.2.1	Correlação nos episódios de Mucosite Bucal.....	76
5.2.2.2	Quantificação do HSV-1 nos episódios de mucosite bucal de acordo com os aspectos clínicos.....	80
5.2.3	Correlação nos casos de LLA B de Alto Risco de Recaída (LLA B AR).....	81
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
6.1	Epidemiologia de pacientes portadores de LLA.....	86
6.2	Expressão do vírus HSV-1 na mucosa bucal de pacientes com LLA .....	87
6.3	Relação do HSV-1 com a mucosite bucal em pacientes com LLA .....	90
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>94</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>95</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>101</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças onco-hematológicas são neoplasias malignas que podem acometer medula óssea, vasos linfáticos, vasos sanguíneos e o sangue periférico. A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a mais comum na infância, sendo responsável por até 80% das leucemias em crianças e representando cerca de 30% de todas as neoplasias infantis. É mais prevalente em crianças do sexo masculino, de cor branca, entre 2 a 5 anos de idade, com incidência anual de 9 a 10 casos a cada 100.000 pessoas (1 a 10 anos). As taxas de sobrevivência estão em torno de 80% em cinco anos para crianças com acesso ao tratamento (GRIMBERG, 2011; GOMEZ-CANDELA et al., 2012). No Estado do Amazonas, foi estimada incidência de 70 casos em homens e 50 casos em mulheres no ano de 2014, com uma taxa bruta de 3,65 e 5,32 por 100 mil habitantes respectivamente (INCA, 2014).

O Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância (GBTLI) vem elaborando protocolos terapêuticos para a LLA, baseados principalmente no risco de recidiva, dados clínico-laboratoriais ao diagnóstico e na resposta precoce à terapia de indução, adaptando a intensidade da quimioterapia aos diferentes grupos de risco. O protocolo mais recentemente elaborado, o GBTLI LLA-2009, foi baseado nos resultados dos protocolos elaborados anteriormente, o GBTLI LLA-1993 e o GBTLI LLA-1999, cujos resultados permitiram identificar um grupo de pacientes com alto risco de falha indutória e de recidiva, através de conhecimentos de fenotipagem e citogenética das células blásticas, juntamente com o conhecimento da resposta do paciente à terapia. Baseado nisso, o protocolo GBTLI LLA-2009 foi elaborado com modificações nos grupos de pacientes, sendo distribuídos em: pacientes com leucemia B-derivada de baixo risco de recidiva, pacientes com leucemia B-derivada de alto risco

de recidiva, pacientes com leucemia T-derivada e pacientes com leucemia Ph<sup>+</sup>, tendo cada grupo, abordagens terapêuticas específicas (FIGLIOLIA, 2006; GBTLI LLA-2009).

Manifestações bucais podem surgir como um dos primeiros sinais da leucemia. Sangramento gengival, hiperplasia gengival, candidíase, periodontite e ulcerações são as alterações mais frequentes nos pacientes. No entanto, o tratamento quimioterápico pode desencadear ou intensificar efeitos colaterais secundários na cavidade bucal, destacando-se principalmente a mucosite. Sonis (2004) desenvolveu um modelo teórico para explicar o desenvolvimento e a resolução da mucosite, que está dividido em cinco fases: iniciação, sinalização, amplificação, ulceração e cura. A Organização Mundial de Saúde (OMS) elaborou uma escala de toxicidade oral com graus baseados na severidade da mucosite, que variam de 0 a 4, sendo o grau 0 indicando inexistência de alterações, grau 1 indica dor e eritema, grau 2 indica eritema e úlceras, grau 3 para eritema difuso (dieta líquida) e grau 4 para úlceras difusas, que tornam a alimentação impossível, e, tendo em vista estas alterações, a mucosite em seus graus mais elevados pode servir como porta de entrada para infecções por vírus, bactérias e fungos (WHO, 1979; PUYAL-CASADO et al, 2003; JAVED et al., 2012; YE et al., 2013).

Estudos sugerem que há uma relação importante entre a presença do vírus HSV-1 e o agravamento da mucosite bucal (ANIRUDHAN et al., 2008; DJURIC et al., 2009; CHEN et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012) e dados sobre relação da prevalência e quantificação do HSV-1 em crianças diagnosticadas com LLA bem como a relação deste DNA-vírus com quadros de mucosite e seu agravamento ainda não estão claros.

Como hipótese temos que, durante o tratamento da LLA, com a administração da quimioterapia, há a ocorrência de efeitos colaterais secundários na cavidade bucal, além da alteração do equilíbrio da microbiota bucal, contribuindo assim para a intensificação do processo de mucosite bucal em pacientes pediátricos com LLA.

Diante disso, torna-se necessário aprofundar os conhecimentos sobre a caracterização da microbiota bucal na LLA, especialmente do HSV-1, e sua correlação com a saúde bucal de pacientes infantis portadores desta doença onco-hematológica, estando eles ou não com mucosite bucal, podendo este estudo contribuir para a gestão das complicações bucais associadas a estes indivíduos.

Portanto, o objetivo geral do presente trabalho foi quantificar o HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda tratados através do protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância GBTLI LLA-2009.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Considerações gerais sobre Doenças Onco-Hematológicas

Doenças onco-hematológicas são neoplasias malignas que podem afetar o sangue, medula óssea, vasos sanguíneos e vasos linfáticos (GOMEZ-CANDELA et al., 2012), estando os linfomas e as leucemias dentre os mais incidentes na infância (GRIMBERG, 2011).

A leucemia é o câncer mais comum na população infantil, e dependendo do curso da doença e da linhagem celular afetada, pode ser classificada em linfoide aguda, linfoide crônica, mieloide aguda, mieloide crônica e mielomonocítica crônica (BARION et al., 2007). Considerando os aspectos clínicos e patológicos, a leucemia pode ser classificada em aguda ou crônica. A forma crônica é caracterizada por um aumento excessivo no número de células maduras anormais da série branca do sangue, levando meses ou até anos para progredir enquanto a aguda caracteriza-se pelo aumento rápido no número de células imaturas do sangue, o que faz com que a medula óssea seja incapaz de reproduzir células sanguíneas saudáveis. Outra classificação das leucemias é em relação ao tipo celular afetado, podendo ser linfoide ou mieloide. A leucemia é dita linfoide se tiver origem nos linfoblastos, e mieloide se tiver origem em células das linhagens granulocíticas e monocíticas (INCA, 2014).

Apesar de a etiologia das leucemias não estar totalmente esclarecida, diversos estudos demonstram que alterações cromossômicas e moleculares nas células leucêmicas, hereditariedade, condições genéticas relacionadas à estabilidade e ao reparo do DNA, processos infecciosos, exposição a agentes químicos ou irradiações e ainda, exposição a um agente ainda não reconhecido, estejam fortemente associadas

ao seu desencadeamento (McNALLY, EDEN, 2004; BARION et al., 2007; FARIAS, 2010).

## **2.2 Leucemia Linfoblástica Aguda**

### *2.2.1- Conceito*

A Leucemia Linfoblástica Aguda representa um grupo de malignidades que acometem as células da linhagem linfóide B e T-precursoras, em que a medula óssea produz rapidamente grande quantidade de células imaturas, os blastos, que acabam por substituir as células saudáveis, podendo se depositar em diversos órgãos e tecidos. Pode acometer tanto crianças quanto adultos e a heterogeneidade clínica do curso e desfecho da doença, especialmente quando se comparam as populações adulta e pediátrica, reflete diferentes subtipos biológicos (JAVED et al., 2012; ZUCKERMAN, ROWE, 2014).

### *2.2.2 - Epidemiologia*

De todos os tipos de leucemia, a LLA é a mais comum em pacientes pediátricos (INCA, 2014), sendo responsável por até 80% das leucemias em crianças e representando cerca de 30% de todas as neoplasias infantis (GOMEZ-CANDELA et al., 2012), com pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade (PUI, ROBISON, LOOK, 2008) e predileção pelo sexo masculino, na proporção de 1,2:1 (KABRIAEI, ANASTASI, LARSON, 2003; GRIMBERG, 2011). No entanto, também pode acometer indivíduos adultos, representando cerca de 20% das leucemias nesta população (ZUCKERMAN,

ROWE, 2014). A LLA ocorre mais em caucasianos do que em negros, com uma relação de 1,5/100.000 em brancos e 0,8/100.000 em negros (LEITE et al., 2007).

Ribeira e Oriol (2009) demonstraram que a incidência anual da LLA em crianças de 1 a 10 anos é cerca de 9 a 10 casos por 100.000 pessoas. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o ano de 2014, estimou-se no Brasil incidência de cerca de 5.050 casos de leucemia (de todos os tipos) na população masculina e de 4.320 casos na população feminina, com risco estimado de 5,20 casos novos para cada 100 mil homens e 4,24 para cada 100 mil mulheres.

Na região Norte, com excessão das neoplasias de pele não-melanoma, a leucemia é o quinto câncer mais comum em homens e o sétimo em mulheres. No Estado do Amazonas, foram estimados para 2014, 70 novos casos de leucemia em homens com taxa bruta de 3,65 por 100 mil habitantes, sendo 50 casos novos na cidade de Manaus (taxa bruta de 5,32) enquanto para as mulheres, 40 casos novos no Estado (taxa bruta de 2,31), sendo os 40 na capital (taxa bruta de 3,87) (INCA, 2014).

Em relação à sobrevida, observam-se variações dependendo da população, sendo que nos Estados Unidos e Europa Ocidental, esse índice é de 43% em cinco anos para homens, ao passo que na América do Sul este índice é de 24%. Este fato pode ser explicado devido ao diferente padrão de acesso pelas populações ao tratamento da leucemia (INCA, 2014). Para as crianças, a sobrevida em cinco anos chega a 80% em áreas com acesso ao tratamento (PUI, ROBISON, LOOK, 2008; SILVERMAN et al., 2010).

### 2.2.3 - Classificação

No ano de 2008, a OMS em colaboração com a Sociedade de Hematopatologia e a Associação Europeia de Hematopatologia publicaram uma revisão e atualização da classificação de tumores de tecidos linfoides e hematopoiéticos. Esta nova classificação incorpora informações baseadas em estudos clínicos e inclui novos critérios para o reconhecimento de algumas neoplasias previamente descritas, bem como o esclarecimento e refinamento da definição de critérios para novas entidades identificadas e variantes. Esta classificação utiliza informações baseadas na morfologia, citoquímica, imunofenotipagem, genética e recursos clínicos para definir entidades clinicamente significativas da doença (VARDIMAN et al., 2009; CAMPO et al., 2011) (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação das Leucemias Linfoblásticas Agudas, segundo OMS (2008).

<b>Leucemias agudas de linhagem ambígua</b>
Leucemia aguda indiferenciada
Leucemia aguda de fenótipo misto com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1
Leucemia aguda de fenótipo misto t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranjado
Leucemia aguda de fenótipo misto B-mieloide não especificado
Leucemia aguda de fenótipo misto T-mieloide não especificado
Entidade Provisória: Leucemia/linfoma de células blásticas NK
<b>Leucemia linfoblástica B/ Linfoma</b>
Leucemia linfoblástica B/Linfoma não especificado
Leucemia linfoblástica B /linfoma com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia linfoblástica B /linfoma com t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL 1
Leucemia linfoblástica B /linfoma com t(v;11q23); <i>MLL</i> rearranjado
Leucemia linfoblástica B /linfoma com t(12;21)(p13;q22) TEL-AML1(ETV6-RUNX1)
Leucemia linfoblástica B /linfoma com hiperdiploidia
Leucemia linfoblástica B /linfoma com hipodiploidia
Leucemia linfoblástica B /linfoma com t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH
Leucemia linfoblástica B /linfoma t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<b>Leucemia linfoblástica T/ Linfoma</b>

Fonte: baseado em VARDIMAN et al. (2009).

## **2.3 Manifestações bucais da LLA**

Em pacientes com LLA, o sistema imunológico pode estar comprometido, já que os linfócitos exercem importante papel na defesa contra agentes invasores. Sabe-se que a composição da microbiota de um hospedeiro é determinada tanto por fatores do próprio hospedeiro quanto fatores ambientais, logo, se o equilíbrio de qualquer um desses fatores for perturbado, pode ocorrer uma drástica mudança na composição da microbiota e então ocorrer manifestações clínicas de doenças (WANG et al., 2014).

Em alguns indivíduos, a leucemia se manifesta primeiramente na cavidade bucal. Tais manifestações podem estar presentes em metade dos pacientes com leucemia aguda, especialmente a LLA, onde lesões como sangramento gengival, hiperplasia gengival, candidíase, periodontite e ulceração podem ser observadas (PUYAL-CASADO et al., 2003), e microrganismos orais são suspeitos de estar envolvidos na ocorrência ou no agravamento de tais complicações (PAUNICA et al., 2009).

## **2.4 Protocolos de Tratamento para LLA**

### **2.4.1 Protocolos Terapêuticos do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância (GBTLI LLA)**

O Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância, desde a década de 90, vem elaborando protocolos de tratamento para LLA na infância, como o protocolo GBTLI LLA-93, onde os pacientes foram divididos em três grupos: o de risco básico verdadeiro, o de risco básico e o de alto risco de recidiva. Em 1999 foi criado o protocolo GBTLI LLA-99, que dividiu os pacientes em apenas dois grupos: o

de baixo e o de alto risco de recidiva. Estes protocolos adotaram como critério de risco os dados clínico-laboratoriais ao diagnóstico e a resposta precoce à terapia de indução, adaptando a intensidade da quimioterapia aos diferentes grupos de risco. A terapia ajustada ao grupo de risco tem sido o principal foco do tratamento da LLA na criança. Procurando equilibrar os riscos e os benefícios oferecidos pelo tratamento, a terapia mais agressiva tem sido aplicada aos pacientes que estão em maior risco de recaída da doença, enquanto a menos agressiva é recomendada para os pacientes com menor risco. Esses protocolos foram divididos em cinco fases: indução da remissão, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção (FIGLIOLIA, 2006; GBTLI LLA-2009; FARIAS, 2010).

Mais recentemente, em 2009, foi elaborado o conceito do protocolo GBTLI LLA-2009 baseado nos resultados dos estudos GBTLI LLA-93 e GBTLI LLA-99. Além do uso de critérios clínicos, critérios de fenotipagem e citogenética também são utilizados no protocolo. Algumas características de fenotipagem e de citogenética desfavoráveis da célula blástica influenciam sensivelmente resultados da terapia. Esses resultados são avaliados no início do tratamento (no 8º e 15º dia), no final da fase de indução (35º dia) e em longo prazo nas taxas de sobrevida global e sobrevida livre de eventos (GBTLI LLA-2009).

O conhecimento dessas características das células blásticas juntamente com o conhecimento da resposta do paciente à terapia (medida morfológicamente pela porcentagem dos blastos leucêmicos no sangue periférico no 8º dia ou na medula óssea no 15º e 35º dias) permitiu que houvesse a identificação de um grupo de pacientes de alto risco de falha indutória e de recidiva. O protocolo GBTLI LLA-2009 excluiu do grupo de baixo risco os pacientes portadores de LLA T-derivada e LLA Ph<sup>+</sup>/BCR/ABL positivos, onde são indicados protocolos específicos. Há, portanto, para o protocolo

GBTLI LLA-2009, três grandes grupos de pacientes: LLA B-derivada, LLA T-derivada e LLA Ph<sup>+</sup> e cada grupo com seu protocolo de tratamento específico (GBTLI LLA-2009).

No protocolo GBTLI LLA-2009, somente a leucemia B-derivada é estratificada em grupo de baixo e alto risco de recidiva, levando em consideração a idade e a contagem leucocitária ao diagnóstico, acrescido da resposta terapêutica avaliada no sangue periférico no 8º dia, da citologia da medula óssea e doença residual mínima (medida por citometria de fluxo) no 15º dia, e no final da fase de indução (35º dia) através de citologia da medula óssea e doença residual mínima (medida por PCR) (GBTLI LLA-2009).

Os critérios de inclusão dos pacientes nos grupos de baixo ou de alto risco de recidiva para LLA B-derivada são baseados na idade, leucometria inicial, acometimento do sistema nervoso central (SNC) e citogenética desfavorável. (Quadro 2).

A terapia proposta pelo GBTLI LLA-2009 para os pacientes com LLA B-derivada é a seguinte:

LLA B-derivada de baixo grau de recidiva:

- **Prefase:** permite alcançar melhores condições clínicas para o início da indução. Será administrado 60 mg/m<sup>2</sup>/dia de Prednisona por sete dias e uma injeção intratecal de Metotrexato no primeiro dia.

Quadro 2. Critérios de inclusão dos pacientes nos subgrupos de baixo risco ou alto risco de recidiva da LLA B-derivada.

GRUPO	Idade	Leucometria	Acometimento do SNC ao diagnóstico	Citogenética de prognóstico
<b>LLA B-derivada baixo risco de recaída</b>	≥ 1 < 9 anos	< 50000/mm <sup>3</sup>	Não	Favorável (BCR-ABL, rearranjo do gene MLL e hipodiploidia < 46 cromossomos)
<b>LLA B-derivada alto risco de recaída</b>	>9 anos	≥ 50000/mm <sup>3</sup>	Sim	Desfavorável ou respondedores lentos/refratários à prefase e terapia de indução

- **Indução:** administração de Vincristina, Dexametasona, Daunoblastina e L-Asparaginose de três a quatro semanas (prefase + indução = 35 dias).
- **Consolidação da remissão:** administração de Mercaptopurina (6-MP), Citarabine (Ara-C) por quatro semanas e MADIT no 15<sup>o</sup> e 35<sup>o</sup> dias. Se o paciente for um respondedor lento à terapia inicial, é preconizada a inclusão de Ciclofosfamida nessa fase, assim como na fase de consolidação tardia.
- **Intensificação:** oito semanas de administração de Metotrexato 2g/m<sup>2</sup> a cada duas semanas (x4) e MADIT intratecal de acordo com a idade.
- **Consolidação tardia:** administração de Dexametasona, Vincristina, Doxorubicina, L-Asparaginose, 6-Tioguanina, Citarabine e MADIT por oito semanas.

- **Fase de manutenção:** 6-Mercaptopurina e Metotrexato serão administrados por 18 meses e administração a cada 8 semanas durante toda a terapia de manutenção de injeções intratecais de MADIT.

LLA B-derivada de alto grau de recidiva:

- **Prefase:** administração de Prednisona 60mg/m<sup>2</sup>/dia por sete dias e injeção intratecal de Metotrexato no primeiro dia.
- **Indução:** administração de Daunorrubicina, L-Asparaginase, Prednisona Vincristina, com objetivo de alcançar a remissão clínica completa em quatro semanas; administração de MADIT. A Ciclofosfamida é administrada adicionalmente em pacientes respondedores lentos a terapia da prefase e indução.
- **Consolidação da remissão:** administração de Etoposide, Citarabine, 6-Tioguanina e Vincristina, Prednisona, 6-Mercaptopurina e Metotrexato por oito semanas.
- **Intensificação:** Dividida em dois blocos: um com administração de Vincristina, Doxorubicina, L-Asparaginase, Dexametasona e outro bloco com Etoposide, Citarabine e 6-Tioguanina, por oito semanas.
- **Interfase:** com duração de oito semanas, doses intermediárias de Metotrexato para respondedores rápidos e doses altas desse mesmo fármaco para respondedores lentos. Uso de L-Asparaginase, 6-Mercaptopurina, Vincristina e Prednisona.
- **Consolidação tardia:** dividida em dois blocos, um com Vincristina, Daunorrubicina, L-Asparaginase e Prednisona; outro bloco com Ciclofosfamida, Citarabine e 6-Tioguanina por oito semanas.
- **Manutenção:** administração de Metotrexato, 6-Mercaptopurina, Vincristina, Prednisona, MADIT por 18 meses.

LLA T-derivada:

- **Prefase:** Administração de 60mg/m<sup>2</sup>/dia Prednisona durante 7 dias e Metotrexato na dose ajustada à idade.
- **Indução:** Para respondedores rápidos no dia 8, será feita administração de 40mg/m<sup>2</sup>/dia de Prednisona por 3 semanas (dia 8 a 29); Vincristina 1,5 mg/ m<sup>2</sup> endovenosa nos dias 8,15,22 e 29; Daunoblastina 40mg/m<sup>2</sup> endovenosa nos dias 8, 15 e 22; Uromitexan 300mg/m<sup>2</sup>/dose; L-Asparaginase 10000 UI/m<sup>2</sup> intramuscular; MADIT administrada nos dias 8, 15 e 35. Para os pacientes respondedores lentos, no dia 8, na indução será feita a intensificação da terapia nos três primeiros dias com Daunoblastina. Os demais componentes serão os mesmos descritos para os pacientes respondedores rápidos.
- **Consolidação da Remissão:** Para os respondedores rápidos administração de Metotrexato, Ciclofosfamida, Uromitexan, Etoposide, Citarabine, 6- Tioguanina, Leucovorin, Vincristina, Prednisona, 6-Mercaptopurina. Para respondedores lentos será utilizado Metotrexato, Vincristina, Etoposide, Dexametasona, Doxorubicina, Leucovorin, Ciclofosfamida, Uromitexan, Prednisona e MADIT, por 8 semanas.
- **Intensificação:** Esta fase tem duração de 8 semanas e serão administrados Vincristina, Doxorubicina, L-Asparaginase, Prednisona, Etoposide, Citarabine, 6-Tioguanina e MADIT.
- **Interfase:** Administração de Metotrexato, Leucovorin, L-Asparaginase, 6-Mercaptopurina, Vincristina, Prednisona e MADIT por 8 semanas.
- **Consolidação tardia:** Administração por 8 semanas de Vincristina, Daunoblastina, L-Asparaginase, Prednisona, Ciclofosfamida, Uromitexan, Citarabine, 6-Tioguanina e MADIT.

- **Manutenção:** Metotrexato, Leucovorin, 6-Mercaptopurina, MADIT, Vincristina e Prednisona (duração de 18 meses).

#### LLA Ph<sup>+</sup>

- **Prefase:** Nesta etapa será administrada 60 mg/m<sup>2</sup>/dia de Prednisona por sete dias.
- **Indução:** Administração de Etoposide, Citarabine 6- Tioguanina, Imatinibe e MADIT para os respondedores rápidos e Ifosfamida, Uromitexan, Imatinibe e MADIT para os respondedores lentos.
- **Consolidação da remissão (dividida em 3 blocos por 3 semanas):** Etoposide, Citarabine, 6-Tioguanina, Imatinibe, MADIT, Ifosfamida, Uromitexan, Metotrexato, Leucovorin, 6-Mercaptopurina, L-Asparaginase,
- **Intensificação:** Administração de Vincristina, Damoblastina, L-Asparaginase, Prednisona, Imatinibe, Etoposide, Citarabine 6-Tioguanina e MADIT por 8 semanas.
- **Consolidação tardia:** Administração de Vincristina, Daunoblastina, L-Asparaginase, Prednisona, Imatinibe, Ciclofosfamida Uromitexan, Citarabine, 6-Tioguanina e MADIT por 8 semanas.
- **Fase de manutenção:** Metotrexato, Leucovorin, 6-Mercaptopurina, Imatinibe, Vincristina, Dexametasona, Ciclofosfamida, Uromitexan, Citarabine e MADIT por 18 meses.

O resumo das fases de tratamento dos grupos de pacientes LLA B-derivada de baixo e de alto grau de recidiva, LLA T-derivada e LLA Ph<sup>+</sup> é mostrado no quadro 3.

Para os lactentes menores de 12 meses e portadores de Síndrome de Down, são indicadas abordagens terapêuticas específicas, o que os coloca em subgrupos especiais (GBTLI LLA-2009).

Quadro 3. Representação do planejamento global do Protocolo GBTLI LLA-2009 para pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

TRATAMENTO										
GRUPOS	LLA B DERIVADA Baixo risco de recaída		LLA B DERIVADA Alto risco de recaída		LLA T DERIVADA			LLA Ph <sup>+</sup>		
FASES DO TRATAMENTO	PREFASE									
	FASE DE INDUÇÃO DA REMISSÃO									
	CONSOLIDAÇÃO DA REMISSÃO									
	INTENSIFICAÇÃO									
	Consolidação Tardia	Manutenção	Interfase	Consolidação Tardia	Manutenção	Interfase	Consolidação Tardia	Manutenção	Consolidação Tardia	Manutenção

## **2.5 Manifestações bucais pós-tratamento da LLA**

O tratamento quimioterápico é capaz de desencadear efeitos colaterais secundários em pacientes portadores de doenças hematopoiéticas, e isso pode interferir na qualidade de vida destes pacientes durante o tratamento antineoplásico (YE et al., 2013; MORAIS et al., 2014). Alterações numerosas na mucosa bucal após o início do tratamento quimioterápico têm sido relatadas em pacientes com LLA, incluindo sangramento gengival, aumento gengival, periodontite, xerostomia, mucosite e infecções da mucosa bucal, como candidíase, infecção por herpes simples, varicela zoster e citomegalovírus (WILLIAMS, LEE, 1991; LEVY-POLACK, SEBELLI, POLACK, 1998; SEPÚLVEDA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; ANIRUDHAN et al., 2008; JAVED et al., 2012; MORAIS et al., 2014).

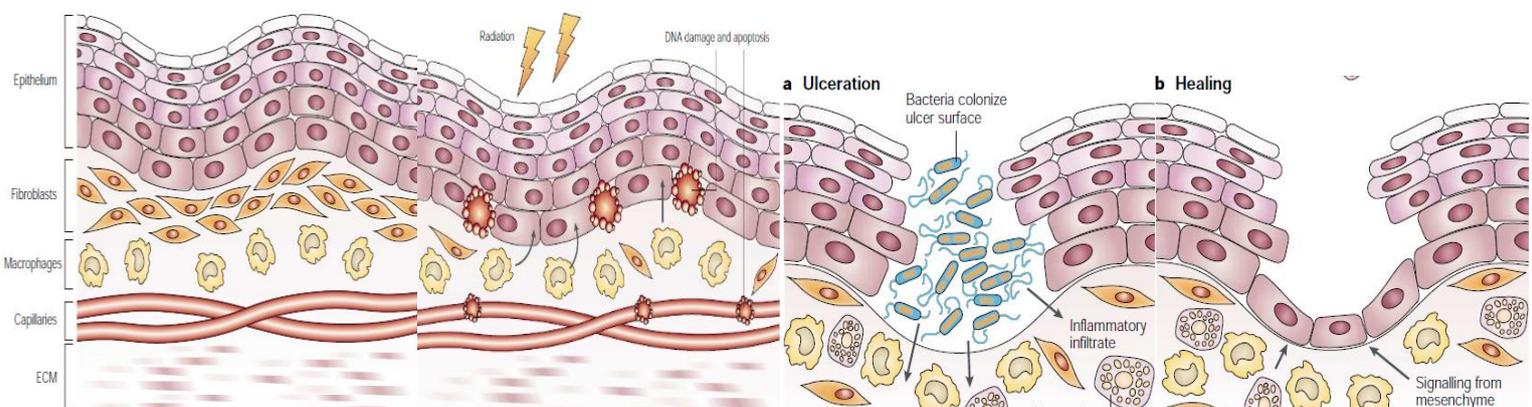
Segundo Puyal-Casado et al. (2003), a incidência de lesões bucais varia conforme o tipo de hemopatia, do tipo de tratamento aplicado e a condição bucal antes do aparecimento da doença, e que o acúmulo de fatores faz com que cerca de 85% dos doentes submetidos a tratamentos com doses elevadas desenvolvam complicações na cavidade bucal.

### *2.5.1- Mucosite Bucal*

Das complicações na cavidade bucal decorrentes da quimioterapia, destaca-se a mucosite (SONIS, 2004; NISCOLA et al., 2007; MENDONÇA, 2008; YE et al., 2013), e sua prevalência induzida por quimioterapia tem sido reportada variando de 30% a 75% dos pacientes (AGGARWAL et al., 2014).

A mucosite bucal pode ocorrer como resultado do efeito tóxico direto ou indireto da quimioterapia realizada. O efeito direto ocorre pela interferência na proliferação, maturação e substituição de células da cavidade bucal através da circulação sistêmica e de mudanças na constituição da saliva, levando inclusive a quadros de xerostomia. Em contrapartida, o efeito indireto está associado com a ação mielossupressiva que pode desregular o sistema imunológico e o processo de reparação, aumentando assim o risco de infecção associada à mucosite bucal (JAVED et al., 2012). Nesse contexto, a presença de alguns microrganismos pode aumentar o agravamento dos efeitos da mucosite (MENDONÇA et al., 2012).

SONIS (2004) desenvolveu um modelo teórico para explicar o desenvolvimento e resolução da mucosite baseado em cinco fases, envolvendo uma cascata de reações: 1) iniciação, 2) sinalização, 3) amplificação, 4) ulceração e 5) cicatrização (Figura 1).



1) **INICIAÇÃO** - ocorre logo após a administração da radiação ou da quimioterapia, que causam danos diretos nas células epiteliais basais e no tecido subjacente e, paralelas a isso, são geradas espécies reativas de oxigênio que desencadeiam outros processos biológicos. Embora a mucosa pareça ser absolutamente normal nesta fase, uma cascata de eventos começa na submucosa que resultará em destruição da mucosa.

2) SINALIZAÇÃO – nesta fase ocorre a ativação de vias de transdução, de forma direta pela radioterapia ou quimioterapia e de forma indireta pelas espécies reativas de oxigênio, que ativam fatores de transcrição como p53 e o fator nuclear-kB (NF-kB), levando à alterações nos genes que modulam a resposta ao dano.

3) AMPLIFICAÇÃO – a ativação do NF-kB no epitélio e nas células endoteliais e a ativação de macrófagos, estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , que vão amplificar o sinal primário ou vão ativar NF-kB em outras células. Essas vias de sinalização conduzem à ativação de metaloproteinases de matriz 1 e 3 em células do epitélio e da lâmina própria, o que resultará em lesão tecidual. Embora os danos biológicos estejam ocorrendo durante essas três fases iniciais da mucosite, o quadro clínico pode mostrar poucas alterações, podendo os pacientes manifestar poucos sintomas.

4) ULCERAÇÃO – nesta fase há perda da integridade da mucosa, resultando em lesões extremamente dolorosas que são propensas a colonização bacteriana. No caso de pacientes neutropênicos, estas perdas da integridade da mucosa servem como porta de entrada para muitos microorganismos da cavidade bucal, podendo levar à bacteremia e sepse.

5) CICATRIZAÇÃO - o processo de cura envolve a reparação do tecido danificado com as células epiteliais, depois do término da terapia antineoplásica.

Em 1979, a OMS definiu através de uma Escala de Toxicidade Oral, graus para as lesões de mucosite baseados na severidade das mesmas, onde foram estabelecidos (WHO, 1979):

Grau 0 - Sem alterações;

Grau 1 - Dor e Eritema;

Grau 2 - Eritemas e úlceras; podendo ainda ingerir alimentos sólidos;

Grau 3 - Eritema difuso, lesões ulcerativas; requer dieta líquida;

Grau 4 - Úlceras difusas, tornando a alimentação impossível.

Otmani et al. (2011) classificou as mucosites de grau 1 e 2 como mucosites moderadas e as de grau 3 e 4, mucosites severas. De acordo com o Grupo Consultivo Europeu sobre Mucosite, esta lesão é classificada como severa em 46% dos pacientes submetidos a transplantes de células hematopoiéticas e, quando a lesão assume esse grau de severidade, a presença de úlceras extremamente dolorosas compromete a ingestão por via oral do paciente, aumentando o risco de desnutrição, desidratação (GOMÉZ-CANDELA et al., 2012) e de infecções (SONIS, 2004; NISCOLA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2012; YE et al., 2013).

Embora tenha ocorrido grande avanço relacionado ao tratamento do câncer, principalmente em relação aos efeitos colaterais secundários como náuseas e vômito, não há um tratamento preciso para a mucosite, e as medidas adotadas pelos profissionais são relacionadas ao controle dos sintomas, principalmente da dor, que dificulta a alimentação e a fala dos indivíduos portadores de leucemias submetidos ao tratamento quimioterápico, aliando medidas de higiene bucal para controlar a incidência e a gravidade das lesões (PUYAL-CASADO et al., 2003; EILERS, MILLION, 2007). Protocolos de higiene bucal tem se mostrado estatisticamente eficientes em pacientes pediátricos em tratamento quimioterápico antineoplásico quando comparado a grupos que não receberam cuidados, sendo eficaz na redução da incidência de mucosite e sua gravidade, assim como à sintomatologia dolorosa (CHENG et al., 2001).

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

extremamente frequente em pacientes com câncer, tanto os com mucosite, bem como os sem (DJURIC et al., 2009).

## 2.6 HSV-1

O vírus herpes simples (HSV) pertence à família *Herpesviridae* e apresenta DNA como material genético. São observados dois (02) subtipos deste vírus, o HSV-1 e o HSV-2, que diferem principalmente pela região que infectam. O HSV-1 infecta mais comumente a região superior do corpo, principalmente a cavidade bucal, enquanto o HSV-2 está relacionado à doença sexualmente transmissível, porém podendo também infectar a cavidade bucal (FATAHZADEH, SCHWARTZ, 2007; ARDUINO, PORTER, 2008). Na família *Herpesviridae*, já foram identificados aproximadamente 130 vírus, no entanto, apenas oito são capazes de infectar o homem (MENDONÇA, 2008). Na tabela 1 são destacados os tipos de vírus desta família capazes de infectar o ser humano.

Tabela 1. Membros da família *Herpesviridae* que infectam o ser humano.

<b>TIPO</b>	<b>NOME</b>
HHV-1	<i>Herpes simplex-1 (HSV-1)</i>
HHV-2	<i>Herpes simplex-2 (HSV-2)</i>
HHV-3	<i>Varicela Zoster virus (VZV)</i>
HHV-4	<i>Epstein-Barr virus (EBV)</i>
HHV-5	<i>Cytomegalovirus (CMV)</i>
HHV-6	<i>Herpes lymphotropic virus</i>
HHV-7	<i>Human herpes virus-7</i>
HHV-8	<i>Human herpes virus-8 (Associado ao Sarcoma de Kaposi)</i>

O HSV-1 é bastante comum na população geral, e em pacientes submetidos à quimioterapia é o agente viral mais frequentemente encontrado na cavidade bucal. No entanto, outros vírus da família *Herpesviridae*, como o *Citomegalovírus*, *Varicela-Zoster* e *Epstein-Barr* têm sido encontrados, e estudos sugerem que há uma relação importante entre a presença destes vírus e o agravamento da mucosite bucal, especialmente do HSV-1, todavia não se sabe a real correlação desses agentes com a mucosite bucal (ANIRUDHAN et al., 2008; DJURIC et al., 2009; CHEN et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012).

Além dos vírus, fungos e bactérias são sugeridos como possíveis participantes no processo de co-infecção da mucosite, dentre os quais se podem destacar o gênero *Candida* e bactérias gram-positivas e gram-negativas (LLOID et al., 1994; SAMONIS, MANTADAKIS, MARAKI, 2000; SEPULVEDA et al., 2003; JAVED et al., 2012).

Mendonça et al. (2012) recentemente demonstraram em crianças com leucemia linfoblástica aguda correlação entre a presença de HSV-1, fungos e bactérias e a gravidade da mucosite bucal, onde concluiu que a presença de HSV-1 e *Candida* estão associados ao aumento da severidade da mucosite em crianças e adolescentes nos dias 14 e 56 da quimioterapia.

Embora muitas características sobre HSV-1 estejam bem estabelecidas, dados sobre relação da prevalência e quantificação deste vírus em crianças diagnosticadas com LLA ainda são limitados, bem como a relação desse agente viral com quadros de mucosite e seu agravamento. A literatura relata o uso de várias técnicas de biologia molecular para estudar este vírus, no entanto, Aggarwal et al. (2014) afirmam que ainda são raros os estudos que utilizam a reação da polimerase em cadeia (PCR) quantitativa para detecção do HSV-1 em mucosa bucal.

Diante disso, torna-se necessário aprofundar os conhecimentos sobre a caracterização da microbiota bucal na LLA, especialmente do HSV-1, e sua relação com a saúde bucal de pacientes infantis portadores desta doença onco-hematológica, estando eles ou não com mucosite bucal, podendo este estudo contribuir para a gestão das complicações bucais associadas a estes indivíduos.

Como hipótese temos que, durante o tratamento da LLA, com a administração da quimioterapia, há a ocorrência de efeitos colaterais secundários na cavidade bucal, além da alteração do equilíbrio da microbiota bucal, contribuindo assim para a intensificação do processo de mucosite bucal em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Quantificar o HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda e correlacioná-la com as diferentes fases do tratamento quimioterápico.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a graduação da mucosite bucal nos pacientes submetidos ao protocolo terapêutico do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (GBTLI LLA-2009);
- Avaliar expressão e quantificação do HSV-1 nas diversas fases do tratamento quimioterápico, através de PCR em Tempo Real;
- Associar a expressão e quantificação do HSV-1 com a ocorrência de mucosite bucal nas diversas fases do tratamento quimioterápico;
- Verificar a relação entre o HSV-1 e a mucosite bucal.

## **4 PACIENTES E MÉTODOS**

O presente estudo se refere ao desenvolvimento de um projeto de pesquisa realizado no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGO/UFAM), com sede em Manaus/AM, em parceria com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM.

A pesquisa foi realizada com crianças e adolescentes diagnosticados com LLA e tratadas na HEMOAM através do Protocolo Terapêutico do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância GBTLI LLA-2009, onde foi realizada a investigação quantitativa do Herpes vírus simples, especificamente do subtipo HSV-1, e os resultados quantitativos obtidos através da técnica de PCR em Tempo Real foram correlacionados com o grau de mucosite, além do tipo de LLA, sexo e idade do paciente.

### **4.1 Comitê de Ética em Pesquisa**

Este projeto de pesquisa está inserido dentro de um projeto mais amplo intitulado “Análise da Microbiota Bucal de Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda e sua Relação com a Mucosite Bucal”, que foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, através do protocolo CAAE 30934514.9.0000.5020 2014/2015 (Anexo A).

## **4.2. Desenho do estudo**

A Pesquisa consistiu em um estudo epidemiológico do tipo coorte prospectivo, observacional, descritivo.

## **4.3 População de estudo**

A população de estudo foi constituída por crianças e adolescentes com idade entre 1 e 18 anos, de ambos os sexos, diagnosticados com LLA, submetidos a tratamento quimioterápico através do Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância (GBTLI LLA-2009) na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, localizada na Avenida Constantino Nery, Nº 4397, Manaus, Amazonas.

## **4.4 Casuística**

Foram avaliados casos consecutivos de pacientes que deram entrada na HEMOAM no período de março a outubro de 2015.

## **4.5 Critérios de Inclusão**

- Pacientes diagnosticados com LLA;
- Pacientes em fase inicial de tratamento quimioterápico ou que tenham iniciado a prefase da quimioterapia no pronto-socorro onde estavam internados e que em

seguida foram encaminhados à HEMOAM para dar continuidade ao protocolo, sendo a coleta realizada a partir do 8<sup>o</sup> dia da terapia;

- Pacientes que foram submetidos a tratamento através do Protocolo Terapêutico do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica guda GBTLI LLA-2009;
- Pacientes de 1 a 18 anos (Os pacientes foram estratificados em grupos etários: Grupo 1: de 1 a 6 anos; Grupo 2: de 7 a 12 anos e Grupo 3: de 13 a 18 anos);
- Pacientes de ambos os sexos;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o estudo devidamente preenchido e assinado pelo responsável (Apêndice A) e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido devidamente preenchido e assinado pelos pacientes maiores de 14 anos (Apêndice B).

#### **4.6 Critérios de Exclusão**

- Pacientes lactentes menores de 12 meses;
- Pacientes com Síndrome de Down.

#### **4.7 Procedimentos de Pesquisa Clínica**

O paciente incluído no estudo foi inicialmente submetido a uma avaliação clínica da cavidade bucal, seguindo os parâmetros de atendimento preconizados pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM). Esta avaliação inicial teve por finalidade detectar qualquer alteração bucal prévia ao tratamento antineoplásico. Para registrar os dados obtidos nesta primeira avaliação, foi

utilizado um formulário baseado no formulário adotado pela FAO/UFAM (Apêndice C). O exame clínico da mucosa bucal também foi realizado em etapas subsequentes, juntamente com a verificação da presença de mucosite bucal e sua graduação. No momento da avaliação da cavidade bucal foram também coletadas células epiteliais superficiais da mucosa, sobretudo, na prefase e fase de indução da remissão e na consolidação da remissão, além de fases subsequentes do protocolo GBTLI LLA-2009, para que pudesse ser feita uma avaliação da presença do vírus em diferentes etapas do tratamento e correlaciona-la com possíveis alterações na mucosa bucal.

#### 4.7.1- Avaliação e graduação da mucosite bucal nos pacientes com LLA

Os pacientes foram avaliados clinicamente e classificados quanto à presença de mucosite, e sua graduação foi feita de acordo com a Escala de Toxicidade Bucal da Organização Mundial de Saúde, como mostrado no quadro 4. Os pacientes com mucosite graus 1 e 2 da OMS foram classificados como portadores de mucosite moderada e os pacientes com mucosite graus 3 e 4, como portadores de mucosite severa (OTMANI et al., 2011).

Quadro 4. Classificação das mucosites de acordo com a Escala de Toxicidade Bucal da Organização Mundial de Saúde.

<b>Graduação</b>	<b>Sintomas</b>
Grau 0	Sem alterações
Grau 1	Dor e Eritema
Grau 2	Eritemas e úlceras; podendo ainda ingerir alimentos sólidos
Grau 3	Eritema difuso, lesões ulcerativas; requer dieta líquida
Grau 4	Úlceras difusas, tornando a alimentação impossível

Fonte: Adaptado de WHO (1979).

#### *4.7.2 - Coleta das células epiteliais da mucosa bucal*

A coleta foi realizada em diferentes momentos, sendo a primeira antes do início do tratamento quimioterápico, no dia 0, que seria o dia do diagnóstico da LLA, ou ainda, no primeiro dia do tratamento, já considerado prefase, dia D1, portanto relacionados como dias D0 ou D1 (D0/D1). A partir do momento que a terapia foi iniciada, as coletas foram realizadas principalmente na fase de indução, especificamente nos dias D8, D15 e D35, e nas fases subsequentes da terapia, havendo variação nos dias de coleta conforme o subtipo de LLA em que o paciente estava inserido, pois há variação da duração e dos momentos dentro das fases nos diferentes grupos (GBTLI LLA-2009). A escolha destes momentos para coleta se justifica pelo fato de que nestas fases a quimioterapia é mais intensa, com administração de medicamentos que têm importante papel na toxicidade da mucosa bucal. A figura 2 ilustra a abordagem de avaliação clínica e os momentos de realização das coletas nas fases iniciais (prefase + indução da remissão e consolidação da remissão).

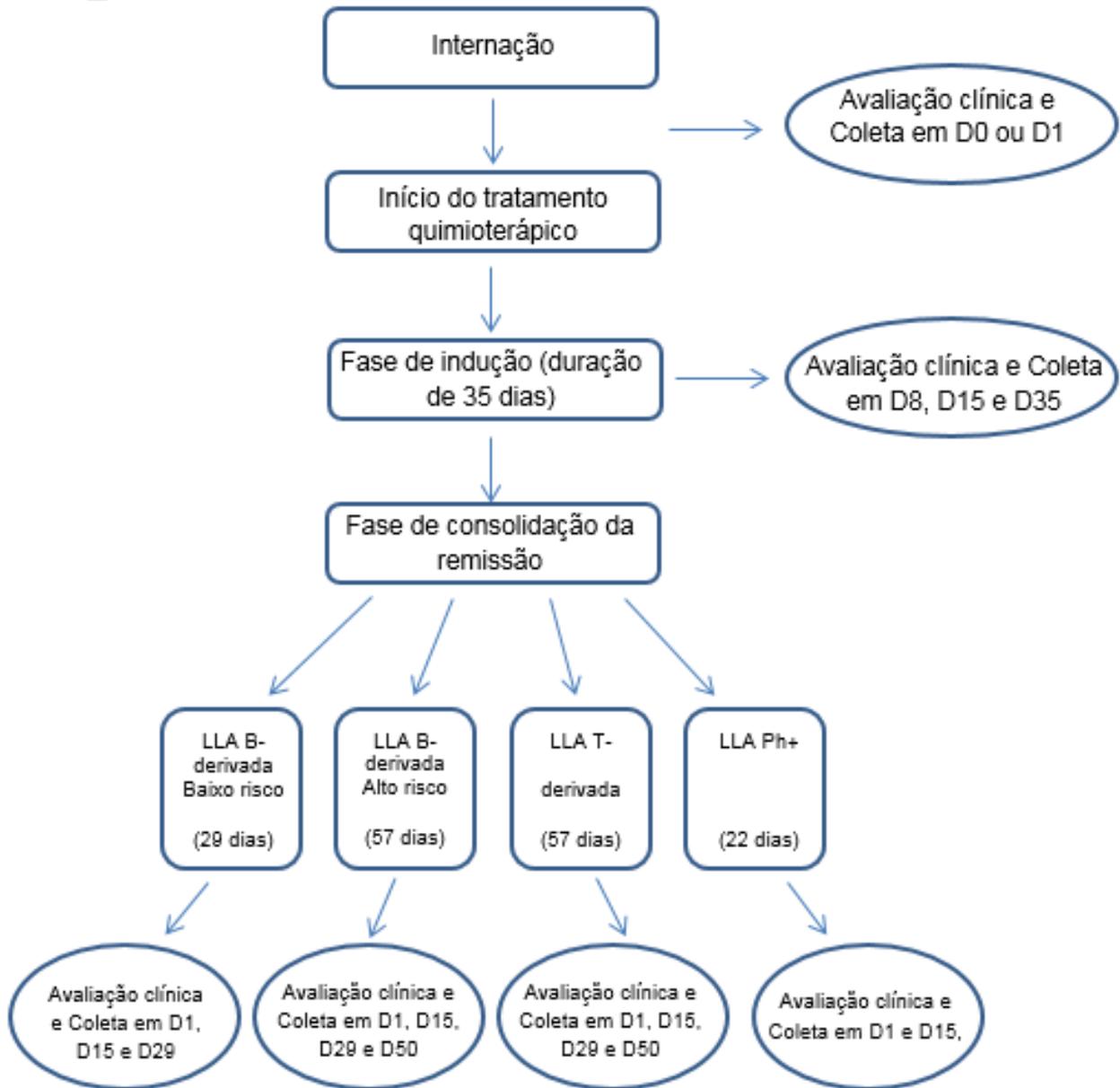


Figura 2. Ilustração da abordagem de avaliação clínica e os momentos de realização das coletas na prefase+indução e na consolidação da remissão. D0= Dia do diagnóstico da LLA; D1= Primeiro dia do tratamento (Prefase); D8= 8<sup>o</sup> dia do tratamento (Indução); D15= 15<sup>o</sup> dia do tratamento (Indução); D35= 35<sup>o</sup> dia do tratamento (Indução); D1= Primeiro dia do tratamento (Consolidação da remissão); D15= 15<sup>o</sup> dia do tratamento (Consolidação da remissão); D29 = 29<sup>o</sup> dia do tratamento (Consolidação da remissão); D50= 50<sup>o</sup> dia do tratamento (Consolidação da remissão).

Antes da coleta do material, foi recomendado que os pacientes realizassem bochecho com água esterilizada para a remoção de possíveis restos alimentares que estivessem presentes. O material foi coletado da mucosa jugal conforme a técnica utilizada por Mendonça (2008), através de escovas cervicais estéreis (Kolplast®

Comercial Industrial do Brasil Ltda.), percorrendo a mucosa jugal desde a região de molares até a região de incisivos.

Depois da coleta, a amostra foi preparada para a detecção da presença do vírus através de PCR, onde o material contido na escova e a própria escova cervical (foi realizado o corte da haste, para que a cabeça da escova fosse armazenada junto ao material coletado, evitando ao máximo a possibilidade de perda) foram transferidos para um tubo de 1,5 mL contendo 500 µL de Tampão TE (Tris HCl na concentração de 10mM + EDTA na concentração de 1mM pH 8,0) e armazenada a uma temperatura de -20 C.

Os dias das avaliações e coletas das células epiteliais da mucosa bucal foram baseados nos dias em que os pacientes passaram por avaliações para os grupos de risco, e estão representados nos quadros 5 a 9.

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

<b>LEUCEMIA B-DERIVADA BAIXO RISCO DE RECIDIVA</b>		
<b>Fases</b>	<b>Dia da Coleta</b>	<b>Número total de dias por fase</b>
<b>Prefase + Indução</b>	<b>D0/D1; D8; D15; D35</b>	35 dias
<b>Consolidação da remissão</b>	<b>D1; D15; D29</b>	29 dias
<b>Intensificação</b>	<b>D8</b>	56 dias
<b>Consolidação Tardia</b>	<b>D29</b>	57 dias
<b>Manutenção</b>	<b>D1</b>	18 meses

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

<b>LEUCEMIA B-DERIVADA ALTO RISCO DE RECIDIVA</b>		
<b>Fases</b>	<b>Dia da Coleta</b>	<b>Número total de dias por fase</b>
<b>Prefase + Indução</b>	<b>D0/D1; D8; D15; D35</b>	35 dias
<b>Consolidação da remissão</b>	<b>D1; D15; D29; D50</b>	57 dias
<b>Intensificação</b>	<b>D15</b>	57 dias
<b>Interfase</b>	<b>D8</b>	57 dias
<b>Consolidação Tardia</b>	<b>D15</b>	57 dias
<b>Manutenção</b>	<b>D1</b>	18 meses

Quadro 7. Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia T-Derivada.

<b>LLA T-DERIVADA</b>		
<b>Fases</b>	<b>Dia da Coleta</b>	<b>Número total de dias por fase</b>
<b>Prefase + Indução</b>	<b>D0/D1; D8; D15; D35</b>	35 dias
<b>Consolidação da remissão</b>	<b>D1; D15; D29; D50</b>	57 dias
<b>Intensificação</b>	<b>D1</b>	57 dias
<b>Interfase</b>	<b>D8</b>	57 dias
<b>Consolidação Tardia</b>	<b>D1</b>	57 dias
<b>Manutenção</b>	<b>D1</b>	18 meses

Quadro 8. Dias selecionados para coleta nos pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda Cromossomo Filadélfia Positivo. Ph+ = Cromossomo Filadélfia Positivo

<b>LLA Ph+</b>		
<b>Fases</b>	<b>Dia da Coleta</b>	<b>Número total de dias por fase</b>
<b>Prefase + Indução</b>	<b>D0/D1; D8; D15; D35</b>	35 dias
<b>Consolidação da remissão</b>	<b>D1; D8; D15</b>	22 dias
<b>Intensificação</b>	<b>D15</b>	57 dias
<b>Consolidação Tardia</b>	<b>D1</b>	57 dias
<b>Manutenção</b>	<b>D1</b>	18 meses

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

Foram coletadas 121 amostras provenientes de 20 pacientes durante o estudo, sendo que destas, 117 foram coletadas da mucosa jugal, conforme a metodologia e 4 amostras foram coletadas diretamente da lesão de alguns dos casos de mucosite.

#### *4.7.3 - Extração do DNA*

As etapas laboratoriais do estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas - FCF-UFAM (extração de DNA) e no Laboratório de Genômica 2 da HEMOAM (PCR em Tempo Real).

O DNA das amostras foi extraído através de kit de extração de DNA viral e/ou kit de extração de DNA genômico. Inicialmente, algumas amostras foram testadas utilizando ambos os kits, onde foram verificados resultados satisfatórios, comprovados pela detecção do vírus na PCR em Tempo Real, evidenciando a qualidade na extração do DNA.

##### 4.7.3.1 Extração do DNA através de kit de DNA viral

A extração do DNA foi realizada conforme metodologia preconizada pelo fabricante do kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit da Invitrogen® (Figura 3), com algumas modificações. Os tubos de 1,5 mL contendo 500µL de Tampão TE, a escova cervical e o material coletado foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, as escovas foram removidas dos tubos com pinça e os tubos submetidos a

leve vortex. Após o período de 10 minutos, foi realizada nova centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos.



Figura 3. Kit de extração de DNA viral utilizado (Kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit da Invitrogen®).

Foram então adicionados 23 $\mu$ L de proteinase K em 500 $\mu$ L de material proveniente de cada paciente. Em seguida, adicionou-se 200 $\mu$ L do Lysis Buffer, sendo submetido ao vortex por 15 segundos e incubado por 15 minutos em banho maria a 56 °C, para ativação da proteinase K. Após este tempo, foram adicionados 220 $\mu$ L de etanol 100% no lisado, novamente submetido ao vortex por 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, transferiu-se o lisado para tubos com colunas, que foram centrifugados a 8000 rpm por 1 minuto. O material da coluna foi transferido para outro tubo e foram adicionados na coluna 500 $\mu$ L de Wash Buffer e centrifugado a 10000 rpm por 1 minuto. Este processo foi repetido mais uma vez, descartando o material depositado na parte inferior das colunas. O material remanescente foi então centrifugado novamente em rotação máxima a 12000 rpm por 1 minuto, sempre descartando o material depositado na parte inferior das colunas. A coluna foi transferida para um eppendorf estéril, onde foi adicionado 75 $\mu$ L de RNase-

Free Water no centro da coluna, aquecida a 70°C para facilitar a remoção do DNA da membrana. Em seguida, a coluna foi incubada em temperatura ambiente por 1 minuto. Foi feita então a centrifugação em 12000 rpm por 1 minuto. Após esta etapa, o material purificado foi estocado em freezer a -80°C A Figura 4 ilustra o processo realizado para a extração do DNA das amostras.

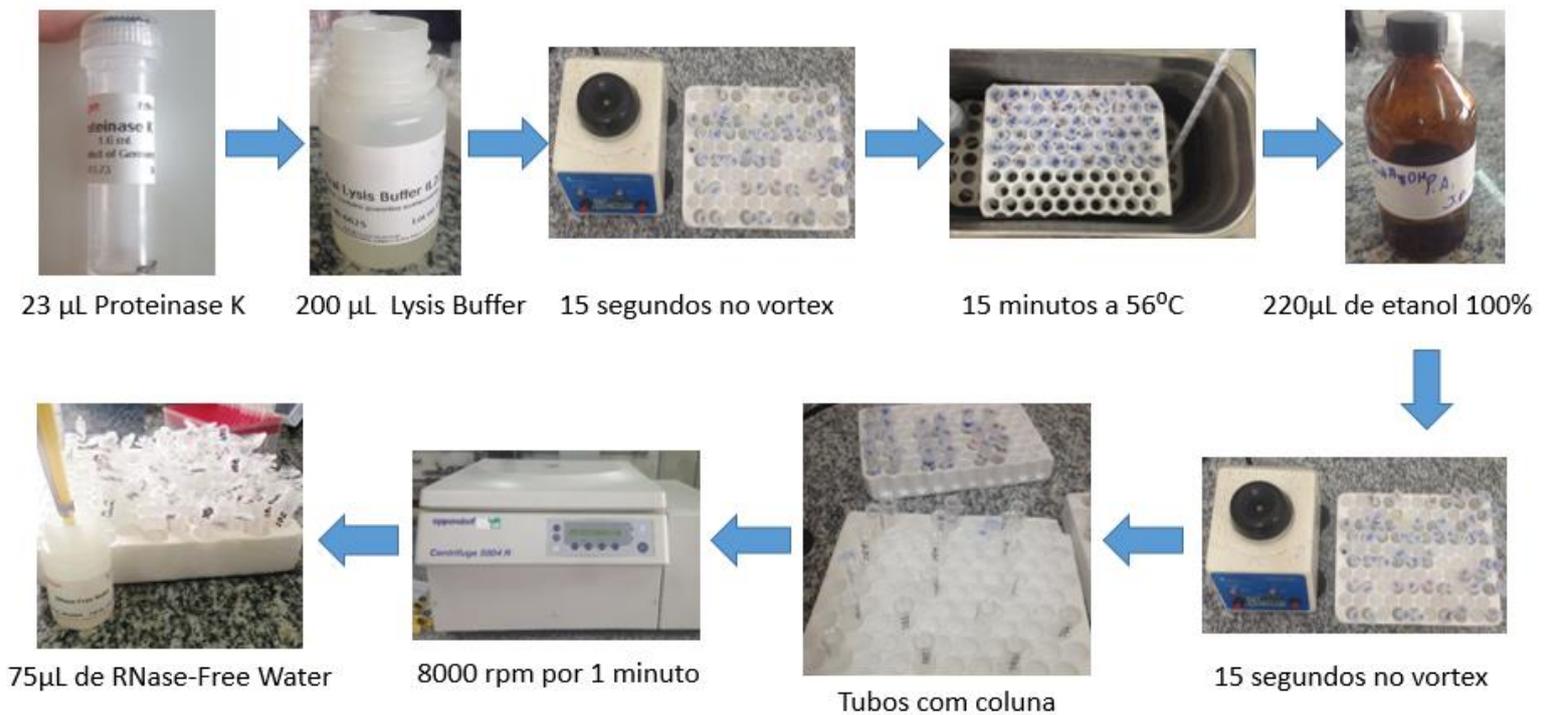


Figura 4. Ilustração esquemática mostrando a extração do DNA utilizando o kit PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit da Invitrogen®

#### 4.7.3.2 Extração do DNA através de kit de DNA genômico

A extração do DNA utilizando kit de extração de DNA genômico foi realizada com o kit HiYield Genomic DNA Mini kit da BioAmerica (Figura 5), seguindo as orientações do fabricante, com algumas modificações.

Os tubos de 1,5 mL contendo 500µL de Tampão TE, a escova cervical e o material coletado foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 700 µL de RBC Lysis Buffer, as escovas removidas do tubo com uma pinça e os tubos submetidos a leve vortex.



Figura 5. Kit de extração de DNA genômico utilizado (Kit HiYield Genomic DNA Mini kit da BioAmerica).

Após o período de 10 minutos, foi realizada nova centrifugação a 12000 rpm por 2 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200µL de GB Buffer e 25µL de proteinase K nos tubos, sendo submetidos posteriormente ao vortex e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, antes de serem levados ao banho maria a 56°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados etanol 100% no lisado e agitado em vortex. Em seguida, este conteúdo foi transferido para as colunas e centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos. O conteúdo que ficou embaixo das colunas foi descartado e então foi acrescentado 300µL de W1 Buffer, centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto e o conteúdo da parte debaixo da coluna foi descartado novamente. Em seguida, foram adicionados 600µL de Wash Buffer, centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto e novamente descartado o que passou pela membrana da coluna. Foi realizada uma nova centrifugação a 13000 rpm por 3 minutos e depois adicionados 100µL de RNase Free Water e centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto. O processo foi repetido por mais uma vez e após esta etapa, o material purificado foi estocado em freezer a -80°C.

#### 4.7.4 - Qualidade do DNA

Para verificar a qualidade do DNA extraído, foi utilizado o gene da  $\beta$ -globina, que é um par de oligonucleotídeos designado a amplificar um produto constitutivo comum a todas as células. Ele foi usado para demonstrar a extração adequada dos ácidos nucleicos, permitindo que fossem excluídos possíveis resultados falso-negativos. As condições para a reação da PCR do gene da  $\beta$ -globina foram as mesmas utilizadas para a reação da PCR em tempo real do HSV-1. O oligonucleotídeo da  $\beta$ -globina está representado na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos da  $\beta$ -globina.

	Oligo-nucleotídeos	Sequência (5' → 3')	Região no genoma	Fragmento (pb)
$\beta$ -globina	PCO3	CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC	Região exônica do gene	123
	PCO4	TCACCACCAACTTCATCCAGCTTCACC		

Fonte: Adaptado de MENDONÇA (2008). (pb) número de pares de base do fragmento; C, citosina; T, timina; G, guanina; A, adenina.

#### 4.7.5 - Verificação da presença do DNA homólogo do HSV-1

A presença e a quantificação do HSV-1 nas células da mucosa bucal foram verificadas através da técnica de PCR em Tempo Real.

##### 4.7.5.1 Controle positivo para a reação

A amostra utilizada como controle positivo para a reação da PCR em Tempo Real foi gentilmente cedida pelo cirurgião-dentista Dr. Lioneu Cabral. Tal amostra foi

coletada da cavidade bucal de paciente diagnosticado clinicamente com herpes labial. A coleta se deu seguindo a mesma metodologia empregada na coleta das amostras dos pacientes com LLA, utilizando-se escovas cervicais Kolplast®, que foram inseridas em tubos de 1,5 mL contendo Tampão TE para a conservação do DNA. Foram coletadas amostras de quatro sítios da cavidade bucal do paciente portador com herpes. Além da mucosa jugal direita e esquerda, foram coletadas uma amostra da lesão, localizada em lábio, e uma amostra da saliva. Após a coleta, as amostras foram imediatamente acondicionadas em refrigerador e posteriormente transportadas em recipiente térmico para ser refrigerado a -20°C. Como controle negativo da reação, foi utilizada água juntamente com os reagentes.

#### 4.7.5.2 Amplificação e Quantificação do DNA do HSV-1

Para a detecção e quantificação do HSV-1, foi realizada a metodologia *TaqMan*® de PCR em Tempo Real utilizando o equipamento automatizado *StepOne Plus Real System* (Life Technologies, Foster City, CA) (Figura 6). A técnica empregada permite a amplificação simultânea à quantificação, além de mínimo risco de contaminação cruzada e menor tempo para obtenção do resultado.



Figura 6. Equipamento automatizado *StepOne Plus Real System* (Life Technologies, Foster City, CA) utilizado na técnica de PCR em Tempo Real.

Para a detecção do produto, o método utilizado foi o *HSV1 Q - PCR Alert kit*, o qual amplifica especificamente a região do gene codificante a glicoproteína D (gpD) de HSV-1 e uma região do gene humano codificante para beta-Globina, sendo esta, o controle interno de idoneidade da amostra do estudo. Cada oligonucleotídeos primers para HSV-1 são específicos para uma região do gene codificante a gpD de HSV-1 (região US6). Os oligonucleotídeos primers para o controle interno de idoneidade da amostra são específicos para a região promotora e 5'UTR do gene humano codificante para beta-Globina.

O procedimento se deu através de uma sonda específica para HSV-1 marcada com o fluoróforo FAM que foi ativada quando hibridizada com o produto específico da reação de amplificação para HSV-1. Outra sonda específica para o gene humano da  $\beta$ -globina marcada com o fluoróforo VIC foi ativada quando hibridizada com o produto da reação de amplificação para o gene humano da  $\beta$ -globina. Durante a PCR em Tempo

Real, à medida que os ciclos da reação ocorrem, a sonda específica hibridiza com a sequência alvo da fita simples de DNA. A emissão da fluorescência e, portanto, sua detecção, aumenta com a amplificação dos produtos específicos da reação de amplificação. Esta fluorescência é então detectada e registrada pelo equipamento automático. A elaboração dos dados permite determinar a presença e a titulação do DNA de HSV-1 na amostra. Quando a fluorescência gerada pela sonda atinge um limiar acima da fluorescência basal da reação, o equipamento correlaciona qual ciclo ocorreu e, conjuntamente com os dados obtidos pela curva padrão, a qual é realizada concomitantemente a reação, permite a quantificação do DNA da amostra. O ponto do ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial e que permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência é denominado de *Cycle Threshold* (Ct).

Os outros reagentes necessários para a análise qualitativa e quantitativa da amostra são abaixo citados (Figura 7):

- PCR Alert AmpliMASTER» (código RTS000), mistura de reagentes otimizados, microplacas (Figura 8) e lâminas adesivas para a amplificação real time;
- HSV1 Q - PCR Alert AmpliPROBE» (código RTS031-P), sondas fluorescentes FAM e VIC para amplificação real time.
- HSV1 / HSV2 - Positive Control» (código CTR03), controlo positivo de DNA plasmídico;
- HSV1 - PCR Standard» (código STD031), DNA plasmídico a quantidade reconhecida para obter a curva padrão.



Figura 7. Reagentes que compõem o *HSV1 Q - PCR Alert kit* necessários para a análise qualitativa e quantitativa das amostras, através da técnica de PCR em Tempo Real.



Figura 8. Microplaca com 96 poços utilizada para a realização da técnica de PCR em Tempo Real.

#### 4.7.5.3 Curva padrão

Dos dois tipos de curva padrão existentes, foi utilizada a curva Absoluta, a qual se baseia em padrões previamente conhecidos (HSV1 - PCR Standard).

A determinação do número de cópias pela PCR em Tempo Real é realizada se baseando na curva padrão que consistiu de alíquotas com concentrações conhecidas

do HSV-1. A amplificação e detecção da curva padrão foram realizadas intercalando a amplificação das amostras que se quis quantificar.

O propósito de se utilizar uma curva padrão foi obter a correlação dos valores de absorvância e concentração. Desta forma, foi possível confirmar e verificar a linearidade da reação, calculando o fator de conversão de valores de absorvância em concentração.

#### 4.7.5.4 Otimização da curva padrão

Para a determinação da titulação do DNA nas amostras de partida, foi necessário preparar uma série de reações com o Q - PCR Standard ( $10^5$  cópias,  $10^4$  cópias,  $10^3$  cópias e  $10^2$  cópias).

A figura a seguir ilustra, a título de exemplo, a organização da análise de 11 amostras (Figura 9).

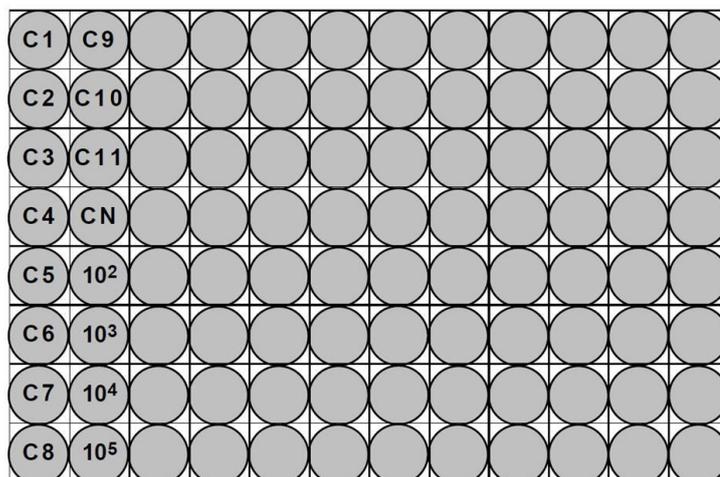


Figura 9. Ilustração mostrando a organização da análise de 11 amostras. Legenda: C1 - C11: Amostras para analisar; CN: Controle negativo de amplificação; 10<sup>2</sup>: Standard 10<sup>2</sup> cópias; 10<sup>3</sup>: Standard 10<sup>3</sup> cópias; 10<sup>4</sup>: Standard 10<sup>4</sup> cópias; 10<sup>5</sup>: Standard 10<sup>5</sup> cópias.

O Quadro 9 demonstra a programação dos ciclos utilizados na PCR em Tempo Real.

Quadro 9. Demonstração da programação dos ciclos utilizados na PCR em Tempo Real.

Ciclo térmico		
Fase	Temperaturas	Tempos
Descontaminação	50° C	2 min.
Desnaturação inicial	95° C	10 min.
Amplificação e detecção (45 ciclos)	95° C	15 seg.
	60° C (aquisição da fluorescência)	45 seg.
	72° C	15 seg.

#### 4.7.5.5 Avaliação da curva padrão

Neste trabalho, a metodologia de PCR em Tempo Real utilizou o *Threshold Cycle* (Ct) como parâmetro usado para quantificação de PCR. Os valores de Ct avaliaram o ponto do início na amplificação da curva padrão e todas as amostras do estudo. A curva padrão é demonstrada abaixo contendo os valores de Ct de cada diluição e das amostras. O software do equipamento calcula por regressão linear e define o melhor ajuste entre os pontos da curva padrão (Figuras 10 e 11).

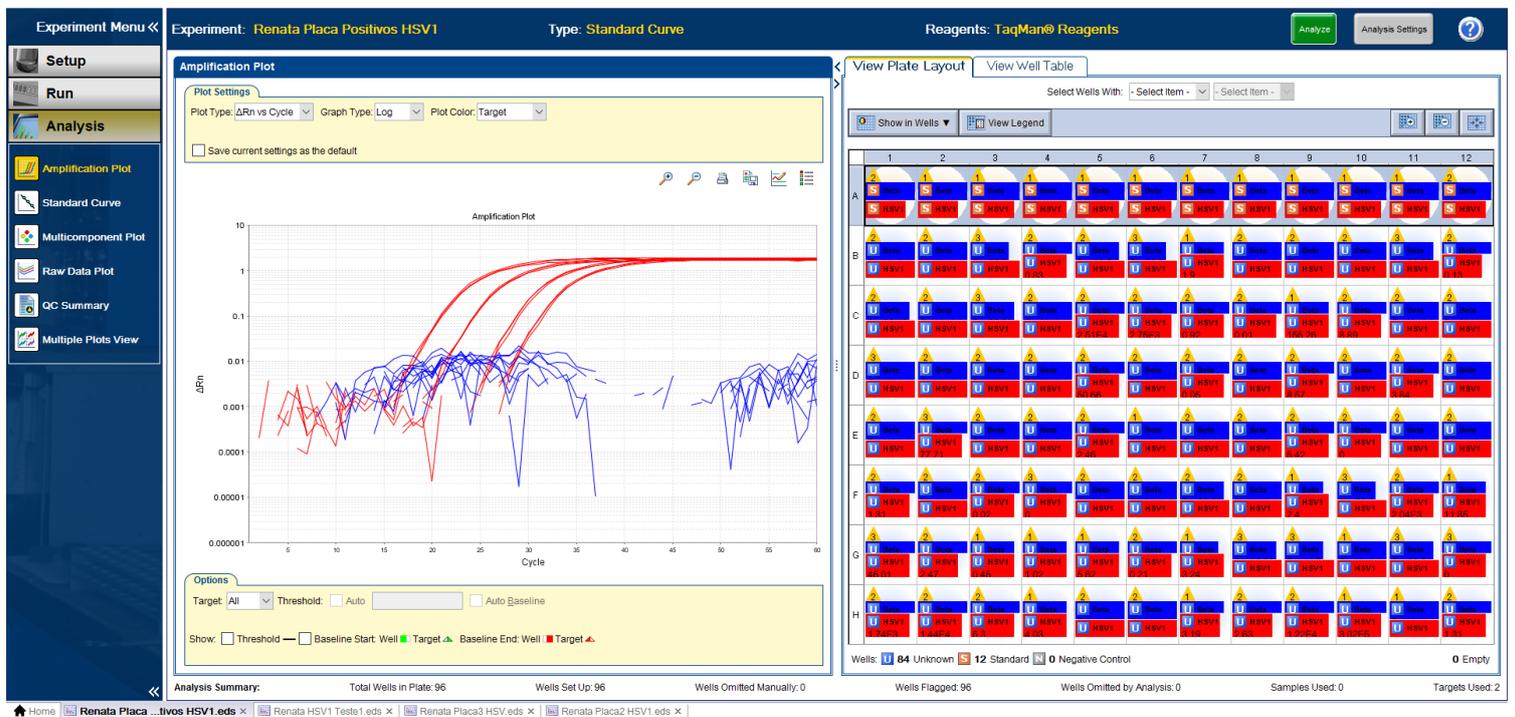


Figura 10. Curva padrão obtida a partir do KIT HSV1 Q - PCR Alert kit das diluições seriadas do HSV1 - PCR Standard variando de  $10^2$  a  $10^5$  cópias/uL. Gráficos gerados pelo Software StepOne Plus (Applied Biosystem).

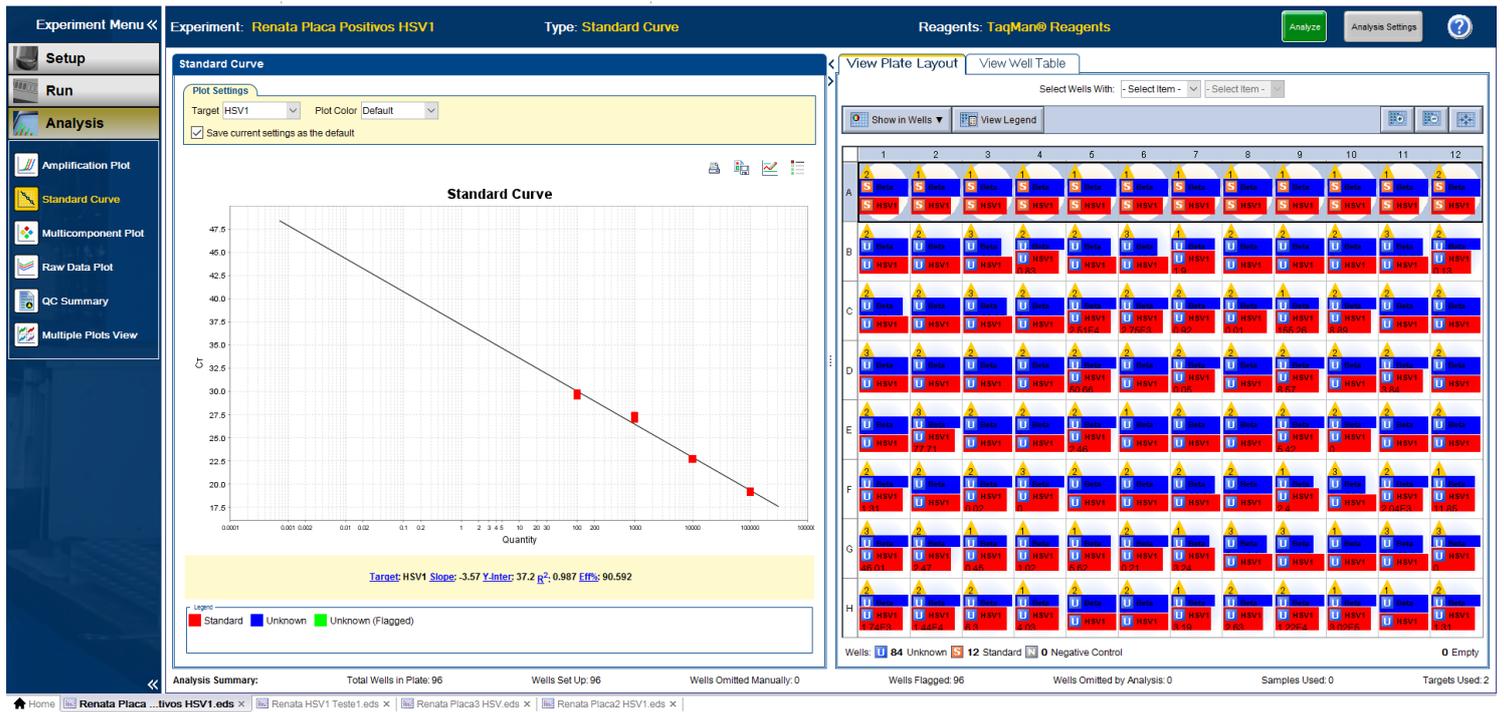


Figura 11. Regressão linear da curva padrão ( $R^2 = 0,991$ ). Gráficos gerados pelo Software StepOne Plus (Applied Biosystem).

#### 4.7.5.6 Sensibilidade e reprodutibilidade

O limite mínimo de detecção foi definido como o número mínimo de cópias que podem ser detectadas em cada teste, determinado pela última diluição possível de ser detectada pelo equipamento na PCR em Tempo Real.

Para avaliar a reprodutibilidade da curva padrão desenvolvida, foi realizada a análise da variação inter-ensaio. Neste tipo de variação, a curva foi testada em duplicata, durante três dias consecutivos, por duas pessoas diferentes (Quadro 10 e Figura 12).

Quadro 10. Valores de *Ct* obtidos em quatro corridas na PCR em Tempo Real. Legenda: *Ct*= *threshold cycle*; DP=Desvio Padrão; CV= Coeficiente de Variação.

<b>CURVA PADRÃO</b>	<b>Ct</b>	<b>Ct</b>	<b>Ct</b>	<b>Ct</b>	<b>Ct</b>	<b>Ct</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>CV</b>
<b>CÓPIA/ REAÇÃO</b>	<b>curva</b>	<b>curva</b>	<b>curva</b>	<b>curva</b>	<b>curva</b>	<b>curva</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>			
10 <sup>5</sup>	19,30	19,25	19,89	19,25	18,92	19,25	19,31	0,32	1,65
10 <sup>4</sup>	22,70	21,70	21,75	22,01	22,06	22,54	22,13	0,41	1,86
10 <sup>3</sup>	27,03	26,52	27,44	27,36	27,90	27,22	27,25	0,46	1,68
10 <sup>2</sup>	29,81	29,64	29,55	29,64	29,56	29,64	29,64	0,09	0,31

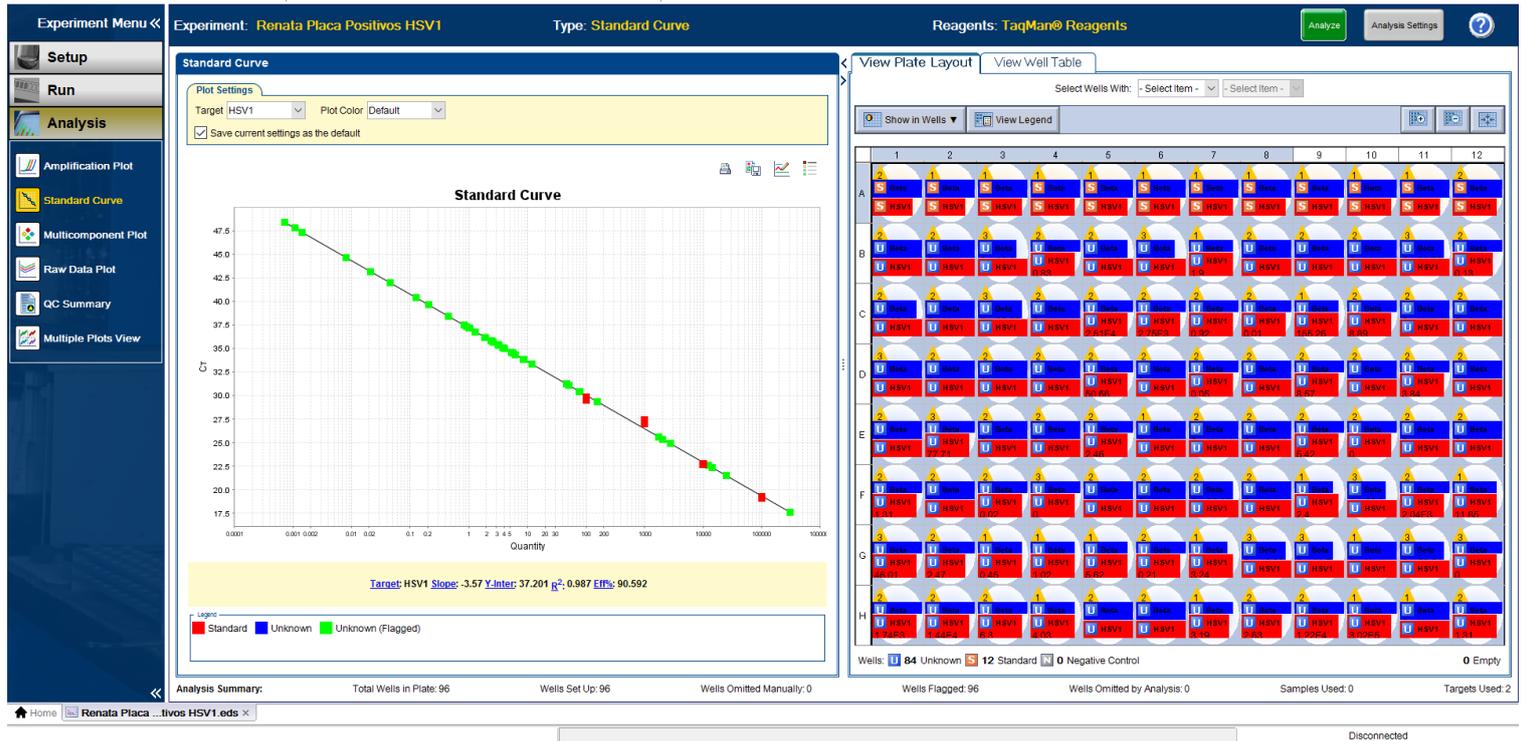


Figura 12. Regressão linear da curva padrão com amostras positivas. Gráficos gerados pelo Software StepOne Plus (Applied Biosystem).

#### 4.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados usando-se o programa GraphPad Prism versão 6.0. Para comparação de cargas virais em relação as diferentes fases do tratamento quimioterápico e aspectos clínicos, utilizou-se os testes não paramétricos **Mann Whitney two tailed test** na comparação de dois grupos e **Kruskal Wallis test** na comparação de três ou mais grupos, visto que os dados apresentaram distribuição heterogênea. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das amostras e detecção do HSV-1

Foram avaliados 20 pacientes provenientes da Fundação HEMOAM, diagnosticados com LLA, com idade entre 1 e 17 anos, de ambos os sexos e submetidos a tratamento quimioterápico através do Protocolo GBTLI LLA-2009. Os pacientes foram incluídos no estudo no período de março a outubro de 2015 e seguidos até novembro de 2015. Dados referentes a esses pacientes estão ilustrados na Tabela 3 (Anexo B).

Do total de pacientes avaliados, 50% eram do sexo masculino e 50% do sexo feminino. Em relação à idade, 80% dos pacientes se enquadraram no grupo 1 (de 1 a 6 anos), 10% no grupo 2 (7 a 12 anos) e 10% no grupo 3 (13 a 18 anos). Setenta e cinco por cento dos pacientes foi diagnosticado com LLA do tipo B de baixo risco e 25% com LLA do tipo B de alto risco de recaída. As manifestações bucais encontradas foram basicamente lábios ressecados (15%) e mucosite bucal (35%) (Figura 13).

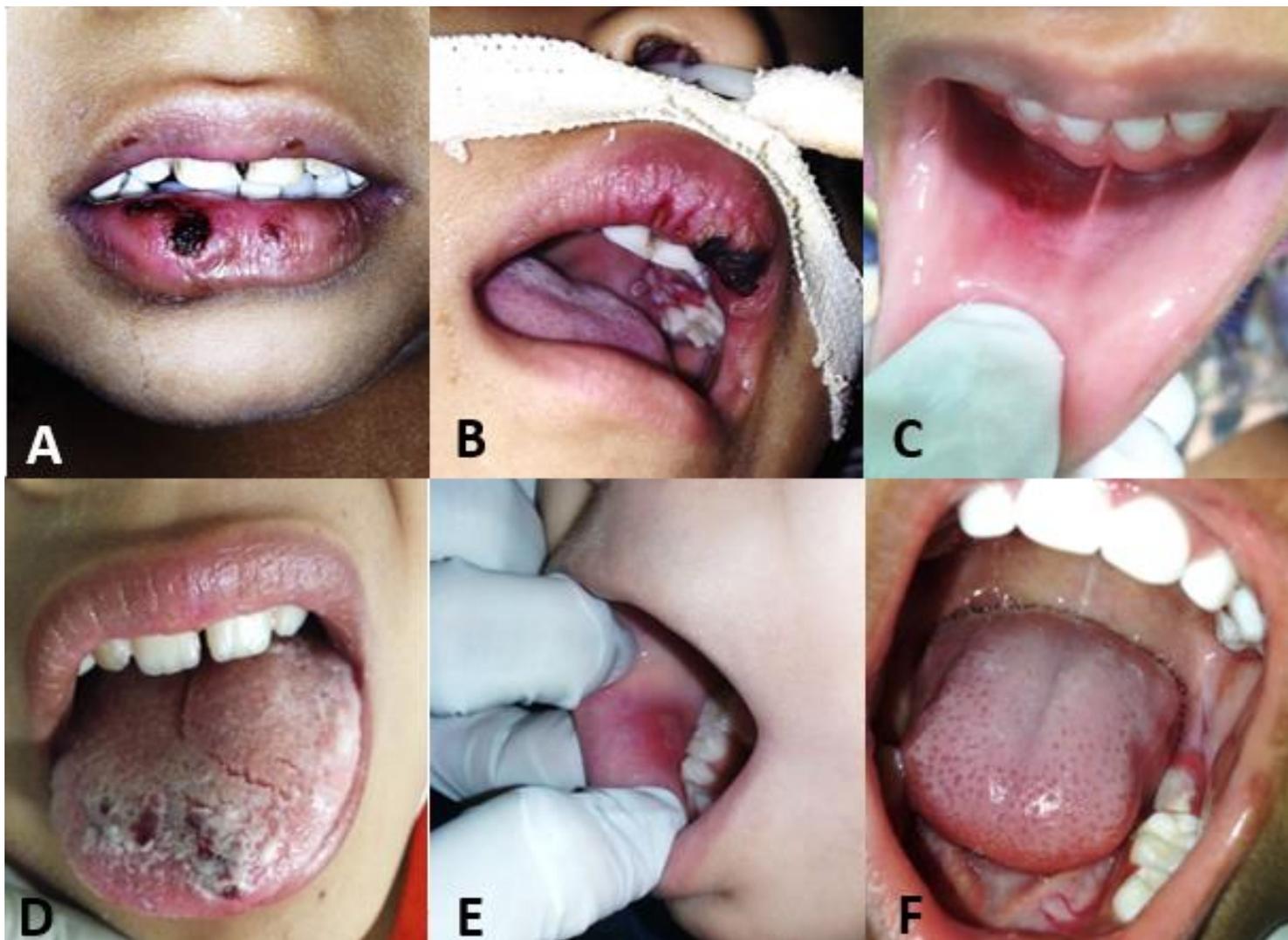


Figura 13. Mucosite bucal durante o tratamento quimioterápico. As lesões foram observadas em diversas localizações da cavidade bucal: A: Lábios; B: Lábios e gengiva; C: Mucosa labial; D: Língua; E: Mucosa Jugal; F: Região Retromolar.

Em relação à detecção viral, verificou-se a presença do HSV-1 na mucosa bucal de 80% dos pacientes em algum momento do tratamento quimioterápico. Distribuição dos dados referentes a sexo, idade, tipo de LLA, manifestações bucais e presença do HSV-1 nesses pacientes estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição dos dados de acordo com o sexo, idade, tipo de LLA, manifestações bucais e presença de HSV1 nos diferentes momentos de cada fase do tratamento quimioterápico.

<b>Características Clínicas</b>	<b>Número de casos (n=20)</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	10	50%
Feminino	10	50%
<b>Idade</b>		
Grupo 1 (1-6 anos)	16	80%
Grupo 2 (7-12 anos)	02	10%
Grupo 3 (13 a 18 anos)	02	10%
<b>LLA</b>		
B Baixo Risco	15	75%
B Alto Risco	05	25%
T – derivada	0	0
Ph+	0	0
<b>Manifestações Bucais</b>		
<b>Lábios Ressecados</b>		
Sim	03	15%
Não	17	85%
<b>Mucosite</b>		
Sim (Casos)	07	35%
Sim (Episódios)	08	40%
Não (Casos)	13	65%
<b>Presença de HSV-1</b>		
<b>Prefase + Indução</b>		
D0/D1	8/16	50%
D8	6/20	30%
D15	9/20	45%
D35	6/17	35.3%
Dados consolidados	16/20	80%
<b>Consolidação da Remissão</b>		
D1	3/10	30%
D15	3/10	30%
D29	4/10	40%
D50 (B alto risco)	1/5	20%
Dados consolidados	7/13	53.8%
<b>Intensificação</b>		
D8 (B baixo risco)	3/6	50%
D15 (B alto risco)	2/2	100%
Dados consolidados	5/8	62,5%
<b>Interfase</b>		
D8 (B alto risco)	1/2	50%
Dados Consolidados	1/2	50%
<b>Consolidação Tardia</b>		
D29	1/2	50%
Dados Consolidados	1/2	50%
<b>Manutenção</b>		
D1	0/2	0
Dados Consolidados	0/2	0

Mais especificamente em relação a mucosite bucal, sete pacientes desenvolveram a lesão ao longo do estudo, representando 35% da amostra total (n=20), sendo que um deles, apresentou a lesão logo no início do tratamento (D0/D1).

Dos seis pacientes que apresentaram mucosite pós-quimioterapia propriamente dita, 66.7% apresentaram a lesão na prefase/indução. Distribuição dos dados dos pacientes com mucosite estão apresentados na Tabela 5 e dados completos na Tabela 6 (Anexo C).

Tabela 5. Distribuição dos dados de mucosite bucal de acordo com a ocorrência, sexo, idade, tipo de LLA, localização, graduação da OMS, classificação segundo Otmani et al (2011) e presença de HSV-1 nos diferentes momentos de cada fase do tratamento quimioterápico em que o paciente se encontrava.

<b>Mucosite</b>	<b>Número de episódios (n=8)</b>	<b>Porcentagem</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	02/07	28,6%
Feminino	05	71,4%
<b>Idade</b>		
Grupo 1 (1 a 6 anos)	06/07	85,7%
Grupo 2 (7 a 12 anos)	01	14,3%
Grupo 3 (13 a 18 anos)	0	0
<b>LLA</b>		
B baixo risco	06/07	85,7%
B alto risco	01	14,3%
<b>Localização (n=8)</b>		
Lábio e Mucosa Labial	03	37,5%
Mucosa Jugal	02	25%
Língua	01	12,5%
Gengiva	01	12,5%
Retromolar	01	12,5%
<b>Graduação (OMS) (n=8)</b>		
Grau 1	01	12,5%
Grau 2	04	50%
Grau 3	03	37,5%
Grau 4	0	0
<b>Classificação (Otmani, 2008) (n=8)</b>		
Mucosite moderada	05	62,5%
Mucosite severa	03	37,5%
<b>Ocorrência da mucosite por fase</b>		
<b>Prefase/Indução (B baixo risco)</b>		
D0/D1	01	12,5%
D8	02	25%
D15	01	12,5%
D35	02	25%
Dados Consolidados	06	75%
<b>Intensificação (B baixo risco)</b>		
D8	01	12,5%
Dados Consolidados	01	12,5%
<b>Interfase (B baixo risco)</b>		
D8	01	12,5%
Dados Consolidados	01	12,5%
<b>Presença do HSV-1 por fase</b>		
<b>Prefase/Indução (B baixo risco)</b>		
D0/D1	01	12,5%
D8	01	12,5%
D15	01	12,5%
D35	01	12,5%
Dados Consolidados	04	50%
<b>Intensificação (B baixo risco)</b>		
D8	01	12,5%

Dados Consolidados	01	12,5%
<b>Interfase</b> (B baixo risco)		
D8	01	12,5%
Dados Consolidados	01	12,5%

## 5.2 Quantificação do HSV-1

Os valores da quantificação do HSV-1 nas amostras coletadas da mucosa jugal dos 20 pacientes estudados, tanto de maneira consolidada quanto agrupada de acordo com o tipo de leucemia (B de baixo risco ou B de alto risco de recaída) estão apresentados nas Tabelas 7, 8 e 9. (Anexos D-F).

Foi analisada a relação da carga viral do HSV-1 entre dois grupos de amostras nas diversas combinações possíveis ao longo do tratamento quimioterápico (Mann Whitney test) e entre 3 ou mais grupos dentro de cada fase e ao longo do tratamento (Kruskal Wallis test) a fim de verificar se há predominância do vírus em determinada fase do tratamento e se a carga viral teria relação com a incidência de mucosite bucal. Essas análises foram realizadas considerando-se as seguintes situações:

### 5.2.1 – Correlação nos casos consolidados de Leucemia Linfoblástica Aguda B (LLA B)

Foram realizadas análises estatísticas primeiramente levando em consideração toda a amostra, comparando-se os dados de cada momento dois a dois dentro da prefase/indução e separadamente dentro consolidação da remissão (Quadro 11). Em seguida, cada uma dessas fases foi ainda analisada de maneira agrupada considerando-se todos os momentos dentro da respectiva fase (Quadro 12). Com bases nessas análises não foi evidenciada nenhuma diferença estatística em relação a distribuição da carga viral ao longo do tempo na prefase/indução e consolidação da remissão no grupo de pacientes com LLA analisados de maneira consolidada. As

Figuras 14 e 15 ilustram a quantificação absoluta obtida dos dados consolidados de todos os pacientes na prefase/indução e consolidação da remissão, respectivamente.

Quadro 11. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os Casos consolidados de LLA. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1 vs D8 p-value	D0/D1 vs D15 p-value	D0/D1 vs D35 p-value	D8 vs D15 p-value	D8 vs D35 p-value	D15 vs D35 p-value
Prefase/Indução	0,27	0,30	0,31	0,68	0,89	0,96
	D1 vs D15 p-value	D1 vs D29 p-value	D1 vs D50 p-value	D15 vs D29 p-value	D15 vs D50 p-value	D29 vs D50 p-value
Consolidação da Remissão	0,94	0,80	0,64	0,52	0,77	0,45

Quadro 12. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os Casos consolidados de LLA. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1	D8	D15	D35
Prefase/Indução	p-value: 0.60			
	D1	D15	D29	D50
Consolidação da Remissão	p-value: 0,85			

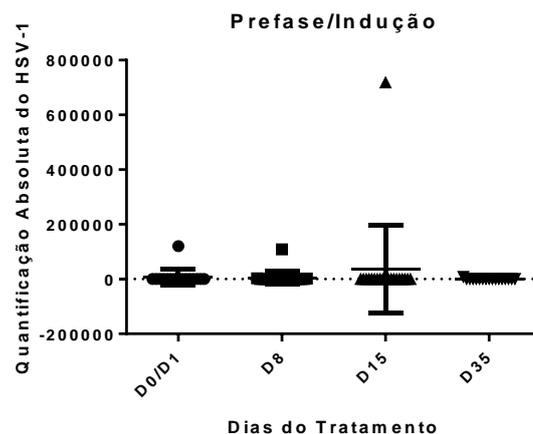


Figura 14. Quantificação absoluta da carga viral de todos os pacientes do estudo em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução. D = Dias.



As Figuras 16 e 17 ilustram a quantificação absoluta do HSV-1 obtida nos pacientes com LLA B BR na prefase/indução e consolidação da remissão.

Quadro 13. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B BR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1 vs D8 p-value	D0/D1 vs D15 p-value	D0/D1 vs D35 p-value	D8 vs D15 p-value	D8 vs D35 p-value	D15 vs D35 p-value
Prefase/Indução	0,20	0,24	0,43	0,50	0,59	0,85
	D1 vs D15 p-value	D1 vs D29 p-value	D15 vs D29 p-value			
Consolidação da Remissão	0,62	0,92	0,70			

Quadro 14. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B BR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1	D8	D15	D35
Prefase/Indução	p-value: 0,49			
	D1	D15	D29	
Consolidação da Remissão	p-value: 0,83			

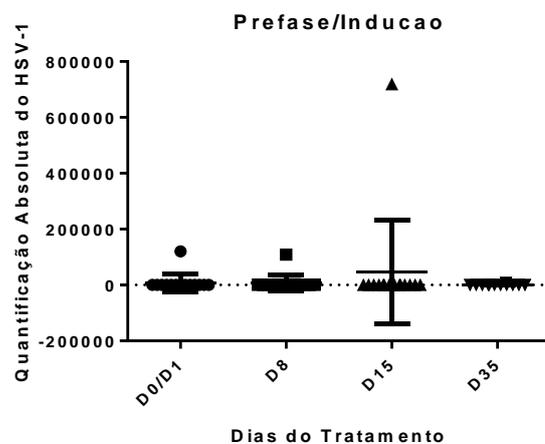


Figura 16. Figura A. Quantificação absoluta da carga viral para os pacientes com LLA B BR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução. D = Dias.

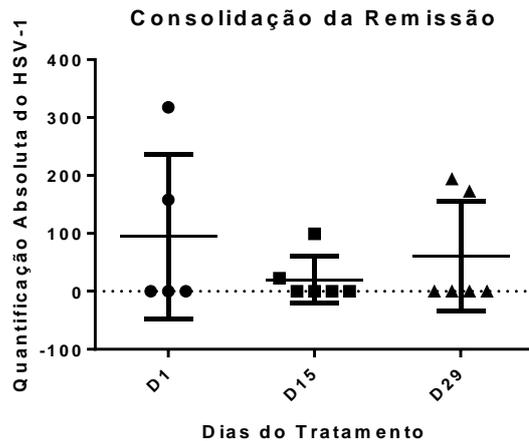


Figura 17. Quantificação absoluta da carga viral os pacientes com LLA B BR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na consolidação da remissão. D = Dias.

A relação entre a carga viral do HSV-1 também foi avaliada em combinações isoladas ao longo do tratamento quimioterápico dos pacientes com LLA B BR. Dessa maneira, considerou-se momentos isolados de cada fase (Prefase/Indução: D0/D1, D8, D15 e D35, Consolidação da Remissão: D1, D15 e D29, Intensificação: D8, Consolidação Tardia: D29 e Manutenção: D1) em relação as demais fases (Quadro 15).

Em seguida, foi realizada uma análise agrupada considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (Quadro 16). Com bases nessas análises não foi evidenciada nenhuma diferença estatística em relação a distribuição da carga viral nos diferentes dias ao longo do tratamento nos pacientes com LLA B BR. A Figura 18 ilustra a quantificação absoluta do HSV-1 obtida nos pacientes com LLA B BR em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias.

Quadro 15. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando momentos isolados da prefase/indução (P/I) e da consolidação da remissão (CR) (coluna pintada de cinza claro) em relação as demais fases do tratamento nos pacientes com LLA B BR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus; IN= intensificação; CT= consolidação tardia; M= manutenção.

<b>Prefase/Indução (P/I)</b>	<b>D0/D1 vs demais fases isoladas</b>	D0/D1 (P/I) Vs D1 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D15 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D29 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D8 (IN)	D0/D1 (P/I) Vs D29 (CT)	D0/D1 (P/I) Vs D1 (M)
	p-value	0.60	0.12	0.32	0.71	0.46	0.37
	<b>D8 vs demais fases isoladas</b>	D8 (P/I) Vs D1 (CR)	D8 (P/I) Vs D15 (CR)	D8 (P/I) Vs D29 (CR)	D8 (P/I) Vs D8 (IN)	D8 (P/I) Vs D29 (CT)	D8 (P/I) Vs D1 (M)
	p-value	0.89	>0.99	0.97	0.53	>0.99	0.90
	<b>D15 vs demais fases isoladas</b>	D15 (P/I) Vs D1 (CR)	D15 (P/I) Vs D15 (CR)	D15 (P/I) Vs D29 (CR)	D15 (P/I) Vs D8 (IN)	D15 (P/I) Vs D29 (CT)	D15 (P/I) Vs D1 (M)
	p-value	0.93	0.70	0.83	0.71	>0.99	0.47
	<b>D35 vs demais fases isoladas</b>	D35 (P/I) Vs D1 (CR)	D35 (P/I) Vs D15 (CR)	D35 (P/I) Vs D29 (CR)	D35 (P/I) Vs D8 (IN)	D35 (P/I) Vs D29 (CT)	D35 (P/I) Vs D1 (M)
	p-value	>0.99	0.48	0.89	0.84	0.82	0.51
<b>Consolidação da Remissão (CR)</b>	<b>D1 vs demais fases isoladas</b>	D1 (CR) vs D8 (IN)	D1 (CR) vs D29 (CT)	D1 (CR) vs D1 (M)			
	p-value	0.84	>0.99	0.76			
	<b>D15 vs demais fases isoladas</b>	D15 (CR) vs D8 (IN)	D15 (CR) vs D29 (CT)	D15 (CR) vs D1 (M)			
	p-value	0.39	>0.99	0.79			
	<b>D29 vs demais fases isoladas</b>	D29 (CR) vs D8 (IN)	D29 (CR) vs D29 (CT)	D29 (CR) vs D1 (M)			
	p-value	0.55	>0.99	0.79			

Quadro 16. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias nos pacientes com LLA B BR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fases do Tratamento (LLA Baixo Risco)										
Prefase/Indução (P/I)				Consolidação da Remissão (CR)			Intensificação (I)	Consolidação Tardia (CT)	Manutenção (M)	
D0/D1	D8	D15	D35	D1	D15	D29	D8	D29	D1	
p-value: 0.83										

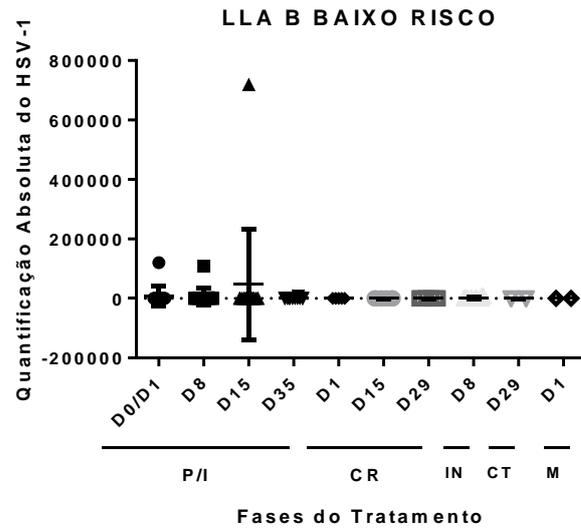


Figura 18. Quantificação absoluta da carga viral em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (D) nos pacientes com LLA B BR. D= Dias do tratamento quimioterápico. P/I = prefase/indução. CR = consolidação da remissão. IN = intensificação. CT = consolidação tardia, M = manutenção.

#### 5.2.2.1- Correlação nos episódios de Mucosite Bucal

A relação entre a carga viral do HSV-1 nos diferentes momentos da prefase/indução (D0/D1, D8, D15 e D35) e separadamente dentro dos diferentes momentos da consolidação da remissão (D1, D15 e D29) dos pacientes com mucosite bucal foi avaliada (Quadro 17). Em seguida, cada uma dessas fases foi ainda analisada de maneira agrupada considerando-se todos os momentos dentro da respectiva fase (Quadro 18). Com bases nessas análises não foi evidenciada nenhuma diferença estatística em relação a distribuição da carga viral ao longo da prefase/indução e consolidação da remissão no grupo de pacientes com mucosite bucal. As Figuras 19 e 20 ilustram a quantificação absoluta do HSV-1 obtida nos pacientes com mucosite bucal na prefase/indução e consolidação da remissão.

Quadro 17. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento (D) dentro da prefase/indução e consolidação da remissão dos episódios de mucosite bucal nos pacientes com LLA B BR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1 vs D8 p-value	D0/D1 vs D15 p-value	D0/D1 vs D35 p-value	D8 vs D15 p-value	D8 vs D35 p-value	D15 vs D35 p-value
Prefase/Indução	0.84	0.45	0.92	0.83	0.60	0.75
	D1 vs D15 p-value	D1 vs D29 p-value	D15 vs D29 p-value			
Consolidação da Remissão	0.50	0.40	0.40			

Quadro 18. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão dos episódios de mucosite bucal nos pacientes com LLA B BR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1	D8	D15	D35
Prefase/Indução	p-value: 0.87			
	D1	D15	D29	
Consolidação da Remissão	p-value: 0.31			

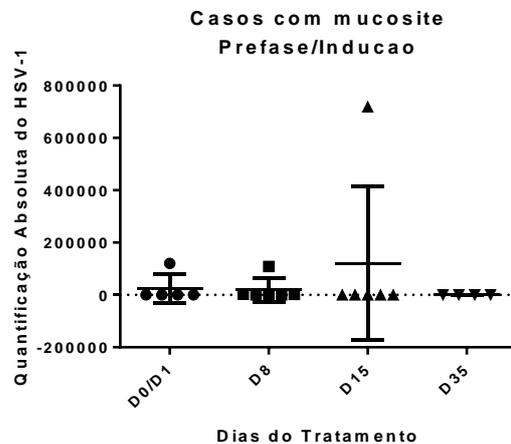


Figura 19. Quantificação absoluta da carga viral nos pacientes portadores de LLA B BR com mucosite bucal em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução. D = Dias.

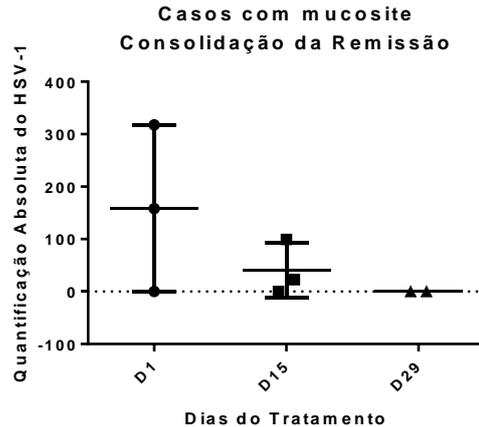


Figura 20. Quantificação absoluta da carga viral nos pacientes portadores de LLA B BR com mucosite bucal em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Consolidação da Remissão. D = Dias.

A relação entre a carga viral do HSV-1 também foi avaliada em combinações isoladas ao longo do tratamento quimioterápico nos pacientes com mucosite bucal. Dessa maneira, considerou-se momentos isolados de cada fase (Prefase/Indução: D0/D1, D8, D15 e D35, Consolidação da Remissão: D1, D15 e D29 e Intensificação: D8) em relação as demais fases (Quadro 19).

Em seguida, foi realizada uma análise agrupada considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias ou momentos (Quadro 20). Com bases nessas análises não foi evidenciada nenhuma diferença estatística em relação a distribuição da carga viral nos diferentes dias ao longo do tratamento nos pacientes com mucosite bucal.

A Figura 21 ilustra a quantificação absoluta do HSV-1 obtida nos pacientes com mucosite bucal em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias.

Quadro 19. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando momentos isolados da prefase/indução (P/I) e da consolidação da remissão (CR) (coluna pintada de cinza claro) em relação as demais fases do tratamento nos pacientes com mucosite bucal. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus; IN= intensificação.

<b>Prefase/Indução (P/I)</b>	<b>D0/D1</b> vs demais fases isoladas	D0/D1 (P/I) Vs D1 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D15 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D29 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D8 (IN)
	p-value	0.64	>0.99	0.76	>0.99
	<b>D8</b> vs demais fases isoladas	D8 (P/I) Vs D1 (CR)	D8 (P/I) Vs D15 (CR)	D8 (P/I) Vs D29 (CR)	D8 (P/I) Vs D8 (IN)
	p-value	0.79	0.79	0.46	0.71
	<b>D15</b> vs demais fases isoladas	D15 (P/I) Vs D1 (CR)	D15 (P/I) Vs D15 (CR)	D15 (P/I) Vs D29 (CR)	D15 (P/I) Vs D8 (IN)
	p-value	0.96	0.77	0.18	0.46
	<b>D35</b> vs demais fases isoladas	D35 (P/I) Vs D1 (CR)	D35 (P/I) Vs D15 (CR)	D35 (P/I) Vs D29 (CR)	D35 (P/I) Vs D8 (IN)
	p-value	0.91	0.91	0.47	0.80
<b>Consolidação da Remissão (CR)</b>	<b>D1</b> vs demais fases isoladas	D1 (CR) vs D8 (IN)			
	p-value	0.50			
	<b>D15</b> vs demais fases isoladas	D15 (CR) vs D8 (IN)			
	p-value	>0.99			
	<b>D29</b> vs demais fases isoladas	D29 (CR) vs D8 (IN)			
	p-value	>0.99			

Quadro 20. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias nos pacientes com mucosite bucal. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

MUCOSITE							
Fases do Tratamento (LLA B Baixo Risco)							
Prefase/Indução (P/I)				Consolidação da Remissão (CR)			Intensificação (I)
D0/D1	D8	D15	D35	D1	D15	D29	D8
p-value: 0.84							

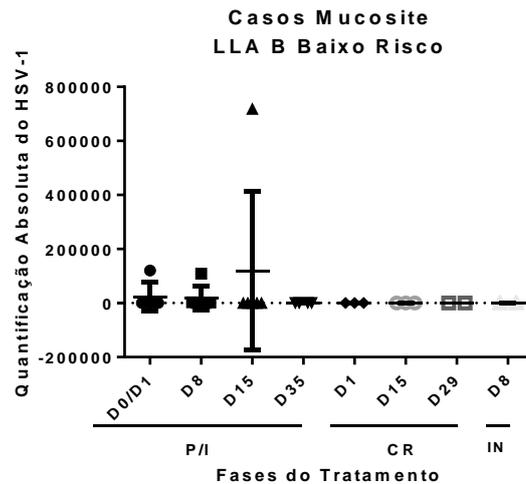


Figura 21. Quantificação absoluta da carga viral em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (D) nos pacientes com mucosite bucal. D= Dias do tratamento quimioterápico. P/I = prefase/indução. CR = consolidação da remissão. IN= intensificação.

Não foi possível realizar análise estatística da carga viral do HSV-1 nos pacientes com mucosite em relação as diversas localizações, a graduação (OMS) e a classificação (Otmani, 2011) em função da casuística verificada quando essas situações são estratificadas.

#### 5.2.2.2- Quantificação do HSV-1 nos episódios de mucosite bucal de acordo com os aspectos clínicos

Com relação à ocorrência de mucosite e os aspectos clínicos dos pacientes, foram realizadas análises quanto à localização, à graduação e à classificação da lesão para o grupo de pacientes com LLA B de baixo risco, como ilustrado nas figuras a seguir (Figura 22).

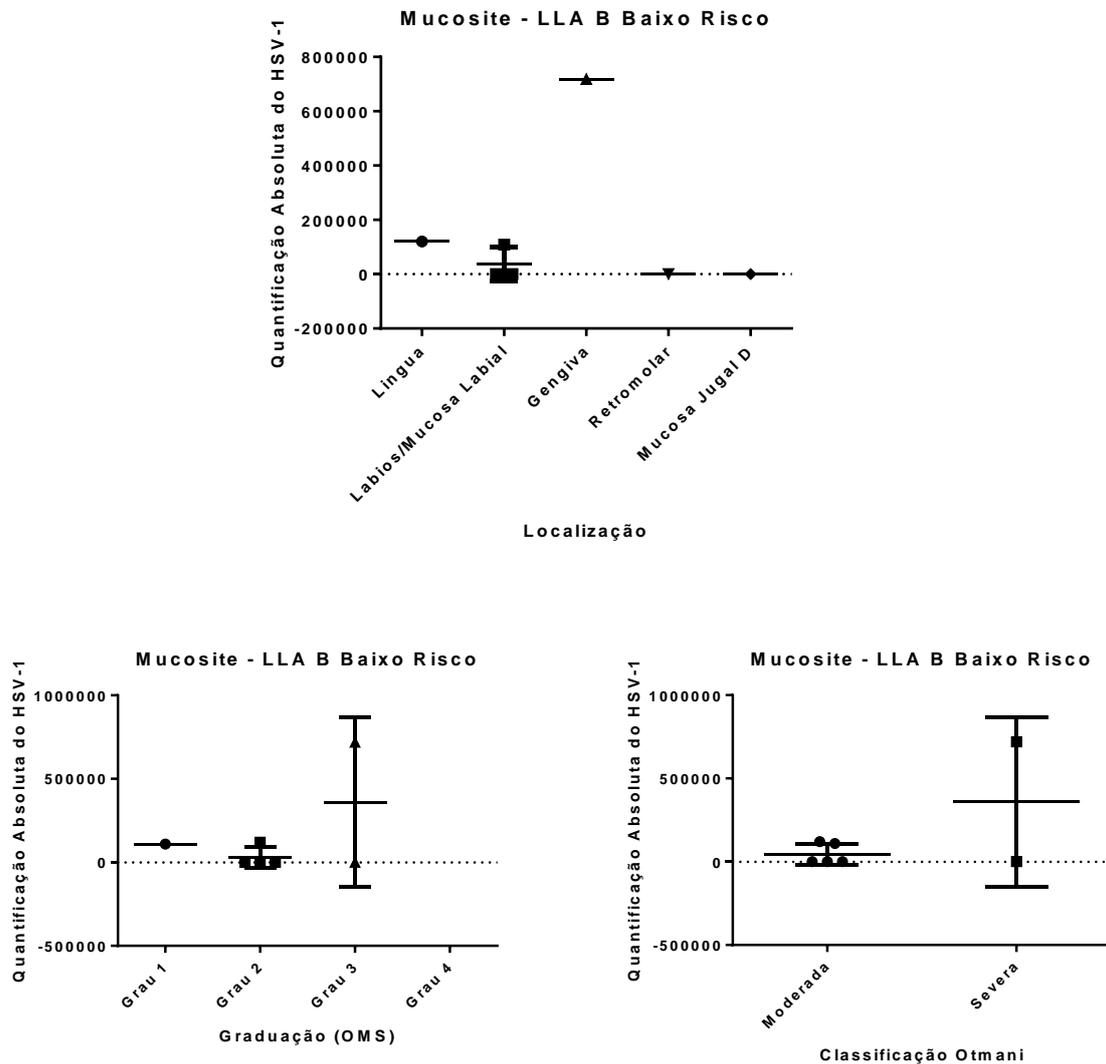


Figura 22. Quantificação absoluta da carga viral do HSV-1 para os pacientes com LLA B BR em relação às diversas localizações, a graduação (OMS) e a classificação (Otmani, 2011).

### 5.2.3- Correlação nos casos de LLA B de Alto Risco de Recaída (LLA B AR)

A relação entre a carga viral do HSV-1 nos diferentes momentos da profase/indução (D0/D1, D8, D15 e D35) e separadamente dentro dos diferentes momentos da consolidação da remissão (D1, D15, D29 e D50) dos pacientes com LLA B AR foi avaliada (Quadro 21). Em seguida, cada uma dessas fases foi ainda analisada de maneira agrupada considerando-se todos os momentos dentro da respectiva fase

(Quadro 22). Com bases nessas análises não foi evidenciada nenhuma diferença estatística em relação a distribuição da carga viral ao longo do tempo na prefase/indução e consolidação da remissão no grupo de pacientes com LLA B AR.

As Figuras 23 e 24 ilustram a quantificação absoluta do HSV-1 obtida nos pacientes com LLA B AR na prefase/indução e consolidação da remissão.

Quadro 21. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando cada momento dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B AR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1 vs D8 p-value	D0/D1 vs D15 p-value	D0/D1 vs D35 p-value	D8 vs D15 p-value	D8 vs D35 p-value	D15 vs D35 p-value
Prefase/Indução	0.76	0.76	>0.99	0.68	0.44	>0.99
	D1 vs D15 p-value	D1 vs D29 p-value	D1 vs D50 p-value	D15 vs D29 p-value	D15 vs D50 p-value	D29 vs D50 p-value
Consolidação da Remissão	>0.99	0.40	>0.99	0.54	>0.99	0.43

Quadro 22. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test comparando todos os momentos dentro da prefase/indução e consolidação da remissão para os pacientes com LLA B AR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fase do Tratamento	D0/D1	D8	D15	D35
Prefase/Indução	p-value: 0.66			
	D1	D15	D29	D50
Consolidação da Remissão	p-value: 0.76			

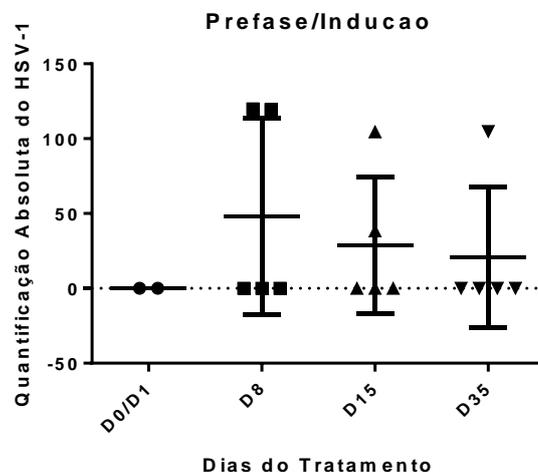


Figura 23. Quantificação absoluta da carga viral para os pacientes com LLA B AR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na Prefase/Indução. D = Dias.

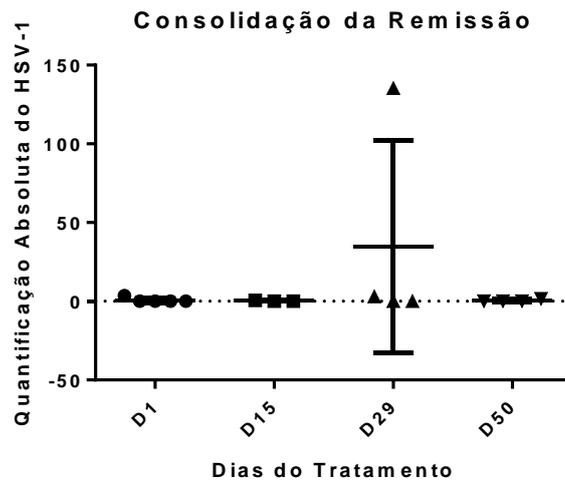


Figura 24. Quantificação absoluta da carga viral os pacientes com LLA B AR em relação aos diferentes momentos (D) do tratamento quimioterápico na consolidação da remissão. D = Dias.

A relação entre a carga viral do HSV-1 também foi avaliada em combinações isoladas ao longo do tratamento quimioterápico dos pacientes com LLA B AR. Dessa maneira, considerou-se momentos isolados de cada fase (Prefase/Indução: D0/D1, D8, D15 e D35, Consolidação da Remissão: D1, D15, D29 e D50, Intensificação: D15, Interfase: D8) em relação as demais fases (Quadro 23).

Em seguida, foi realizada uma análise agrupada considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (Quadro 24). Nesta análise, observou-se correlação estatisticamente significativa entre os momentos D8, D15, D35 da fase da prefase/indução e o momento D15 da intensificação, estando a carga viral na intensificação bastante elevada ( $p < 0.048$ ).

A Figura 25 ilustra a quantificação absoluta do HSV-1 obtida nos pacientes com LLA B AR em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias.

Quadro 23. Análise estatística utilizando Mann Whitney test comparando momentos isolados da prefase/indução (P/I) e da consolidação da remissão (CR) (coluna pintada de cinza claro) em relação as demais fases do tratamento nos pacientes com LLA B AR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus; ITS= intensificação; ITF= interfase. Em amarelo, correlações estatisticamente significativas.

<b>Prefase/Indução (P/I)</b>	<b>D0/D1</b> vs demais fases isoladas	D0/D1 (P/I) Vs D1 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D15 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D29 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D50 (CR)	D0/D1 (P/I) Vs D15 (ITS)	D0/D1 (P/I) Vs D8 (ITF)
	p-value	>0.99	>0.99	0.47	>0.99	0.33	>0.99
	<b>D8</b> vs demais fases isoladas	D8 (P/I) Vs D1 (CR)	D8 (P/I) Vs D15 (CR)	D8 (P/I) Vs D29 (CR)	D8 (P/I) Vs D50 (CR)	D8 (P/I) Vs D15 (ITS)	D8 (P/I) Vs D8 (ITF)
	p-value	0.44	0.64	0.92	0.56	0.048	0.62
	<b>D15</b> vs demais fases isoladas	D15 (P/I) Vs D1 (CR)	D15 (P/I) Vs D15 (CR)	D15 (P/I) Vs D29 (CR)	D15 (P/I) Vs D50 (CR)	D15 (P/I) Vs D15 (ITS)	D15 (P/I) Vs D8 (ITF)
	p-value	0.44	0.64	0.92	0.56	0.048	0.62
	<b>D35</b> vs demais fases isoladas	D35 (P/I) Vs D1 (CR)	D35 (P/I) Vs D15 (CR)	D35 (P/I) Vs D29 (CR)	D35 (P/I) Vs D50 (CR)	D35 (P/I) Vs D15 (ITS)	D35 (P/I) Vs D8 (ITF)
	p-value	>0.99	>0.99	0.40	>0.99	0.048	0.76
<b>Consolidação da Remissão (CR)</b>	<b>D1</b> vs demais fases isoladas	D1 (CR) vs D15 (ITS)	D1 (CR) vs D8 (ITF)				
	p-value	0.048	0.76				
	<b>D15</b> vs demais fases isoladas	D15 (CR) vs D15 (ITS)	D15 (CR) vs D8 (ITF)				
	p-value	0.20	0.70				
	<b>D29</b> vs demais fases isoladas	D29 (CR) vs D15 (ITS)	D29 (CR) vs D8 (ITF)				
	p-value	0.20	>0.99				
	<b>D50</b> vs demais fases isoladas	D50 (CR) vs D15 (ITS)	D50 (CR) vs D8 (ITF)				
	p-value	0.07	0.73				

Quadro 24. Análise estatística utilizando Kruskal Wallis test considerando-se todas as fases do tratamento com seus respectivos dias nos pacientes com LLA B AR. D = Dias do tratamento quimioterápico; vs = versus.

Fases do Tratamento (LLA B Alto Risco)									
Prefase/Indução (P/I)				Consolidação da Remissão (CR)				Intensificação (ITS)	Interfase (ITF)
D0/D1	D8	D15	D35	D1	D15	D29	D50	D15	D8
p-value: 0.31									

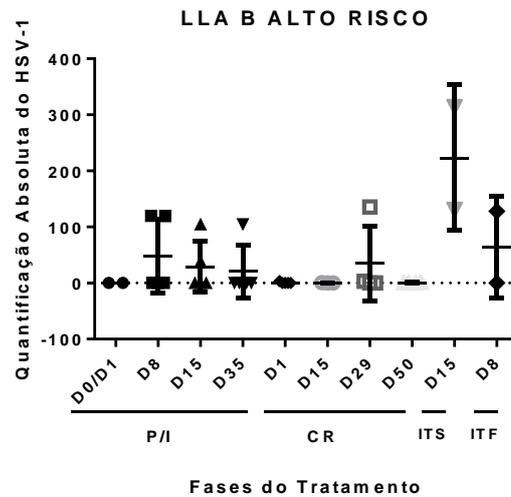


Figura 25. Quantificação absoluta da carga viral em todas as fases do tratamento com seus respectivos dias (D) nos pacientes com LLA B AR. D= Dias do tratamento quimioterápico. P/I = prefase/indução. CR = consolidação da remissão. ITS = intensificação. ITF = interfase.

Como foi registrado apenas um caso de mucosite bucal (paciente 3) dentro deste grupo de pacientes (LLA B AR), as análises estatísticas não foram possíveis de serem realizadas. A Figura 26 ilustra, a título de exemplo, a quantificação do HSV1 nos diferentes momentos ao longo do tratamento quimioterápico.

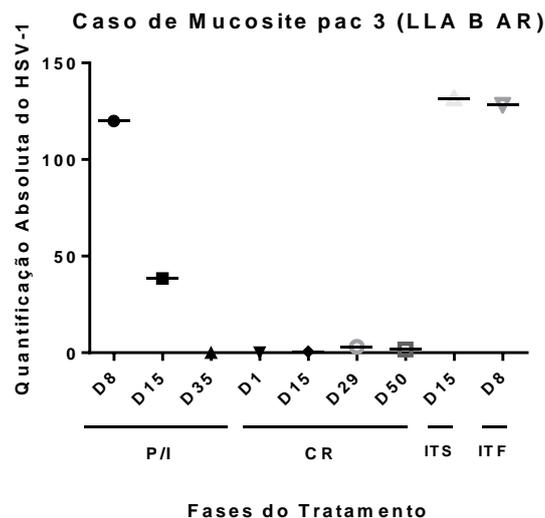


Figura 26. Quantificação absoluta da carga viral no único caso de mucosite do grupo de pacientes portadores de LLA B AR. D = momento do tratamento quimioterápico. P/I=prefase/indução; CR= consolidação da remissão; ITS= intensificação, ITF= interfase.

## **6 DISCUSSÃO**

Em função da escassez de estudos relacionados ao vírus HSV-1 na mucosa bucal de pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), propusemo-nos a analisar não somente a expressão, mas sobretudo, a carga viral do HSV-1, na mucosa bucal de pacientes pediátricos com LLA. Essa avaliação foi realizada nas diferentes fases do tratamento quimioterápico a fim de verificar o perfil quali-quantitativo do vírus ao longo do tempo e sua possível influência no surgimento da mucosite bucal. Em nossa revisão da literatura, evidenciamos a carência de estudos dessa natureza, como mostrado na Tabela 10 (Anexo G) e destacamos o estudo realizado em 2012 por Mendonça e colaboradores.

Destacamos também a contribuição desse estudo com dados epidemiológicos a respeito da doença na região, pois a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, local de realização do estudo, é o centro de referência no tratamento de pacientes com doenças onco-hematológicas, dentre elas a LLA.

### **6.1 Epidemiologia de pacientes portadores de LLA**

LLA representa um grupo de malignidades que pode acometer as células sanguíneas de linhagem linfóide B e T, onde a medula produz rapidamente grande quantidade de blastos, que são células imaturas que substituem as células saudáveis e podem se depositar em diversos órgãos e tecidos (JAVED et al., 2012; ZUCKERMAN, ROWE, 2014). Este tipo de neoplasia é o mais comum na população infantil (INCA, 2014), representando cerca de 30% de todas as neoplasias infantis e, dentro do grupo

de leucemias em crianças, representa cerca de 80% dos casos (GOMEZ-CANDELA et al., 2012). É mais incidente em crianças entre 2 e 5 anos de idade (PUI, ROBISON, LOOK, 2008) e manifesta predileção pelo sexo masculino (KABRIAEI, ANASTASI, LARSON, 2003; GRIMBERG, 2011). Em relação ao subtipo de LLA, no estudo de Oliveira (2015) foi verificada a ocorrência em maior número de casos de LLA B-derivada, especificamente do grupo de baixo risco de recaída.

No presente estudo, foram avaliados 20 pacientes com idades entre 1 e 17 anos, e destes foi observado que 80% pertencia ao grupo 1 (idade entre 1 e 6 anos), corroborando com o que é descrito na literatura em relação à maior incidência por idade, com pico entre 2 e 5 anos (PUI, ROBISON, LOOK, 2008, OLIVEIRA, 2015). Em relação ao sexo, não houve predileção, pois 50% ocorreram em pacientes do sexo feminino e 50% no sexo masculino. Considerando o tipo de LLA, no presente estudo, 100% os casos registrados foram de pacientes com LLA B-derivada, sendo 75% do tipo LLA B de baixo risco e 25% do LLA B de alto risco de recidiva, estando estes dados de acordo com o estudo de Oliveira, em 2015.

## **6.2 Expressão do vírus HSV-1 na mucosa bucal de pacientes com LLA**

No presente estudo, verificou-se a expressão quali-quantitativa do HSV-1 nesse grupo de pacientes utilizando o protocolo GBTLI-LLA 2009. Não encontramos na literatura publicações que mostrem a detecção do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos portadores de LLA utilizando este protocolo brasileiro mais recente. O único trabalho publicado até o momento, que também pesquisou o HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos portadores de LLA, foi o de Mendonça e colaboradores, em

2012 (Anexo G), que difere do presente estudo por dois motivos: a) metodologia, pois era do tipo qualitativo, ou seja, verificou somente a presença ou ausência do HSV-1, enquanto utilizamos, sobretudo, o método quantitativo; b) protocolo utilizado, pois utilizou o protocolo GBTLI LLA 1999, que é anterior ao protocolo de 2009 utilizado no nosso estudo. Feitas essas considerações, Mendonça e colaboradores (2012) verificaram a presença do HSV-1 na mucosa bucal de 10,37% dos pacientes (n=71), sendo no 14<sup>o</sup> dia da fase de indução e prevalência de 6,2% no 56<sup>o</sup> dia da fase de intensificação. No presente estudo, verificou-se a presença e quantificação do HSV-1 na mucosa bucal de 80% dos pacientes (n=20) em algum momento ao longo do tratamento quimioterápico (Tabela 3). Apesar da casuística menor, o maior percentual de detecção do HSV-1 em nosso estudo, provavelmente está relacionado com a maior sensibilidade da técnica utilizada de PCR em tempo real, o que possibilitou uma avaliação quali-quantitativa, enquanto no estudo de Mendonça e colaboradores (2012) foi utilizada a técnica de PCR convencional para avaliação qualitativa.

Em estudo recente, ainda não publicado, realizado em 9 pacientes pediátricos portadores de LLA submetidos ao protocolo recente (GBTLI-LLA 2009) de tratamento, foi feita uma análise da detecção dos membros da família *Herpesviridae*, incluindo HSV-1, através de PCR convencional. Neste estudo, a presença do HSV-1 não foi encontrada em nenhuma das amostras de mucosa bucal provenientes desses pacientes (OLIVEIRA, 2015). Este fato pode ter ocorrido pelo uso da técnica do tipo qualitativa, não se descartando a possibilidade da existência do vírus nesses pacientes com a utilização de uma técnica de alta sensibilidade e maior precisão como o PCR em Tempo Real.

Nesse sentido, em 2014, Aggarwal e colaboradores fizeram um estudo comparando as técnicas de PCR em Tempo Real (quantitativa) e PCR convencional (qualitativa) em

32 pacientes com mucosite, portadores de linfomas e leucemias. Os resultados mostraram significativo aumento na detecção do HSV-1 nesses pacientes com o PCR em Tempo Real, o qual detectou o vírus em 66% dos casos em relação aos 25% previamente detectados pelo PCR convencional.

Considerando a ausência de estudos direcionados a carga viral do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes portadores de LLA utilizando o protocolo (GBTLI-LLA 2009), cabe esclarecer, de maneira mais detalhada, como foram realizadas as coletas deste estudo para melhor interpretação dos resultados. Sendo assim, vale ressaltar que o tempo de coleta utilizando este protocolo foi mais longo, proporcionando a obtenção de algumas amostras advindas de fases mais posteriores do tratamento quimioterápico. Pôde-se coletar, além das fases iniciais do tratamento, fases mais tardias do protocolo, como a intensificação no momento D8 (LLAB baixo risco) e D15 (LLA alto risco); interfase, no momento D8 (LLA B alto risco); consolidação tardia no momento D29 e até a fase de manutenção, no momento D1. Um total de 121 amostras provenientes de 20 pacientes foram coletadas, independente da presença ou ausência de mucosite bucal, ampliando a casuística em relação ao trabalho de Oliveira (2015) e proporcionando uma avaliação mais aprofundada dos pacientes desde sua entrada no estudo, bem como na avaliação da presença do HSV-1 em diferentes momentos das diversas fases do tratamento.

Apesar da casuística de pacientes com LLA B BR (75%) ter sido maior que a de pacientes com LLA B AR (25%), só encontramos resultados com significância estatística no grupo de pacientes com LLA B AR. Com base nos períodos de coleta inicial e final do nosso estudo e no tempo necessário para a realização das diferentes fases do tratamento conforme exposto anteriormente, a avaliação em relação à detecção de HSV-1 ao longo do tempo foi realizada, principalmente nas fases iniciais,

ou seja prefase/indução (D1, D8, D15 e D35) e consolidação da remissão (D1, D15, D29 e D50, este último apenas para pacientes com LLA B AR) em todos os pacientes com LLA B. No entanto, apesar do menor número de coletas em fases mais posteriores do tratamento, verificou-se que a carga viral do HSV-1 no momento D15 da fase de Intensificação mostrou-se significativamente superior quando comparada com as fases D8, D15 e D35 da prefase/indução nos pacientes com LLA B AR. Porém no grupo de pacientes com LLA B BR, não houve diferenças significativas da carga viral em relação as demais fases do tratamento. Por outro lado, não encontramos diferenças significativas de carga viral do HSV-1 nos diferentes momentos dentro de cada fase tratamento, tanto no grupo de LLA B AR quanto LLA B BR.

Em relação a prevalência do vírus HSV-1 na população em geral, esse vírus é considerado um patógeno humano ubíquo e estudos relatam que sua prevalência aumenta gradualmente desde infância, atingindo 70-80% na idade adulta (DAKVIST et al, 1995; MILLER et al, 1998; STOCK et al, 2001). É relatado que o vírus afeta cerca de 60% dos adultos norte-americanos (KOELLE et al., 2010). Porém, outros estudos relatam valores ainda maiores, atingindo cerca de 90% da população adulta (MARQUES-SILVA, 2007; HERNANDEZ et al, 2011). Em nosso estudo verificou-se que o HSV-1 infectou 80% das crianças, valor semelhante ao encontrado em adultos, sendo considerado, portanto, alto para esse tipo de faixa etária.

### **6.3 Relação do HSV-1 com a mucosite bucal em pacientes com LLA**

Há estudos que sugerem que a presença do HSV-1 desempenha um papel importante e pode estar relacionado à severidade da mucosite bucal induzida por

quimioterapia em pacientes com neoplasias hematológicas (CHEN et al., 2011; RÜPING et al., 2011; MENDONÇA et al., 2012). A reativação do HSV bucal é extremamente frequente em pacientes com câncer, tanto os com mucosite, bem como os sem (DJURIC et al., 2009).

No presente estudo, 35% (n=20) dos pacientes desenvolveram mucosite ao longo do tratamento quimioterápico, sendo que um deles, apresentou a lesão logo no início do tratamento, podendo este fato ter ocorrido por conta da doença de base. Além disso, um paciente apresentou dois episódios ao longo da prefase/indução (D8 e D15). Do total de episódios de mucosite (n=8), 75% dos casos ocorreram na prefase/indução, como também verificado por Santos de Faria e colaboradores em um estudo realizado no ano de 2014 (Anexo G). O trabalho de Mendonça e colaboradores (2012) relata 25.3% de incidência de mucosite bucal no D14 e 19.4% no D56 do tratamento quimioterápico. Os autores relatam ainda que a presença do HSV-1 nos dias 14 e 56 do tratamento está associado ao aumento da severidade da mucosite em crianças e adolescentes com LLA.

No presente estudo, a relação do HSV-1 com o surgimento da mucosite bucal não está clara em função da pequena casuística, porém é notório observar que a maior carga viral (cv) do HSV-1 foi verificada justamente nos pacientes que apresentaram episódios de mucosite, nos momentos D0/D1 (cv= 120.359,06 no paciente 4), D8 (cv= 108.920,66 no paciente 5) e D15 (cv= 718.978,37 paciente 5) da Prefase/Indução (P/I). Vale frisar ainda que 75% da ocorrência de mucosite bucal em nosso estudo foi justamente nesta fase (P/I) do tratamento quimioterápico. Em contrapartida nos momentos D35 da prefase/indução e D8 da fase de Intensificação, as amostras que apresentaram maior carga viral do HSV-1, paciente 2 (cv= 7.763,14) e paciente 1 (6992,10), respectivamente, foram em pacientes livres de mucosite.

Já nos pacientes do grupo de LLA B AR, a carga viral do HSV-1 foi significativamente superior no momento D15 da fase de Intensificação quando comparada as fases D8, D15 e D35 da Prefase/Indução. Vale ressaltar que não foi observada ocorrência de mucosite no momento D15 da fase de Intensificação. Por outro lado, o único paciente, com mucosite bucal deste grupo teve o episódio da lesão no momento D8 da Interfase (ultima fase coletada no estudo para esse grupo) e apresentou  $cv= 128,28$  (paciente 3), enquanto outro paciente com coleta nesse mesmo momento e fase do tratamento não apresentou nem HSV-1 e nem mucosite bucal.

A mucosite bucal pode ocorrer não somente como sequela da pós-quimioterapia em pacientes com leucemia mas naqueles portadores de outros cânceres. Nesse sentido, Ramphal (2007) verificou a ocorrência de mucosite em 9% dos pacientes de seu estudo ( $n=75$ ). Desses pacientes com mucosite, 20% foram ainda positivos para HSV-1. No presente estudo, 75% dos casos de mucosite em pacientes portadores especificamente de LLA B foram positivos para o HSV-1. No entanto deve-se considerar que o como o HSV-1 mostrou-se presente em 80% dos pacientes do presente estudo, de maneira proporcional também houve essa alta presença detectada do vírus nos episódios de mucosite bucal, podendo o vírus estar presente na lesão como um achado ocasional já que encontramos o vírus também em grande parte dos pacientes livres de mucosite bucal.

Deve-se levar em consideração que o pequeno número de episódios de mucosite ao longo do tratamento ( $n=8$ ), ocorreu geralmente em um único episódio e no máximo em dois episódios no mesmo paciente (somente no paciente 5 do estudo). Este fato poderia estar relacionado a utilização de um protocolo mais atual (GBTLI LLA 2009) e portanto, mais efetivo para controle desta lesão. Por outro lado, a baixa incidência de mucosite bucal neste estudo poderia estar relacionada ao tratamento multidisciplinar

desses pacientes em um centro de referência para tratamento de doenças onco-hematológicas, incluindo ainda a presença de uma equipe odontológica, o que poderia influenciar no melhor controle desta condição bucal neste grupo de pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

7.1 Sugere-se que a presença do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes com LLA B é frequente em todas as fases do tratamento quimioterápico.

7.2 Sugere-se que a presença do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes com LLA B ocorre preferencialmente na fase de indução.

7.3 Sugere-se que a ocorrência de mucosite bucal em pacientes com LLA B ocorre principalmente na fase de indução.

7.4 No grupo de pacientes com LLA B BR, a carga viral do HSV-1 não parece predominar em nenhuma fase do tratamento;

7.5 No grupo de pacientes com LLA B AR, a carga viral do HSV-1 parece predominar na fase de Intensificação do tratamento;

7.6 O papel do HSV-1 no surgimento da mucosite bucal não está claro.

## 8 REFERÊNCIAS

AGGARWAL R. et al. HSV-1 as well as HSV-2 is frequent in oral mucosal lesions of children on chemotherapy. *Support Care Cancer*. v. 22, p. 1773–79. Jul., 2014.

ANIRUDHAN, D. et al. Etiology and Outcome of Oral Mucosal Lesions in Children on Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian Pediatrics*. v. 45, n. 1, p. 47-51, Jan., 2008.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*, v. 37, p. 107–21, 2008.

BARION, L.A. et al. Associação entre HLA e leucemia em uma população brasileira de etnia mista. *Rev Assoc Med Bras*. v. 53, n. 3, p. 252-56. 2007.

CAMPO et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, v. 117, n. 19, p. 5019-32, may., 2011.

CHEN, Y. K.. et al. The impact of oral herpes simplex virus infection and candidiasis on chemotherapy-induced oral mucositis among patients with hematological malignancies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v. 30, n. 6, p. 753-59, jun., 2011.

CHENG, K. K. F. et al. Evaluation of an oral care protocol intervention in the prevention of chemotherapy-induced oral mucositis in pediatric cancer patients. *European Journal of Cancer*, v.37, p. 2056–63, 2001.

DAKVIST J. et al. Herpes simplex and mood: a prospective study. *Psychosom Med*. V. 57,p. 127–137. 1995.

DJURIC, M. et al. Prevalence of oral herpes simplex virus reactivation in cancer patients: a comparison of different techniques of viral detection. *J Oral Pathol Med*. v. 38, p.167–73, 2009.

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

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

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

FIGLIOLIA, S.L.C. *Fatores de risco para mucosite bucal em pacientes com leucemia linfóide aguda submetidos a diferentes protocolos de tratamento*. 2006. 134 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2006.

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

GBTLI-LLA-2009. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda da criança e do adolescente. Coordenadores: Sílvia R. Brandalise, Vitória Régia Pinheiros e Maria Lúcia M Lee. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica. Versão revisada, 2011.

GÓMEZ-CANDELA, C. et al. Nutritional intervention in oncohematological patient. *Nutr Hosp.*, v.27, n. 3, p. 669-680, May-Jun, 2012.

GRIMBERG, I.E. *Caracterização de crianças portadoras de câncer segundo sensibilidade ao umami e consumo alimentar*. 2011. 130 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.

HERNANDEZ G. et al. Failure off free conective tissue grafts caused by recurrent herpes simplex virus type 1 infection. *J. Oral Maxillofac Surg*, v. 69, p. 217-21, 2011.

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

JAVED, F. et al. Oralhealth status in children with acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev OncolHematol.* v. 83, p. 303–309, 2012.

KABRIAEI P., ANASTASI J., LARSON R.A. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res ClinHaematol*, v. 15, p. 597-621. 2003.

KOELLE D. M. et al. APOE genotype is associated with oral herpetic lesions but not genital or oral herpes simplex virus shedding. *Sex Transm Infect.*, v. 86, n. 3, p. 2002-06, jun. 2010.

LEITE E.P. et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* v. 7, n.4, p. 413-421. out. / dez., 2007.

LEVY-POLACK, M.P.; SEBELLI, P.; POLACK, N.L. Incidence of oral complications and application of a preventive protocol in children with acute leukemia. *Spec Care Dentist.* v. 18, p. 189-193, 1998.

LLOID M.E. et al. Cytomegalovirus infection of the tongue following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* v.14, n.1, p. 99-104. 1994.

MARQUES-SILVA L. et al. The Impact of Dental Surgery on HSV-1 Reactivation in the Oral Mucosa of Seropositive Patients. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 65, p. 2269-72, 2007.

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

MENDONÇA, R. M. H. *Associação entre a presença de microorganismos da microbiota bucal e a intensidade da mucosite bucal, em pacientes pediátricos com leucemia linfóide aguda, submetidos ao tratamento antineoplásico.* 2008. 120 f. Tese (Doutorado

em Saúde da Criança e Adolescente) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008.

MENDONÇA, R. M. et al. Prospective evaluation of HSV, Candida spp., and bucal bacteria on the severity of oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer*, v. 20, n. 5, p. 1101-07, may, 2012.

MILLER CS et al. Molecular aspects of herpes simplex virus I latency, reactivation, and recurrence. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.9, p. 541–562. 1998.

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

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

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

OLIVEIRA, J.M.S. Análise da microbiota bucal de pacientes com Leucemia linfoblástica aguda. 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2015.

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

PAUNICA, S.C. et al. The evaluation of the periodontium in patients with leukemia using thermographic imaging. *Hematology*. v.14, p. 341–46. 2009.

PUI C.H., ROBISON L.L., LOOK A.T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. v. 371, p. 1030–1043, 2008.

PUYAL-CASADO, M. et al. Protocolo de estudio y tratamiento de la mucositis bucal en los pacientes con hemopatías malignas. *Med Oral*. v.8, p. 10-18. 2003.

RAMPHAL R. et al. Herpes simplex virus in the febrile neutropenic children undergoing chemotherapy for cancer: a prospective cohort study. *Pediatr Infect Dis.*, v. 26, p. 700–04. 2007.

RIBERA, J.M.; ORIOL, A. Acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *HematolOncolClin North Am.* v. 23, p. 1033–42. 2009.

RÜPING, M. J. G. T. et al. Association of HSV reactivation and pro-inflammatory cytokine levels with the severity of stomatitis after BEAM chemotherapy and autologous SCT. *Support Care Cancer*, v. 19, p. 1211–16, 2011.

SAMONIS G, MANTADAKIS E, MARAKI S. Orofacial viral infections in the immunocompromised host. *Oncol Rep.* v. 7, n. 6, p.1389-94. 2000.

SEPULVEDA E. et al. Herpes simplex virus detection in oral mucosa lesions in patients undergoing oncologic therapy. *Med Oral.* v. 8, p. 329-33. 2003.

SEPULVEDA E. et al. Oral ulcers in children under chemotherapy: clinical characteristic and their relation with Herpes Simplex Virus type 1 and *Candida albicans*. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal.* v. 10, p. 1-8. 2005.

SILVERMAN, L. B. et al. Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985–2000). *Leukemia*, v. 24, n. 2, p. 320–34, feb., 2010.

SONIS, S. T. The pathobiology of mucositis. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 277-84, apr., 2004.

STOCK C et al. Risk factors of herpes simplex type 1 (HSV-1) infection and lifestyle factors associated with HSV-1 manifestations. *Eur J Epidemiol*, v. 17, p. 885–90. 2001.

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

WANG, Y. et al. Oral Microbiota Distinguishes Acute Lymphoblastic Leukemia Pediatric Hosts from Healthy Populations. *PLOS ONE*. v. 9, n. 7. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1979. *Handbook for Reporting Results of Cancer Treatment*. World Health Organization, Switzerland: Geneva, 1979. E-book disponível no site < <http://whqlibdoc.who.int/publications/9241700483.pdf>> Acesso em outubro de 2015.

WILLIAMS, M.C.; LEE, G.T.R. Childhood leukemia and dental considerations. *J. Clin Pediatr Dent*. v. 15, p. 160-164. 1991.

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

ZUCKERMAN, T.; ROWE, J.M. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leucemia. *F1000Prime Reports*, v. 6, n. 59, 2014

## APÊNDICE A

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

**Título:**Quantificação do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda.

**Pesquisador responsável:** Renata Gualberto da Cunha

**Telefone para contato:** (92)98814-4259 **email:** rena.gualberto@gmail.com

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

**Nº Ficha:** \_\_\_\_\_

Prezado (a):

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

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

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

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

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

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

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

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

Após essas considerações, você declara que:

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

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

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

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

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

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

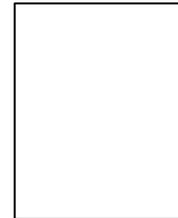
Manaus, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Pesquisador Responsável

---

Representante legal



Impressão do dedo polegar  
Caso não saiba assinar

**APÊNDICE B**  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
 FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
 TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

**Título: Quantificação do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda.**

**Pesquisador responsável:** Renata Gualberto da Cunha

**Telefone para contato:** (92)98814-4259 **email:** rena.gualberto@gmail.com

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

**Nº Ficha:** \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

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

Manaus, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do (a) pesquisador (a)

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do (a) menor

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas – CEP/UFAM

Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM

Fone: (92) 3305-1181 Ramal 2004 / (92) 9171-2496

E-mail: cep@ufam.edu.br - [cep.ufam@gmail.com](mailto:cep.ufam@gmail.com)

## APÊNDICE C

### “Quantificação do HSV-1 na mucosa bucal de pacientes pediátricos portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda”

#### Identificação

Número do registro do HEMOAM: \_\_\_\_\_

Número do registro no estudo: \_\_\_\_\_

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

Sexo: \_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_ Data de entrada: \_\_\_\_\_

Data e local de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Grupo: 1( ) 2 ( )

Endereço: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

História oncológica familiar: \_\_\_\_\_

Tipo de tratamento: \_\_\_\_\_

Protocolo de tratamento: \_\_\_\_\_

Está em tratamento Quimioterápico: Sim ( ) Não ( )

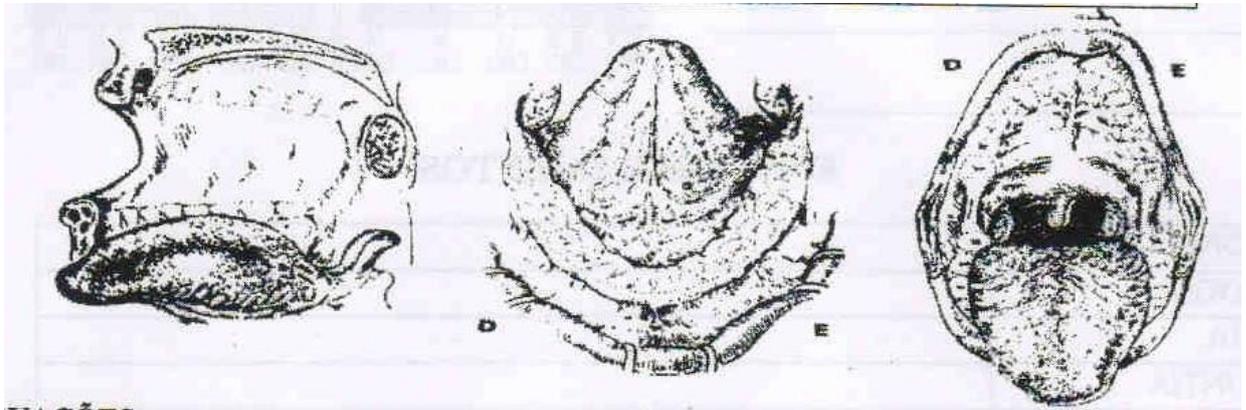
Fase do tratamento:

Indução ( ) \_\_\_\_\_

Consolidação ( ) \_\_\_\_\_

Manutenção ( ) \_\_\_\_\_

#### Dados Clínicos:



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

---



---



---



---

Classificação do grau da mucosite segundo a OMS:

Grau 1 ( ) \_\_\_\_\_

Grau 2 ( ) \_\_\_\_\_

Grau 3 ( ) \_\_\_\_\_

Grau 4 ( ) \_\_\_\_\_

Observações e Quimioterápicos utilizados:

---



---

## APÊNDICE D

### FORMULÁRIO PARA A COLETA DE DADOS

#### “QUANTIFICAÇÃO DO HSV-1 NA MUCOSA BUCAL DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA”

Pesquisador(a): Renata Gualberto da Cunha  
 Orientador(a): Profa. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura  
 Co-orientador(a): Profa. Dra. Juliana Vianna Pereira

Número do registro do HEMOAM:  
 Número do registro no estudo:  
 Data de entrada:

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Diagnóstico: \_\_\_\_\_

História oncológica familiar: \_\_\_\_\_

**Fase do tratamento:**

**Indução** ( ) \_\_\_\_\_

1. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_
2. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_
3. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_

Mucosite bucal: ( ) SIM ( ) NÃO

Classificação da mucosite:

( ) Grau 0	( ) Grau 4
( ) Grau 1	( ) Mucosite moderada
( ) Grau 2	( ) Mucosite severa
( ) Grau 3	

Agentes fúngicos encontrados: \_\_\_\_\_

Agentes bacterianos encontrados: \_\_\_\_\_

Presença de HSV-1 em PCR convencional?

**Consolidação da remissão** ( ) \_\_\_\_\_

1. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_
2. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_
3. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_

Mucosite bucal: ( ) SIM ( ) NÃO

Classificação da mucosite:

( ) Grau 0	( ) Grau 4
( ) Grau 1	( ) Mucosite moderada
( ) Grau 2	( ) Mucosite severa
( ) Grau 3	

Agentes fúngicos encontrados: \_\_\_\_\_

Agentes bacterianos encontrados: \_\_\_\_\_

Presença de HSV-1 em PCR convencional?

**Manutenção** ( ) \_\_\_\_\_

1. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_

2. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_

3. \_\_/\_\_/\_\_ Medicações administradas: \_\_\_\_\_

Mucosite bucal: ( ) SIM ( ) NÃO

Classificação da mucosite:

<input type="checkbox"/> Grau 0	<input type="checkbox"/> Grau 4
---------------------------------	---------------------------------

<input type="checkbox"/> Grau 1	<input type="checkbox"/> Mucosite moderada
---------------------------------	--

<input type="checkbox"/> Grau 2	<input type="checkbox"/> Mucosite severa
---------------------------------	--

<input type="checkbox"/> Grau 3
---------------------------------

Agentes fúngicos encontrados: \_\_\_\_\_

Agentes bacterianos encontrados: \_\_\_\_\_

Presença de HSV-1 em PCR convencional?

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável

## ANEXO A


**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**
**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

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

**Pesquisador:** Juliana Maria Souza de Oliveira

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 30934514.9.0000.5020

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia

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

**DADOS DO PARECER**

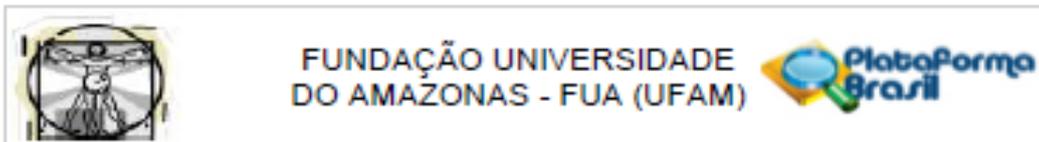
**Número do Parecer:** 878.148

**Data da Relatoria:** 18/11/2014

**Apresentação do Projeto:**

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comum na infância, derivada das células hematopoiéticas. A aplicação de regimes quimioterápicos pode alcançar uma taxa de sobrevivência livre de eventos em cerca de 80% dos pacientes em longo prazo. Mucosite é um efeito colateral comum entre as complicações secundárias resultantes da quimioterapia. A fase ulcerativa é representada pelo rompimento da integridade da mucosa, ocasionando lesões ulceradas extremamente dolorosas propensas a colonização de agentes virais, bacterianos e fúngicos, podendo levar a infecções orais. Estudos sugerem que a presença do HSV-1 desempenha um papel importante e pode estar relacionado a severidade da mucosite bucal induzida por quimioterapia em pacientes com neoplasias hematológicas. Este trabalho se propõe a realizar a análise da microbiota bucal de pacientes pediátricos com diagnóstico de Leucemia

**Endereço:** Rua Teresina, 4050  
**Bairro:** Adianópolis **CEP:** 69.057-070  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3305-5130 **Fax:** (92)3305-5130 **E-mail:** cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 070.140

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

O presente protocolo de pesquisa foi aprovado pelo CEP UFAM após atendimento integral das pendências apontadas.

No entanto, o CEP HEMOAM solicitou, apropriadamente, o Termo de Assentimento para menores de 12 a 17 anos, o qual não foi solicitado pelo CEP UFAM.

Considerando que a faixa etária dos pacientes a serem incluídos no estudo é de 0 a 18 anos, a solicitação foi pertinente e o documento apresentado encontra-se adequado.

**Recomendações:**

Não se aplica.

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

O presente protocolo de pesquisa atende integralmente às exigências da Res 466/12.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

MANAUS, 19 de Novembro de 2014

---

Assinado por:  
**MARIA EMILIA DE OLIVEIRA PEREIRA ABBUD**  
 (Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4050  
 Bairro: Adfianópolis CEP: 69.057-070  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br

## ANEXO B

<b>REGISTRO NO ESTUDO</b>	<b>NOME</b>	<b>IDADE</b>	<b>SEXO</b>	<b>REGISTRO HEMOAM</b>	<b>TIPO DE LLA</b>	<b>DATA DA PRIMEIRA COLETA NO PROJETO:</b>	<b>DATA DA ÚLTIMA COLETA NO PROJETO:</b>
1	M.R.R.R.	2 anos	Masculino	171370	LLA B Baixo Risco	13/03/2015	11/09/2015
2	U.S.P	6 anos	Masculino	171432	LLA B Baixo Risco	19/03/2015	13/09/2015
3	I.T.P.R	3 anos	Feminino	172050	LLA B Alto Risco	28/04/2015	25/09/2015
4	M.S.P	8 anos	Masculino	170939	LLA B Baixo Risco	28/04/2015	22/10/2015
5	W.M.F.	2 anos	Feminino	169745	LLA B Baixo Risco	05/05/2015	12/05/2015
6	A.A.S.V.	3 anos	Feminino	172351	LLA B Baixo Risco	14/05/2015	06/10/2015
7	A.L.S.S.	3 anos	Masculino	118085	LLA B Alto Risco	02/07/2015	10/10/2015
8	O.S.G.	6 anos	Masculino	173323	LLA B Baixo Risco	09/07/2015	18/09/2015
9	H.S.U.	15 anos	Masculino	173504	LLA B Alto Risco	28/07/2015	21/10/2015
10	S.S.L.	4 anos	Feminino	89532	LLA B Alto Risco	30/07/2015	16/10/2015
11	A.K.R.M.	5 anos	Masculino	173765	LLA B Baixo Risco	11/08/2015	13/10/2015
12	S.E.S.G.	3 anos	Feminino	108625	LLA B Baixo Risco	20/08/2015	09/10/2015
13	S.G.A.S.	4 anos	Masculino	173736	LLA B Baixo Risco	25/08/2015	21/10/2015
14	V.F.M.L.	3 anos	Feminino	147223	LLA B Baixo Risco	10/09/2015	24/09/2015
15	V.J.A.Q.	10 anos	Masculino	174374	LLA B Alto Risco	15/09/2015	21/10/2015
16	M.J.C.	5 anos	Feminino	174487	LLA B Baixo Risco	24/09/2015	08/10/2015
17	E.B.R.	17 anos	Masculino	174519	LLA B Baixo Risco	08/10/2015	12/11/2015
18	H.B.S.C.	1 ano	Feminino	175004	LLA B Baixo Risco	13/10/2015	16/11/2015
19	A.N.B.M.	2 anos	Feminino	175012	LLA B Baixo Risco	20/10/2015	24/11/2015
20	L.S.B.M.	4 anos	Feminino	174603	LLA B Baixo Risco	20/10/2015	24/11/2015

Legenda: LLA B = Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B.

REGISTRO ESTUDO	PREFASE/INDUÇÃO								CONSOLIDAÇÃO DA REMISSÃO							
	D1	Alteração Bucal	D8	Alteração Bucal	D15	Alteração Bucal	D35	Alteração Bucal	D1	Alteração Bucal	D15	Alteração Bucal	D29	Alteração Bucal	D50	Alteração Bucal
1	C	Não	C	Não	C	Mucosa jugal direita traumatizada	C	Não	NC	**	C	Não	C	Não	NA	NA
2	C	Lábio ressecado	C	Lábio ressecado	C	Não	C	Não	NC	**	NC	**	C	Não	NA	NA
3	NC	**	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não
4	C	Mucosite Lábio/Língua Grau 2	C	Lábio/Língua	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NA	NA
5	NC	**	C	Mucosite Lábios Grau 1	C	Mucosite Lábio/Gengiva Grau 3	NC		**	NC	**	NC	**	NC	NA	NA
6	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NA	NA
7	NC	**	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não
8	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	NA	NA
9	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não
10	NC	**	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	C	Não	C	Não
11	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	C	Não	NA	NA
12	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	C	Não			NA	NA
13	C	Não	C	Não	C	Não	C	Mucosite Retromolar Grau 3	C	Não	C	Não	NC	**	NA	NA
14	C	Lábios ressecados	C	Mucosite Mucosa labial Grau 2	C	Mucosite em cicatrização	NC	**	NC	**	NC	**	NC	**	NA	NA
15		Não	C	Lábios ressecados	C	Lábios ressecados	C	Lábios ressecados	C	Lábios ressecados	NC	**	NC	**	NC	**
16	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	NC	**	NC	**	NC	**	NA	NA
17	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	NC	**	NC	**	NA	NA
18	C	Não	C	Não	C	Não	C	Mucosite Mucosa jugal Grau 2	NC	**	NC	**	NC	**	NA	NA
19	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	NC	**	NC	**	NA	NA
20	C	Não	C	Não	C	Não	C	Não	NC	**	NC	**	NC	**	NA	NA

Legenda: D= Dia de coleta dentro da fase; C= Coletado; NC= Não coletado; NA= Não se aplica; \*\*Sem informações.

REGISTRO ESTUDO	INTENSIFICAÇÃO						INTERFASE		CONSOLIDAÇÃO TARDIA						MANUTENÇÃO	
	D1	Alteração Bucal	D8	Alteração Bucal	D15	Alteração Bucal	D8	Alteração Bucal	D1	Alteração Bucal	D15	Alteração Bucal	D29	Alteração Bucal	D1	Alteração Bucal
1	NA	**	C	Não	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	C	Não	C	Não
2	NA	**	C	Não	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
3	NA	**	NA	**	C	Não	C	Mucosite M. Jugal Grau 3	NA	**	NC	**	NA	**	NC	**
4	NA	**	C	Não	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	C	Não
5	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
6	NA	**	C	Mucosite M. Labial Grau 2	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	C	Não	NC	**
7	NA	**	NA	**	C	Não	NC	**	NA	**	NC	**	NA	**	NC	**
8	NA	**	C	Não	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
9	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**	NA	**	NC	**	NA	**	NC	**
10	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**	NA	**	NC	**	NA	**	NC	**
11	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
12	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
13	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
14	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
15	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**	NA	**	NC	**	NA	**	NC	**
16	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
17	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
18	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
19	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**
20	NA	**	NC	**	NA	**	NA	**	NA	**	NA	**	NC	**	NC	**

Legenda: D= Dia de coleta dentro da fase; C= Coletado; NC= Não coletado; NA= Não se aplica; \*\*Sem informações.

## ANEXO C

<b>Número do Paciente no estudo</b>	<b>Número de episódios</b>	<b>Fase Tratamento</b>	<b>Dia</b>	<b>Localização</b>	<b>Grau</b>	<b>Carga Viral (Mucosa Jugal)</b>	<b>Carga Viral (Lesão)</b>		
<b>3</b>	1	Interfase	D8	Mucosa Jugal	3	128,28	NC	<b>LLA B AR</b>	
<b>4</b>	2	Prefase/Indução	D0/D1	Língua	2	120359,06	2898,74		
<b>5</b>	3	Prefase/Indução	D8	Lábios	1	108920,66	NC		
	4	Prefase/Indução	D15	Gengiva	3	718978,37	15115829,69		
<b>6</b>	5	Intensificação	D8	Mucosa Labial	2	36,85	1212,09		<b>LLA B BR</b>
<b>13</b>	6	Prefase/Indução	D35	Retromolar	3	143,80	NC		
<b>14</b>	7	Prefase/Indução	D8	Mucosa Labial	2	negativo	Negativo		
<b>18</b>	8	Prefase/Indução	D35	Mucosa Jugal D	2	negativo	NC		

Legenda: D= dia da coleta dentro da fase. NC= não coletado.

## ANEXO D

PAC	D0/D1	D8	D15	D35	D1	D15	D29	D50 (B AR)	D8 (B BR)	D15 (B AR)	D8 (B AR)	D29	D1
1	Negativo	Negativo	47,27	Negativo		Negativo	Negativo		6992,10			21,90	Negativo
2	318,14	Negativo	Negativo	7763,14			Negativo		Negativo				
3		119,93	38,39	Negativo	Negativo	0,61	3,07	1,63		131,63	128,28		
4	120359,06	2533,15	18,70	428,38	317,50	22,90	Negativo		Negativo				Negativo
5		108920,66	718978,37										
6	Negativo	1979,72	6,99	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		36,85			Negativo	
7		Negativo	104,64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		314,97	Negativo		
8	248,93	Negativo	0,78	65,26	Negativo	Negativo			201,55				
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	135,44	Negativo					
10		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		Negativo	Negativo					
11	213,77	Negativo	Negativo	113,22	Negativo		193,82		Negativo				
12	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		Negativo	172,84						
13	Negativo	Negativo	65,29	143,80	158,15	99,18							
14	Negativo	Negativo	239,48										
15	Negativo	119,49	Negativo	104,79	3,58								
16	Negativo	Negativo	Negativo										
17	108,33	Negativo	Negativo	Negativo									
18	105,48	Negativo	Negativo	Negativo									
19	216,49	56,45	Negativo	Negativo									
20	159,33	Negativo	Negativo	Negativo									
Total	8 de 16	6 de 20	9 de 20	6 de 17									
	50%	30%	45%	35.3%									

Legenda: PAC = Número do paciente no estudo; D= dia de coleta dentro da fase; B AR: Leucemia Linfoblástica Aguda de alto risco de recidiva. B BR: Leucemia Linfoblástica Aguda de baixo risco de recidiva. Valores da quantificação viral em números de cópia/μL.

## ANEXO E

PAC	Prefase+Indução				Consolidação da Remissão				Intensificação	Interfase	Consolidação Tardia	Manutenção
	D0/D1	D8	D15	D35	D1	D15	D29	D50	D15	D8	D29	D1
3	NC	119,93	38,39	0,00	0,00	0,61	3,07	1,63	131,63	128,28	NC	NC
7	NC	0,00	104,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	314,97	0,00	NC	NC
9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	135,44	0,00	NC	NC	NC	NC
10	NC	0,00	0,00	0,00	0,00	NC	0,00	0,00	NC	NC	NC	NC
15	0,00	119,49	0,00	104,79	3,58	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

LLA B  
AR

Legenda: PAC: Número do paciente no estudo; D= dia de coleta dentro da fase; NC= Não coletado; LLA B AR: Leucemia Linfoblástica Aguda de alto risco de recidiva. Valores da quantificação viral em números de cópia/ $\mu$ L.

## ANEXO F

PAC	Prefase+Indução				Consolidação da Remissão			Intensificação	Consolidação Tardia	Manutenção
	D0/D1	D8	D15	D35	D1	D15	D29	D8	D29	D1
1	0,00	0,00	47,27	0,00	NC	0,00	0,00	6992,10	21,90	0,00
2	318,14	0,00	0,00	7763,14	NC	NC	0,00	0,00	NC	NC
4	120359,06	2533,15	18,70	428,38	317,50	22,90	0,00	0,00	NC	0,00
5	NC	108920,66	718978,37	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
6	0,00	1979,72	6,99	0,00	0,00	0,00	0,00	36,85	0,00	NC
8	248,93	0,00	0,78	65,26	0,00	0,00	NC	201,55	NC	NC
11	213,77	0,00	0,00	113,22	0,00	NC	193,82	0,00	NC	NC
12	0,00	0,00	0,00	0,00	NC	0,00	172,84	NC	NC	NC
13	0,00	0,00	65,29	143,80	158,15	99,18	NC	NC	NC	NC
14	0,00	0,00	239,48	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
16	0,00	0,00	0,00	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
17	108,33	0,00	0,00	0,00	NC	NC	NC	NC	NC	NC
18	105,48	0,00	0,00	0,00	NC	NC	NC	NC	NC	NC
19	216,49	56,45	0,00	0,00	NC	NC	NC	NC	NC	NC
20	159,33	0,00	0,00	0,00	NC	NC	NC	NC	NC	NC

LLA B BR

Legenda: PAC: Número do paciente no estudo; D= dia de coleta dentro da fase; NC= Não coletado; LLA B BR: Leucemia Linfoblástica Aguda de baixo risco de recidiva. Valores da quantificação viral em números de cópia/ $\mu$ L.

## ANEXO G

Autor	Grupo de Pacientes	Protocolo de QT	Tamanho da amostra	Material	Microrganismo avaliado	% HSV-1	% Mucosite	% de HSV-1 na mucosite	Tipo de Detecção	Conclusão
Presente estudo	LLA	GBTLI LLA 2009	n=20	Mucosa Bucal	HSV-1	80%	35%	75%	PCR em Tempo Real (quantitativa)	O papel do HSV-1 no surgimento da mucosite bucal não está claro.
Aggarwal et al. (2014)	Pacientes em QT com mucosite (LLA,LMA, Outros)	Não informado	n=32	Mucosa Bucal	HSV-1 HSV-2	-	100%	QUALITATIVO 25% QUANTITATIVO 66%	PCR Qualitativo e Quantitativo ELISA	Não houve associação entre HSV -1 e a gravidade da mucosite ou a idade.
Santos de Faria et al. (2014)	LLA	Não informado (MTX no tratamento)	n=92	Sangue D0 e D7	HSV-1 EBV CMV	64.1% apresentam anticorpos para HSV-1	No D7= 70,7%	-	ELISA	A infecção por HSV-1, EBV e CMV é onipresente na população estudada. HSV-1 pode ser um fator de risco para o aumento da gravidade da mucosite.
*Mendonça et al. (2012)	Crianças com LLA em tratamento com e sem mucosite	GBTLI LLA 99	n=71	Mucosa Bucal D14 e D56	HSV-1 <i>Candida</i> Bactérias	10.37%	D14 = 25.3% (N=71) D56= 19.4% (N=67)	D14 = 44.4% D56= 30.8%	PCR Qualitativo	Presença do HSV e <i>Candida</i> spp. nos dias 14 e 56 do tratamento está associado ao aumento da severidade da mucosite em crianças e adolescentes com LLA.
Chen et al. (2011)	Pacientes em terapia para malignidades hematológicas	Não informado	n= 424	Estudo retrospectivo de registros	HSV-1 <i>Candida</i>	-	100%	21%	Cultura	Resultados sugerem que a <i>Candida albicans</i> e o HSV-1 desempenham um papel importante na mucosite oral induzida por QT em pacientes com doença hematológica maligna.
Djuric et al. (2009)	Pacientes com malignidades diversas	Não informado	n=60	Mucosa Bucal	HSV-1 HSV-2	Por PCR: Antes da QT= 71,7%	60%	-	PCR qualitativa/ Cultura/	Os resultados deste estudo sugerem que a reativação do vírus ocorre independentemente da QT.

	em tratamento					Durante QT= 85%			Imunofluorescência direta.	O papel potencial da reativação do HSV em danos na mucosa oral permanece obscura.
Anirudhan et al. (2008)	LLA	MCP-841	n=70	Mucosa Bucal e sangue	HSV Fungos Bactérias	-	100%	Anticorpos para HSV em 16% 1 caso positivo de HSV na cultura	Cultura e sorologia	Sorologia de herpes é útil na predição de lesões orais recorrentes com HSV em pacientes em QT.
*Figliolia et al. (2008)	LLA	ALL-BFM-95 ALLBFM-2002 BCLSG-93 BCLSG-99	n=169	Mucosa Bucal	Estudou a relação entre quimioterapia e mucosite em diversos protocolos	-	46%	-	-	A mucosite oral induzida por QT deve ser sistematicamente analisada para todos os tratamentos para estabelecer o grau de toxicidade de fármacos usados na QT e melhorar a qualidade de vida de doentes com base em mais abordagens terapêuticas e profiláticas eficazes para prevenção de sua ocorrência.
Ramphal et al. (2007)	Pacientes pediátricos com câncer em terapia e com neutropenia febril	Não informado	n=75	Mucosa bucal e Sangue	HSV	9% (HSV)	33%	20%	PCR Qualitativa	A prevalência da infecção pelo HSV em pacientes com neutropenia febril foi baixa e não foi associada com febre prolongada. Contudo, o HSV oral foi associado com mucosite prolongada e pior resposta ao tratamento inicial.
Sepúlveda et al. (2005)	Pacientes em QT (LLA, LMA e outros)	Protocolo Internacional	n=15 (LLA =10)	Mucosa bucal	HSV-1 Candida	-	100%	Em LLA 57,1%	PCR Qualitativo	Úlceras orais estavam fortemente associadas à presença do HSV-1.

Sepúlveda-Tebache et al. (2003)	Pacientes em terapia oncológica	Não informado	n=19	Mucosa bucal	HSV-1 HSV-2	-	100%	33,3%	ELISA	É muito importante confirmar por testes laboratoriais diagnósticos clínicos de gengivite e lesões ulceradas da cavidade oral em pacientes em terapia oncológica.
Carrega et al. (1994)	Pacientes em tratamento oncológico	Não informado.	n=20	Mucosa bucal	HSV-1 HSV-2	-	100%	HSV em 50%	Cultura	Sugerem que a mucosite oral em crianças recebendo tratamento antineoplásico é provavelmente de origem multifatorial e que HSV pode ser um cofator importante, especialmente em crianças soropositivas para o HSV.

Legenda: QT= quimioterapia; LLA= Leucemia Linfoblástica Aguda; LMA= Leucemia Mieloide Aguda; MTX= metotrexato; D= dia da coleta dentro da fase.