

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

FATORES COADJUVANTES NO AGRAVAMENTO DA MUCOSITE ORAL
RADIOINDUZIDA

Recife – PE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA

FATORES COADJUVANTES NO AGRAVAMENTO DA MUCOSITE ORAL
RADIOINDUZIDA

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Mestrado em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Co-orientador: Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Recife –PE

2008

Correia, Andreza Veruska Lira
Fatores coadjuvantes no agravamento da mucosite oral
radioinduzida / Andreza Veruska Lira Correia. – Recife: O Autor,
2008.

51 folhas: il., fig., tab., quadros.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Odontologia, 2008.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Mucosite oral radioinduzida. 2. Patologia oral. I.Título.

616.31
617.522

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2008-081

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DA PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MESTRADO EM ODONTOLOGIA

COLEGIADO

Profª. Dra. Alessandra Albuquerque T. Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leônidas Gomes

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Cláudio Heliomar Vicente da Silva

Prof. Dr. Etenildo Dantas Cabral

Prof. Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Profª. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Profª. Dra. Lúcia Carneiro de Souza Beatrice

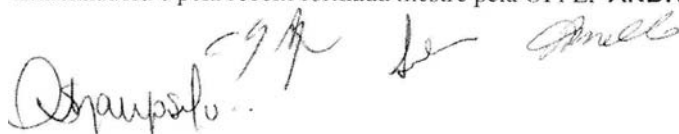
Profª. Dra. Renata Cimões Jovino Silveira

SECRETARIA

Oziclere de Araújo Sena

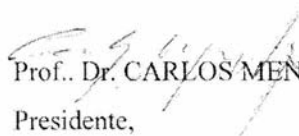
Ata da 68ª Defesa de Dissertação do Curso de Mestrado em Odontologia com área de Concentração em Clínica integrada do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 08 de abril de 2008.

Às 9:00(nove horas) do dia 08(oito) do mês de abril do ano de dois mil e oito, reuniram-se no Auditório do Curso de Odontologia da UFPE, os membros da Banca Examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. CARLOS MENEZES AGUIAR, atuando como presidente, Prof. Dr. ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO, atuando como primeiro examinador, Prof. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI, atuando como segundo examinador, para julgar o trabalho intitulado **“FATORES COADJUVANTES NO AGRAVAMENTO DA MUCOSITE ORAL RADIOINDUZIDA ” da CD ANDREZA VERUSKA LIRA CORREIA** candidata ao Grau de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em CLINICA INTEGRADA, sob orientação da Professora Dra. JUREMA FREIRE LISBOA DE CASTRO e Co-orientação do Prof.Dr. JAIR CARNEIRO LEÃO. Professor Carlos Menezes Aguiar Membro do Colegiado do Programa de Pós Graduação em Odontologia abriu os trabalhos convidando os senhores membros para compor a Banca Examinadora, foram entregues aos presentes cópias do Regimento Interno do Curso de Mestrado em Odontologia, que trata dos critérios de avaliação para julgamento da Dissertação de Mestrado. O presidente da mesa após tomar posse conferiu os membros, seguindo convidou a mestranda. CD **ANDREZA VERUSKA LIRA CORREIA**, para expor sobre o aludido tema, tendo sido concedido trinta minutos. A candidata expôs o trabalho e em seguida colocou-se a disposição dos Examinadores para arguição. Após o término da arguição os Examinadores reuniram-se em secreto para deliberações formais. Ao término da discussão, atribuíram a candidata os seguintes conceitos: Prof. Dr. ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO (**PROVADA**), Prof. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI, (**APROVADA**), Prof. Dr. CARLOS MENEZES AGUIAR (**APROVADA**) a candidata recebeu três conceitos (**APROVADA**) é considerada (**APROVADA**), devendo a candidata acatar as sugestões da Banca Examinadora de acordo com o Regimento Interno do Curso. face a aprovação, fica a candidata, apta a receber o Grau de Mestre em Odontologia, cabendo a UFPE através de sua Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, tomar as providências cabíveis. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Banca Examinadora encerrou a sessão e para constar eu, Ozielere Sena de Araújo Silva, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pela recém formada mestre pela UFPE. **ANDREZA VERUSKA LIRA CORREIA**

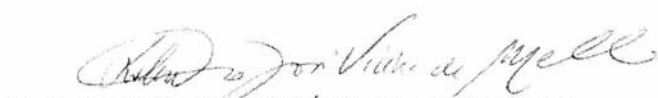




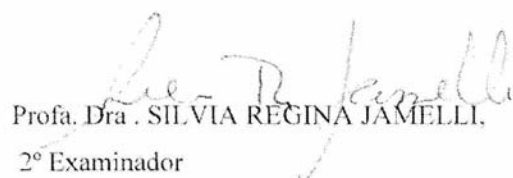
Recife, 08 de abril de 2008.



Prof. Dr. CARLOS MENEZES AGUIAR
Presidente,



Prof. Dr. ROBERTO JOSÉ VIEIRA DE MELLO
1º Examinador



Prof. Dra. SILVIA REGINA JAMELLI,
2º Examinador

DEDICATÓRIA

Aos que transformaram meu mundo: Valdomiro, Manuela, Miguel e Marília...

...e aos que, de alguma forma, já fizeram parte dele.

EPÍGRAFE

“O saber deve ser como um rio, cujas águas doces, grossas, copiosas, transbordem do indivíduo, e se espriem, estancando a sede dos outros. Sem um fim social, o saber será a maior das futilidades.”

Gilberto Freire

Ser Feliz!

"Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise. Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história. É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma. É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um "não". É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo... "

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pelos milagres diários que opera em minha vida e por mostrar que só realizamos aquilo que Ele deseja.

À minha mãe, pelo exemplo de inimaginável coragem, força, dedicação e extremo amor. Sem você, não teria nem ao menos avistado o caminho...

Aos meus irmãos Anézio, Anísio, Andréa e Angélica pelo amor sempre presente, apoio e por mostrarem o significado da palavra união. Vocês plantaram em mim o desejo de ter uma grande família.

Ao meu avô, Manoel Camilo pelo exemplo de honestidade, simplicidade, amor e sabedoria. Que falta você faz!

À minha avó, Maria do Carmo, por ser a imagem e o esteio de uma família tão cheia de coragem!

A minhas tias Fátima, Salete, Estela, Goretti, Cristina e tio Milson, por serem sempre um espelho, dignos de serem seguidos e admirados. Em especial, à Lourdes; você me apresentou aos livros e me mostrou como amá-los...

À Professora, orientadora e amiga Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro pelas lições de paciência, competência e humildade; sobretudo por me orientar como uma mãe orienta ao seu filho: sendo dura nos momentos em que tentei ser rebelde; sábia, quando precisei de conselhos e amiga, quando precisei de amparo. Minha sincera admiração e agradecimentos.

Ao Professor Dr. Jair Carneiro Leão, pela prestimosa colaboração na realização desse trabalho, por estar sempre pronto a ouvir meus tantos lamentos, pela dedicação e ousadia na busca de avanços e condições e pela luta tão bem empreendida para o desenvolvimento do nosso curso.

Às doutoras Regina Mendonça e Marcela de Araújo pela incomensurável ajuda na realização desse trabalho. Jamais terei palavras para expressar minha gratidão.

À minha sogra, Sônia, por ser presença constante e auxílio em todas as horas. E pelo filho lindo também!

AGRADECIMENTOS

À Pós-Graduação em Odontologia e à Universidade Federal de Pernambuco, casa que me enche de orgulho!

Aos todos os professores do curso de Odontologia da UFPE, especialmente ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia por transformarem o árduo dever de transmitir conhecimento em um prazer diário, exemplo de quem ama o que faz.

Aos colegas do Curso de Mestrado Alan Bruno Lira de Farias, Ana Karla de Souza Braz, Anizabele Milet do Amaral Mercês, Bruno Leonardo de Andrade Lima Cabral, Camila Beder, Cristiana Abrantes da Fonte Neves, Daniella Lira do Nascimento, Élvia Christina Barros de Almeida, Glauce Zamorano Holanda, Jouse Bezerra Cavalcanti, Manuela Wanderley Ferreira Lopes, Marcela Agne Alves Valones, Raquel Braz Cavalcanti e Renata Pedrosa Guimarães pelos auxílios nos tantos trabalhos, pelos bons momentos e principalmente, por trazerem uma parte de cada um de vocês à minha vida.

Ao Dr. Ernesto Roesler, pelo exemplo de humanização e amor com os pacientes, e demais funcionários do CERAPE pela enorme ajuda e disponibilidade na realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Cláudia Cazal pela importante contribuição na correção deste trabalho, mostrando que calma e competência podem co-existir.

A todos os funcionários da Pós-Graduação, em especial, à minha querida Ozi, por ser sempre tão doce e prestativa e pela enorme paciência!

Aos pacientes: objeto e, principalmente, objetivo deste estudo.

À amiga Camila; jamais a avistei sem um sorriso no rosto. Você merece muito sucesso!

Isis, você faz muita falta!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RxT - radioterapia

HSV 1 - herpesvirus 1 humano

NF-kB - fator nuclear kappa B

QT - quimioterapia

MV - mega volts

cGy - centigray

DNA - ácido desoxirribonucleico

TNM - classificação taquigráfica dos tumores malignos

NaCl - cloreto de sódio

⁰C - graus Celsius

RPM - rotações por minuto

μL - microlitros

NaI - iodeto de Sódio

PCR - reação em cadeia da polimerase

DFA - *primer consensus* para amplificação do DNA do *HSV 1*

ILK - *primer consensus* para amplificação do DNA do *HSV 1*

KG1 - *primer consensus* para amplificação do DNA do *HSV 1*

IYG - *primer consensus* para amplificação do DNA do *HSV 1*

TGV - *primer consensus* para amplificação do DNA do *HSV 1*

PCO3 - *primer consensus* para amplificação da β-globina

PCO4 - *primer consensus* para amplificação da β-globina

DMSO - dimetilsulfóxido

dNTP - desoxirribonucleotídeos trifosfatados

Taq-Polimerase- *thermos aquaticus* DNA polimerase

TBE - Tris-Borato EDTA

V - Volts

mA - Miliampers

p - Valor de P

pb – Pares de bases

U - Unidades

CEC – carcinoma espinocelular

ARTIGO

FATORES COADJUVANTES NO AGRAVAMENTO DA MUCOSITE ORAL RADIOINDUZIDA

Andreza Veruska Lira Correia

Aluna do Mestrado em Clínica Integrada, Universidade Federal de Pernambuco

Jurema Freire Lisboa de Castro

Doutora em Estomatologia, professora adjunto da Universidade Federal de Pernambuco.

Jair Carneiro Leão

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Endereço para correspondência:

Prof^a Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Doutora em Estomatologia, professora adjunto da Universidade Federal de Pernambuco.

Curso de graduação em Odontologia
Membro permanente do programa de Pós-graduação em Odontologia
Universidade Federal de Pernambuco
Av. Prof. Moraes Rego, 1235
Recife-PE CEP 50670-901
Fone-81-21268338
email- juremalc@terra.com.br

RESUMO

Objetivos: Identificar fatores de risco relacionados ao agravamento da mucosite oral radioinduzida.

Métodos: A amostra foi composta por 33 pacientes portadores de neoplasia maligna de cabeça e pescoço, submetidos à radioterapia. Foram recolhidos dados referentes à idade, gênero, tipo histológico do tumor, estadiamento, localização, hábitos de higiene oral, tabagismo e etilismo, estado de saúde geral, dose e tipo de radiação, e coleta de esfregaço para detecção de DNA do vírus HSV 1 através da PCR. Os pacientes foram examinados a partir da segunda semana de tratamento sendo acompanhados, semanalmente, até o término das aplicações, e classificados de acordo com os critérios de mucosite oral da Organização Mundial da Saúde. Os dados foram avaliados estatisticamente para correlacionar os graus de mucosite com os possíveis fatores considerados.

Resultados: Em 6,1% dos pacientes não houve evidência clínica de mucosite, 24,2% tinham mucosite grau I, 33,3% grau II, 33,3% grau III e 3,0% grau IV. A graduação da mucosite foi mais intensa entre os pacientes mais idosos, do sexo feminino, recebendo 200 cGy através de teleradioterapia de elétrons. Apenas um paciente da amostra mostrou-se positivo para o HSV 1. Nenhum dos dados correlacionados apontaram relação estatisticamente significativa com o grau de mucosite apresentado pelo paciente.

Conclusão: Para a amostra analisada, os fatores de risco como idade, gênero, dose e tipo de radiação empregados, estado de saúde geral, hábitos de higiene oral, e infecção por HSV 1 não demonstraram relação estatisticamente significativa com o agravamento da mucosite oral radioinduzida.

Palavras-chaves: mucosite oral; radioterapia; neoplasias bucais; herpesvirus 1 humano.

CONTRIBUTING FACTORS TO THE AGGRAVATION OF RADIOTHERAPY-INDUCED ORAL MUCOSITIS

ABSTRACT

Objectives: Identify risk factors related to the aggravation of radiotherapy-induced oral mucositis.

Methods: The sample was made up of 33 patients with malignant head and neck tumors submitted to radiotherapy. Data were collected on age, gender, histological type of tumor, stage, location, oral hygiene habits, smoking habits, alcohol intake, general health state, dose and type of radiation, swab collection for DNA detection of HSV 1 virus through PCR. Patients were examined starting with the second week of treatment, followed up on a weekly basis until the end of the applications and classified based on the World Health Organization criteria for oral mucositis. Data were statistically analyzed to correlate the degree of mucositis with the factors considered.

Results: There was no clinical evidence of mucositis in 6.1% of the patients; 24.2% had Grade I mucositis; 33.3% had Grade II; 33.3% had Grade III; and 3.0% had Grade IV. The degree of mucositis was more intense among older patients, the female gender and those receiving 200 cGy through electron radiotherapy. Only one patient tested positive for HSV 1. None of the data indicated a statistically significant correlation with the patient's degree of mucositis.

Conclusion: For the sample analyzed, risk factors such as age, gender, dose and type of radiation, general health state, oral hygiene habits and HSV 1 infections demonstrated no statistically significant correlation with the aggravation of radio-induced oral mucositis.

Key words: oral mucositis; radiotherapy; oral tumors, herpes simplex virus 1

INTRODUÇÃO

A cirurgia e a radioterapia são considerados os principais métodos de tratamento das neoplasias de cabeça e pescoço. Entre 45% e 50% dos pacientes com câncer que têm possibilidades de cura, 70% recebem a radioterapia como modalidade terapêutica¹; entretanto, a ação da radiação ionizante sobre os tecidos resulta em efeitos colaterais importantes como dermatite, xerostomia, ageusia, disfagia, odinofagia, edema em tecidos moles, cárie de radiação, trismo, osteorradionecrose e alterações inflamatórias ou infecciosas da cavidade oral denominadas, genericamente, "mucosite"^{2,3,4}.

A mucosite oral é descrita como uma alteração aguda da mucosa oral irradiada caracterizada por lesões ulcerativas em decorrência da atrofia do epitélio, com presença de um infiltrado inflamatório crônico persistente, eritema e dor⁵. Limita a fala, a mastigação e aumenta os riscos de desenvolvimento de infecções por microorganismos oportunistas⁶. Representa uma complicação comum e dose-limitante da terapêutica oncológica, capaz de tornar necessária a alteração ou até mesmo a interrupção do tratamento com sérias consequências à resposta tumoral e sobrevida do paciente⁷. É associada a um aumento na frequência de internamentos e uso total de nutrição parenteral com incrementos nos custos terapêuticos⁸.

Cerca de 90 a 97% dos pacientes que recebem a RxT, concomitante ou não à quimioterapia, experimentam a ocorrência de mucosite oral^{8,9}. Desses, 34 a 43% apresentam características de mucosite severa (graus III e IV). Relata-se uma incidência global de 9 a 19% de interrupções de RxT ou radioquimioterapia devido a este importante efeito colateral⁸.

Sua etiopatogênese ainda permanece obscura. Fatores relacionados ao tratamento, como a fonte da radiação, dose acumulada, área e volume da mucosa irradiada, fracionamento; e ao paciente, como idade, sexo, estado clínico geral, condição

de saúde bucal, hábitos de consumo do tabaco e do álcool, e outros fatores predisponentes tais como xerostomia ou infecção têm sido apontados como fatores promotores e/ou modificadores da mucosite oral radioinduzida. Entretanto, ainda não há um consenso sobre a natureza dos fatores responsáveis pelo curso severo das mucosites orais¹⁰⁻¹⁴.

Os efeitos citotóxicos indiretos que resultam da liberação de mediadores inflamatórios, perda de constituinte salivares protetores, e da indução terapêutica à neutropenia foram postulados como contribuintes ao seu desenvolvimento e pela promoção na emergência das bactérias, dos fungos, e dos vírus na mucosa oral^{15,16}.

Diante desse contexto, torna-se de fundamental importância a compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos na etiopatogênese e agravamento da mucosite oral radioinduzida, com o objetivo de contribuir para a indicação de terapias eficazes na prevenção e manejo desta importante afecção.

MATERIAL E MÉTODO

Tipo de estudo

O trabalho consistiu de um estudo clínico exploratório representado por uma amostra de conveniência.

Amostra

O universo da amostra foi composto por pacientes admitidos no setor de Radioterapia do Hospital de Câncer de Pernambuco – CERAPE, no período de julho a setembro de 2007 e submetidos a tratamento radioterápico para tratamento de neoplasia maligna nas regiões de cabeça e pescoço. 33 pacientes atenderam aos critérios de inclusão descritos a seguir e compuseram a população estudada.

Critérios de inclusão

Foram elegíveis para compor a amostra pacientes legalmente aptos, submetidos a tratamento radioterápico através do uso de teleradioterapia de elétrons (acelerador linear de 6 MV) ou cobaltoterapia (unidade de Cobalto 60) nas áreas cérvico-facial direita, cérvico-facial esquerda e fossa supra-clavicular com dose fracionada que variou de 180 a 200 cGy/dia estando, no mínimo, na segunda semana de tratamento antineoplásico, período suficiente para o surgimento da mucosite clinicamente detectável^{4,17,18,19}.

Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os pacientes submetidos concomitantemente a tratamento quimioterápico, os indivíduos portadores de doenças sistêmicas - diagnosticadas previamente ao tratamento antineoplásico - ou que fizessem uso de medicamentos que pudessem alterar o fluxo salivar normal, drogas imunossupressoras, bem como os que não aceitaram sua participação na pesquisa.

Definição das variáveis

Foram determinadas como variáveis de controle a idade dos indivíduos, o sexo, a área irradiada, dose e tipo de radiação, a presença ou ausência de elementos dentários, as condições de higiene bucal, condição de saúde geral, hábitos de tabagismo e etilismo e a presença do DNA viral do HSV 1.

Aspectos éticos

Este projeto foi encaminhado previamente à sua execução para apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Pernambuco, tendo sido aprovado sob o número de protocolo 032/2006 (anexo I).

Todos os pacientes foram informados sobre os objetivos do trabalho, bem como sobre a metodologia, tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (apêndice I).

Para preservar a identidade do paciente, no formulário de coleta de dados foram indicados somente as iniciais do nome do pacientes e um número de registro, que foi vinculado ao número do prontuário, cuja utilização se justifica na necessidade de checagem de dados para os exames laboratoriais. Foram seguidos todos os aspectos éticos específicos estabelecidos pelas diretrizes e normas da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

Anamnese e preenchimento da ficha clínica

A triagem dos pacientes elegíveis foi feita através da anamnese e preenchimento da ficha clínica (apêndice II) que constava de informações gerais, dados sócio-demográficos, hábitos, tipo histológico do tumor primário, localização e estadiamento (através do sistema TNM), plano de tratamento, estado de saúde geral, com índice expresso através da escala de Karnofsky²⁰ (apêndice III) e estado de saúde e condição de higiene bucal. A saúde bucal foi categorizada como boa, regular ou ruim, levando-se em consideração a presença de placa bacteriana, restos radiculares, cáries e doença periodontal⁷.

Avaliação clínica da mucosite

A observação clínica da mucosa bucal foi avaliada em intervalos semanais a partir da segunda semana de radioterapia seguindo-se até o término do tratamento. Para isso, utilizou-se uma ficha de avaliação (apêndice IV). Para avaliação da mucosite foi utilizada a escala de toxicidade oral da OMS (Organização Mundial da Saúde) que categoriza a mucosite oral como ausente (grau 0 - mucosa e tecido gengival úmidos e

róseos); grau I (descoloração, aspecto esbranquiçado, possibilitando dieta normal); grau II (eritema, possibilitando dieta normal); grau III (pseudomembrana, requerendo dieta líquida); e grau IV (ulceração profunda, com impossibilidade de ingesta oral - suporte nutricional)⁷. O exame clínico foi realizado através de inspeção visual com uso de abaixador de língua descartável e luz natural.

Raspado citológico

As amostras para verificação da presença do HSV 1 foram obtidas através de raspado citológico da mucosa oral de borda lateral de língua, mucosa labial e mucosa jugal na região dos molares até incisivos, bilateralmente utilizando escova ginecológica estéril (Kolplast® Comercial Industrial do Brasil Ltda). Após as coletas, as escovas foram introduzidas em tubo de ensaio cônico estéril adicionado de 3ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%). Os tubos foram marcados com número de registro e identificação do paciente. O material foi acondicionado em vasilha térmica contendo gelo picado durante o período de transporte até o local de armazenagem definitiva, onde foi submetido a congelamento em refrigerador a uma temperatura de -20°C até o início dos processos de extração e amplificação do DNA viral.

Extração e purificação do DNA das amostras

As amostras foram identificadas e os seus DNA foram extraídos com o kit de extração e purificação de DNA Geneclean® (GENECELAN® Kit, BIO 101, La Jolla, CA) adaptado de acordo com o protocolo sugerido por Leão *et al*²¹. Nesta etapa, os materiais clínicos coletados foram centrifugados a 5.000 RPM por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento (pellet) fio ressuspendido em 400µL de NaI. Para a extração do DNA foram adicionados 10µL de Glass Milk e deixados à temperatura ambiente por 5 minutos agitando-se de vez em quando. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1400 RPM por 5 minutos e o sobrenadante descartado.

Foram adicionados 500µL de New Wash e posteriormente centrifugado a 1400 RPM por 5 minutos, esta etapa foi realizada duas vezes perfazendo um total de duas lavagens. Os sobrenadantes finais foram descartados e incubados a 55°C por 5 minutos no Cool Block (Calor Seco). Após esta etapa foram adicionados 20 µL água livre de nuclease (Promega[®] Madison, WI, EUA) misturando o precipitado com a pipeta. As amostras foram levadas à centrífuga a 1400 RPM por 5 minutos e o sobrenadante que continha o DNA foi extraído cuidadosamente e transferido para um novo ependorff devidamente identificado para ser estocado a -20°C, até ser utilizado na reação de amplificação.

Reação em cadeia da polimerase - PCR

Na reação de amplificação (Nested PCR), foi utilizado no 1º round em multiplex com os primers consensus DFA, ILK e KG1 e um 2º round com os primers consensus IYG e TGV²² (Quadro 1).

A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50µL, sendo constituída por 5 µl de Tampão (1%), 2,5 µL de DMSO (5%), 1,0 µL de desoxinucleotídeos fosfatados (dNTP), 2µL do primer mix, 0,2 µL de TaqPolimerase, 34,3 µL de água milliQ e 5 µL de DNA (para o 1º round) e 5 µL dos produtos da 1ª reação (para o 2º round) . Para o gene da β-globina, as condições para a reação da PCR foram as seguintes: 100-200 ng do DNA da amostra de HSV 1, uma vez diluído (1X) do tampão da Taq DNA polimerase, 0,3 µM do oligonucleotídeo, 1U da Taq DNA polimerase, para uma reação com volume final de 25µL²³.

A relação dos parâmetros dos ciclos da PCR para a amplificação do HSV e do gene da β-globina, com definição da temperatura e tempo de desnaturação inicial (hot start), número de ciclos, temperatura e tempo das etapas de cada ciclo (desnaturação, ligação e extensão), temperatura e tempo da extensão final, estão descritas no quadro 2.

Para a análise do produto da PCR, uma alíquota de 10µL da reação de cada amostra da PCR foi separada em gel de agarose 2% por eletroforese horizontal a 100V, em tampão TBE 1X (tris+ácido bórico 0,089M e EDTA 0,02M). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5µg/mL), para visualização em transluminador de luz ultra violeta (UV). A determinação do tamanho dos fragmentos da PCR amplificados foi realizada por comparação com o marcador de peso molecular “1 kb DNA Ladder Promega® 500 microlitros (100 lanes)” e controle positivo do agente viral estudado. A documentação dos resultados foi feita através do sistema fotográfico EDAS 290 da KODAK®.

Sequenciamento

As amostras amplificadas através dos *primers consensus* foram seqüenciadas através do kit de reação Applied Biosystems ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) em um Seqüenciador automático Applied Biosystems ABI PRISMA® modelo 3700 (Perkin-Elmer) e seus resultados incluídos no Genbank Nucleotide Database (Anexo II)

Análise Estatística

Para análise dos dados foram obtidas distribuições absolutas e percentuais para as variáveis qualitativas ou a variável faixa etária e as medidas estatísticas: média, mediana e desvio padrão para a variável idade. Foi utilizado o teste estatístico Exato de Fisher desde que as condições para utilização do teste Qui-quadrado não foram verificadas. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%.

Os dados foram digitados na planilha Excel e o “software” estatístico utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

RESULTADOS

A amostra foi caracterizada por trinta e três pacientes que atenderam aos critérios de inclusão, sendo 27 (81,8%) do sexo masculino e 6 (18,2%) do sexo feminino, com idades que variaram de 40 a 96 anos, com média de 64,79 anos e desvio padrão de 12,81 anos. A mediana obtida foi 65,00 anos. 63,6% dos pacientes tinham de 61 a 96 anos.

Quanto ao diagnóstico histopatológico, 93,6% das lesões foram representadas pelo CEC (carcinoma espinocelular); as localizações mais frequentes foram: língua (27,3%), assoalho bucal (18,2%), rinofaringe (15,2%) (tabela 1).

Quanto à classificação TNM, em 39,4% dos casos o estadiamento não estava registrado e para 36,4% da amostra, foi classificada em estadiamento IVa (tabela 1).

Os pacientes irradiados através do uso de acelerador linear representaram 33,3% da amostra; e 66,7% foram irradiados utilizando-se Cobalto-60. A dose empregada mais frequentemente foi de 180 cGy/dia (72,7%) e, 27,3% dos pacientes receberam uma dose de 200 cGy/dia.

Grande parte da amostra foi constituída por pacientes edêntulos (54,5%). Entre os pacientes dentados, 3% apresentavam um estado de higiene bucal considerado bom e 21,2% apresentavam condição de higiene bucal regular. Uma mesma percentagem apresentava um nível de higiene bucal ruim.

Quanto ao estado de saúde geral, 36,4% dos pacientes enquadravam-se no valor de 90 da escala de Karnofsky, 27,3% no valor de 70 e 21,2% com escore 100.

A maioria (78,8%) dos pesquisados possuía hábito do tabagismo e etilismo; 12,1% relatavam o uso de tabaco isoladamente e apenas 9,1% dos pacientes negavam qualquer hábito.

Foi verificado que 18,2% dos pacientes pesquisados referiram a ocorrência de algum episódio de herpes simples recorrente.

Os resultados da amplificação do DNA viral através da PCR demonstraram que 4 dos 33 pacientes avaliados apresentaram positividade para algum membro da família *herpesviridae*.

Após o seqüenciamento do DNA, foi evidenciado que 3 dos 4 pacientes (9,1%) apresentaram positividade para o herpes tipo 4 (HHV 4 - EBV - *Epstein Barr*) e que apenas 1 dos 33 pacientes avaliados (3,0%) apresentou a expressão do DNA viral do HSV 1 no raspado citológico obtido (figuras 1 e 2).

Dentre os pacientes estudados 93,9% apresentaram algum grau de mucosite, sendo que em 36,3% dos casos, a mucosite foi categorizada como grave (graus III e IV). 33,3% apresentaram mucosite clinicamente classificada como grau II, igual proporção como grau III e 24,2% com mucosite grau I. A ausência de alteração na mucosa bucal foi observada em 6,1% da amostra (figuras 3, 4, 5 e 6).

Considerando as faixas etárias, a maior diferença percentual ocorreu nos casos de mucosite severa, sendo estas lesões mais prevalentes entre os indivíduos mais idosos, no entanto, não se comprova associação significativa entre faixa etária e o grau da mucosite ao nível de significância considerado ($p > 0,05$, Teste Exato de Fisher). Em relação ao sexo, obtivemos um percentual de pacientes com mucosite severa mais elevado no sexo feminino do que entre pacientes do gênero masculino

(66,7% x 29,6%) entretanto sem associação significativa entre as duas variáveis analisadas (tabela 3).

O percentual de pacientes com mucosite severa foi mais elevado entre os pacientes irradiados através do acelerador linear (45,5% x 31,8%), porém não se comprova associação significativa entre o tipo de aparelho e o grau da mucosite ($p > 0,05$ Teste Exato de Fisher).

Em relação à dose empregada, um maior número de casos de mucosite severa foi mais elevado entre os irradiados na dose 200 cGy do que 180 cGy (50,0% x 32,0%), porém estatisticamente insignificante através do teste aplicado (Teste Exato de Fisher).

DISCUSSÃO

Ao relacionar as características da amostra aos dados da literatura, encontra-se concordância no que concerne a idade e o sexo para o câncer de cabeça e pescoço, já que segundo dados de Gervásio *et al.*²⁴, Brasil²⁵, Antunes *et al.*²⁶, Brener *et al.*²⁷, este tipo de neoplasia atinge predominantemente a faixa etária acima dos 50 anos de idade, numa proporção de 4,8 homens para 1 mulher. Sendo o câncer uma doença degenerativa de caráter multifatorial, o envelhecimento atuaria como um fator de risco significativo envolvendo indivíduos mais velhos, especialmente se expostos a agentes carcinógenos como o tabaco e o álcool que, juntos, apresentam um efeito sinérgico e dose-dependente²⁵⁻³¹, sendo o hábito do tabagismo e etilismo fortemente associado ao sexo masculino.

Para a amostra analisada, o carcinoma epidermóide aparece como a variante histológica mais freqüente, sendo a língua o local de maior ocorrência das lesões seguido do assoalho de boca e rinofaringe, o que concorda com os estudos de Gervásio *et al.*²⁴, Brener *et al.*²⁷, Moore *et al.*³². A atuação do tabaco associado ao uso do álcool na carcinogênese bucal poderia ser sugerida como fator relevante na ocorrência de tumores

nessas regiões visto que, constituem-se como porta de entrada para atuação desses potentes carcinógenos.

Neste estudo, 39,4% dos pacientes não possuíam em seu prontuário a informação referente ao estadiamento da lesão maligna. O sistema TNM de classificação de tumores malignos, da União Internacional de Combate ao Câncer, permite inferir sobre o comportamento biológico do tumor, selecionar e avaliar as condutas terapêuticas, estimar prognósticos, facilitar a troca de informações entre os especialistas e contribuir para a pesquisa oncológica, a partir da padronização de resultados publicados. A adequada aplicação desse sistema torna-se essencial para a qualidade e confiabilidade de registros médicos, protocolos de condutas terapêuticas, parametrização de processos avaliativos e comparativos de resultados terapêuticos, e troca de informação fluente entre especialista e instituições, em todo o mundo³³. A ausência dessa classificação denota a dificuldade encontrada pelo profissional de saúde na comunicação intra e interdisciplinar e a necessidade de criação de mecanismos que possam facilitar o registro de informações em saúde.

Trotti et al.⁸, em revisão sistemática envolvendo 2875 pacientes, afirmaram que 97% dos indivíduos submetidos a tratamento radioterápico convencional desenvolveram algum grau de mucosite. A associação entre radioterapia e quimioterapia, resultou em mucosite oral em 89% dos casos, comparados apenas a 22% que desenvolvem mucosite oral pela realização de quimioterapia exclusiva. Resultados semelhantes foram observados no grupo de pacientes analisados denotando a importância da inserção do cirurgião-dentista na equipe multidisciplinar, buscando a criação e utilização de protocolos terapêuticos que visem a minimização deste importante efeito colateral. Entre as medidas preventivas utilizadas, o desenvolvimento de um abrangente programa de cuidados orais permite intervenções que objetivam o manejo e o controle da dor, a

promoção de nutrição e de hidratação adequadas, identificação de infecções e acompanhamento das mudanças na cavidade oral⁴.

A adequação bucal antes do início do tratamento foi realizada em estudo de Cardoso *et al*⁴, que embora tenha relatado algum grau de mucosite em 100% dos 12 pacientes avaliados, não observou nenhum caso de mucosite severa. Esse resultado pode estar relacionado à aplicação de medidas preventivas de adequação bucal antes do início do tratamento, bem como a manutenção dessas medidas durante o período de vigência da RxT. Os pacientes que compuseram a amostra não foram submetidos a protocolo de tratamento, orientações de higiene ou medidas odontológicas preventivas no período que antecedeu à radioterapia. A ausência de cuidados odontológicos pode ser citada como importante fator contribuinte para uma maior ocorrência de casos graves de mucosite oral na população estudada.

Quando a dose radioterápica diária é de 200 cGy, as manifestações clínicas da depleção epitelial aparecem mais precocemente do que quando o paciente recebe 180 cGy/dia, devido ao desequilíbrio entre a morte celular e a repopulação epitelial, causado por maior dose diária⁵; no grupo de pacientes estudado, embora não tenha se verificado associação significativa entre o grau máximo de mucosite e a dose de radiação empregada no tratamento, um maior número de pacientes submetidos a 200 cGy experimentaram a ocorrência de quadros mais graves de mucosite oral. Embora a literatura não relacione a dose empregada à severidade da mucosite, o resultado obtido no estudo pode ser explicado pela presença de outros fatores de risco envolvidos no agravamento da mucosite oral.

Em contraste aos relatos escassos e conflitantes referente à atuação do HSV 1 durante a RxT, essa infecção tem sido amplamente estudada durante a QT imunossupressiva bem como durante o transplante de células tronco hematopoiéticas,

sendo considerado um importante componente da mucosite induzida por QT, com incidência de 60%³⁴⁻³⁸. Esses resultados podem ser explicados pela imunossupressão experimentadas por esses pacientes como importante papel na reativação do HSV 1. A amostra foi composta por pacientes que, em sua maioria, apresentavam índices satisfatórios de saúde geral, sem evidências clínicas ou laboratoriais de imunossupressão importante, fato que poderia explicar o baixo índice de reativação do HSV 1 no grupo de pacientes estudados. Além disso, o tratamento quimioterápico inclui freqüentemente em seus protocolos o uso de agentes imunossupressores tais como corticosteróides³⁹, drogas raramente utilizadas em programas de radioterapia.

Ademais, durante os períodos de latência, não há expressão de proteínas virais necessárias para a replicação do DNA⁴⁰ o que poderia, em parte, esclarecer a baixa positividade do DNA do HSV 1 na amostra pesquisada.

Embora estudos soroepidemiológicos apontem que mais de 90% da população mundial, especialmente a partir da 4ª década de vida, possuam anticorpos séricos contra pelo menos uma das cepas de HSV⁴¹, apenas 40% desses indivíduos possuem sensibilidade para desenvolverem manifestações herpéticas secundárias⁴². Para Wade⁴³, apenas 10 a 20% dos pacientes infectados se definem como portadores do herpes simples; e até 60% dos indivíduos com sorologia positiva para o HSV apresentam quadros assintomáticos ou oligossintomáticos não reconhecidos pelos próprios pacientes. Nenhuma ocorrência de infecção primária ou recorrente por herpesvírus humano foi observada durante o estudo, conquanto, 18,1% dos pesquisados referiam ter experimentado em algum momento, quadros de herpes simples recorrente, fato que denota a necessidade de maiores informações sobre esta importante e prevalente afecção.

Rand *et al.*⁴⁴, Nicolatou-Galitis *et al.*^{45,46} e Oakley *et al.*⁴⁷ relataram em seus estudos uma correlação positiva entre a ocorrência de mucosite oral severa e a presença do HSV 1. Entretanto, Redding *et al.*⁴⁸ assim como Bublely *et al.*³⁹ não obtiveram uma correspondência entre a presença do vírus HSV 1 e os graus de severidade da mucosite oral, assim como não obtiveram resposta satisfatória quando do emprego de agentes antivirais nas populações estudadas.

Uma explicação para a discrepância desses achados pode ser encontrada na população de pacientes envolvidos. A maioria dos estudos que referem o HSV 1 como co-fator no agravamento das lesões de mucosite envolve pacientes submetidos a esquemas quimioterápicos que incluem drogas imunossupressoras, com possível surgimento de neutropenia. A utilização de agentes antifúngicos pode também, através de uma redução na ocorrência de candidíase bucal, mascarar a severidade nos graus de mucosite oral nesses grupos de pacientes. Por outro lado, dificuldades técnicas na obtenção de cultura viral, utilizada na maioria dos estudos, pode ser apontada como hipótese para a baixa positividade da presença do HSV 1 em raspados citológicos obtidos de ulcerações de pacientes submetidos a tratamento antineoplásico.

Neste estudo, embora exploratório devido à pequena amostra de pacientes, não se verificou associação significativa entre a presença de infecção por HSV 1 e os quadros graves de mucosite oral radioinduzida, sugerindo que a infecção recorrente de HSV não é uma causa ou um co-fator principal de lesões da boca na maioria de pacientes que recebem estes regimes de tratamento para o câncer da cabeça e do pescoço.

Um achado ocasional foi a presença do DNA viral do HHV 4 em três pacientes. O vírus Epstein Barr é um vírus da família *Herpesviridae*, que causa a mononucleose infecciosa, em humanos. Existe forte correlação entre a infecção latente pelo EBV e o

desenvolvimento de diversos tumores malignos, como o linfoma de Burkitt, a doença de Hodgkin, o linfoma B e o carcinoma nasofaríngeo. Há, também, evidências de que o EBV possa estar associado a outras neoplasias malignas, principalmente a carcinomas gástricos, carcinomas mamários, leiomiossarcomas, linfomas T e carcinomas linfoepitelioma-like de glândulas salivares, pulmão e timo. Proteínas expressas pelo EBV atuam diretamente, como oncogene, estimulando a proliferação das células infectadas. Além disso, o DNA viral, ao integrar-se ao genoma do hospedeiro, pode causar mutações em genes reguladores do ciclo celular, sobretudo no gene supressor tumoral, p53, favorecendo o surgimento de células neoplásicas⁴⁹, entretanto nenhuma descrição da literatura correlaciona a presença deste vírus no agravamento da mucosite oral radioinduzida, embora não se descarte sua participação com co-fator em pacientes imunossuprimidos devido à sua característica epiteliotrófica.

CONCLUSÕES

Para a amostra analisada neste estudo, os fatores de risco como idade, sexo, estado de saúde geral, hábitos de higiene oral, tabagismo, etilismo e presença de infecções por herpesvirus humano 1 não apresentaram relação estatisticamente significativa com os graus de mucosite oral desenvolvidos por este grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Van De Wiele C, Signore A, Scopinaro F, Waterhouse R, Dierckx RA. Imaging tumour hypoxia: where are we? Nucl Med Commun 2001;22:945-7.
2. Sannomiya EK, Furukawa S. Different methods of radiotherapy in oral cancer and its complications. Rev Bras Odontol 2000;57(5):336-8.
3. Labbate R, Lehn CN, Denardin OVP. Efeito da clorexidina na mucosite induzida por radioterapia em câncer de cabeça e pescoço. Rev Bras Otorrinolaringol 2003;69(3):349-54.
4. Cardoso MFA, Novikoff S, Tresso A, Segreto RA, Cervantes O. Prevenção e controle das seqüelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. Radiol Bras 2005;38(2):107-15.
5. Magalhães MHCG, Candido AP, Araújo NS. Seqüelas bucais do tratamento radioterápico em cabeça e pescoço – protocolo de prevenção e tratamento. Rev Pós Grad 2002;9(1):7-11.
6. Spijkervet FK, Van Saene HK, Panders AK, Vermey A, Mehta DM. Scoring irradiation mucositis in head and neck cancer patients. J Oral Pathol Med 1989;18(3):167-71.
7. Kelner N, Castro JFL. Laser de baixa intensidade no tratamento da mucosite oral induzida pela radioterapia: relato de casos clínicos. Rev Bras de Cancerol 2007;53(1):29-33.
8. Trotti A, Bellm LA, Epstein JB. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. Radiother Oncol 2003;66:253–62.

9. Berger AM, Dickinson F. Oral complications. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Cancer principles and practice of oncology. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005, p.2523–24.
10. Rugg T, Saunders MI, Dische S. Smoking and mucosal reactions to radiotherapy. Br J Radiol 1990;63:554-56.
11. Franzen L, Funegard U, Ericson T, Henriksson R. Parotid gland function during and following radiotherapy of malignancies in the head and neck. A consecutive study of salivary flow and patient discomfort. Eur J Cancer 1992;28:457-62.
12. Verdi CJ. Cancer therapy and oral mucositis. An appraisal of drug prophylaxis. Drug Saf 1993;9:185-95.
13. Dib LL, *et al.* Abordagem multidisciplinar das complicações orais da radioterapia. Rev APCD 2000;54:391-6.
14. Antonio AMMP, Maia FAZ, Dias RB. Reações adversas da radioterapia: cuidados pré, trans e pós operatório. Rev Odonto 2001;9(19):12-9.
15. Ferretti GA, Raybould TP, Brown AT, *et al.* Chlorhexidine prophylaxis for chemotherapy and radiotherapy-induced stomatitis: a randomized double-blind trial. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990;69:331-38.
16. Köstler WJ, Hejna M, Wenzel C, Zielinski CC. Oral mucositis complicating chemotherapy and/or radiotherapy: options for prevention and treatment. CA Cancer J Clin 2001;51:290-315.
17. Baker DG. The radiobiological basis for tissue reactions in the oral cavity following therapeutic x-irradiation. A review. Arch Otolaryngol 1982;108:21-24.

18. Handschel J, Sunderkötter C, Prott FJ, Meyer U, Kruse-Lösler B, Joos U. Increase of RM 3/1- positive macrophages in radiation induced oral mucositis. *J Pathol.* 2001;193(2):242-7.
19. Bonan PRF, Lopes MA, Alves FA, Almeida OP. Aspectos clínicos, biológicos, histopatológicos e tratamentos propostos para a mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol* 2005;51(3):235-42.
20. Schag CC, Heinrich RL, Ganz PA. Karnofsky performance status revisited: Reliability, validity, and guidelines. *J Clin Oncology* 1984;2:187-93.
21. Leão JC, Hinrichsen SL, de Freitas BL, Porter SR. Human herpes virus 8 and Kaposi's sarcoma. *Rev Assoc Med Bras* 1999;45(1):55-62.
22. VanDevanter DR, Warren P, Bennett L, Schultz ER, Coulter S, Garber RL, Rose TM. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1666-71.
23. Mendonça, RMH. Associação entre a presença de microorganismos da microbiota oral e a intensidade da mucosite oral, em pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda, submetidos ao tratamento antineoplásico. [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas; 2008.
24. Gervásio O, Dutra R, Tartaglia S, Vasconcellos W, Barbosa A, Aguiar, MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a brazilian population. *Braz Dent J* 2001;12(1):57-61.
25. Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA. *Ver Bras Cancerol* 2002;48(3):317-32.
26. Antunes AA, Antunes AP, Silva PV, Avelar RL, Santos TS. Câncer da língua: estudo retrospectivo de vinte anos. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço* 2007;36(3):152-54.

27. Brener S, Jeunon F, Barbosa A, Grandinetti H. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Cancerol* 2007;53(1):63-9.
28. Leite ICG, Koifman S. Revisão dos fatores de risco para o câncer de boca e faringe. *Rev Bras Cancerol*. 1998;44:317-25.
29. Dikshit RP, Kanhere S. Tobacco habits and risk of lung, oropharyngeal and oral cavity cancer: a population-based case-control study in Bhopal, India. *Int J Epidemiol*. 2000;29(4):609-14.
30. Adewole RA. Alcohol, smoking and oral cancer. A 10-year retrospective study at Base Hospital, Yaba. *West Afr J Med*. 2002;21(2):142-5.
31. Reibel J. Tobacco and oral diseases. Update on the evidence, with recommendations. *Med Princ Pract*. 2003;12 Suppl 1:22-32.
32. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis*. 2000;6(2):75-84.
33. Gadelha MI, Costa MR, Almeida RT. Estadiamento de tumores malignos - análise e sugestões a partir de dados da APAC. *Rev Bras Cancerol* 2005;51(3):193-99.
34. Saral R, Burns WH, Laskin OL, Santos GW. Acyclovir prophylaxis of herpes-simplex-virus infections: a randomized, double blind, controlled trial in bone marrow transplant recipients. *N Engl J Med* 1981;305:63-7.
35. Greenberg M, Cohen S, Boosz B, Friedman H. Oral herpes simplex virus infections in patients with leukemia. *J Am Dent Assoc* 1987;114:483-486.
36. Epstein JB, Sherlock C, Page JL et al (1990) Clinical study of herpes simplex virus infection in leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:38-43.

37. Schubert MM, Peterson DE, Flournoy N, *et al.* Oral and pharyngeal herpes simplex virus infection after allogeneic bone marrow transplantation: analysis of factors associated with infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:286–293.
38. Carrega G, Castagnola E, Canessa A, *et al.* Herpes simplex virus and oral mucositis in children with cancer. *Support Care Cancer* 1994;2:266–69.
39. Bublely GJ, Chapman B, Chapman SK, Crumpacker CS, Schnipper LE. Effect of acyclovir on radiation- and chemotherapy-induced mouth lesions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(6):862–65.
40. Wagner EK, Guzowski JF, Singh J. Transcription of the HSV genome during productive and latent infection. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995;51:123-65.
41. Lupi O, Silva AG, Pereira AC. Herpes simples genital: uma pandemia. *An Bras Dermatol* 1996;71(1):59-61.
42. Woo S, Lee SF. Oral recrudescence herpes simplex virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;83(2):239-43.
43. Wade JC, Newton B, Flournos N, Myers JD. Oral acyclovir for prevention of herpes simplex virus reactivation after bone marrow transplantation. *Ann Intern Med* 1989;33:823-28.
44. Rand K, Kramer B, Johnson A. Cancer chemotherapy associated symptomatic stomatitis: role of herpes simplex virus. *Cancer* 1982;50:1262-65.
45. Nicolatou-Galitis O, *et al.* Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infection in radiation-induced oral mucositis. *Support Care Cancer* 2006;14:753–62.
46. Nicolatou-Galitis O, Dardoufas K, Markoulatos P, *et al.* Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck

cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. *J Oral Pathol Med* 2001;30:471–80.

47. Oakley C, Epstein JB, Sherlock CH. Reactivation of oral herpes simplex virus. Implications for clinical management of herpes simplex virus recurrence during radiotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997;84:272–78.

48. Redding SW, Luce EB, Boren MW (1990) Oral herpes simplex virus infection in patients receiving head and neck radiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 69:578–580.

49. Silva AR, Zucoloto S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. *Medicina* 2003;36:16-23.

QUADROS

Quadro 1 - Sequência do oligonucleotídeos para os HSV vírus

Vírus	oligonucleotídeos	Sequência (5'→ 3')
HSV	DFA	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC
	ILK	TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTAA
	KG1	GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT
	IYG	CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT
	TGV	TGTAACCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT
β-globina	PCO3	CTTCTGACACAACCTGTGTTCCTAGC
	PCO4	TCACCACCAACTTCATCCAGCTTCACC

Quadro 2 - Parâmetros dos ciclos da PCR e tamanho do fragmento amplificado, para a identificação do HSV e do gene da β-globina.

Parâmetros dos ciclos de PCR												
Vírus	“Hot start”		Ciclos	Desnaturação		Ligação		Extensão		Extensão final		Fragmento
	°C	T		°C	T	°C	T	°C	T	°C	T	
HSV	94	3'	40	94	30''	48	1'	72	1'	72	7'	280
β-globina	94	5'	35	94	1'	55	1'	57	1'30''	72	10'	123

TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de dados segundo o diagnóstico histopatológico, localização, estadiamento do tumor, tipo de aparelho utilizado na RxT e dose utilizada.

Variável	n	%
• Diagnóstico histopatológico		
CEC	31	93,9
Carcinoma <i>in situ</i>	1	3,0
Tumor de células claras	1	3,0
• Localização		
Língua	9	27,3
Assoalho	6	18,2
Rinofaringe	5	15,2
Laringe	3	9,1
Palato	3	9,1
Orofaringe	1	3,0
Seio periforme	2	6,1
Trígono retromolar	1	3,0
Parótida	1	3,0
Seio maxilar	1	3,0
Glândula submandibular	1	3,0
• Estadiamento do tumor		
0	1	3,0
II	2	6,1
III	2	6,1
IVÃ	12	36,4
IVb	3	9,1
Não informado	13	39,4
• Aparelho utilizado para a radiação		
Acelerador linear	11	33,3
Cobalto 60	22	66,7
• Dose		
180	25	75,8
200	8	24,2
TOTAL	33	100,0

*Fonte: Hospital de Câncer de Pernambuco

Tabela 2 – Avaliação segundo o grau de mucosite oral.

Variável	N	%
• Grau da mucosite clínica		
0	2	6,1
I	8	24,2
II	11	33,3
III	11	33,3
IV	1	3,0
TOTAL	33	100,0

* Fonte: Hospital de Câncer de Pernambuco

Tabela 3 – Avaliação do grau máximo de mucosite segundo a faixa etária e o sexo.

Variável	Máximo grau de mucosite						TOTAL		Valor de p
	Sem mucosite		Leve		Severa				
	N	%	n	%	N	%	n	%	
• Faixa etária									
40 a 60	1	8,3	7	58,3	4	33,3	12	100,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
61 a 96	1	4,8	12	57,1	8	38,1	21	100,0	
• Sexo									
Masculino	2	7,4	17	63,0	8	29,6	27	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,251
Feminino	-	-	2	33,3	4	66,7	6	100,0	
Grupo Total	2	6,1	19	57,6	12	36,4	33	100,0	

(1): Através do teste Exato de Fisher

* Fonte: Hospital de Câncer de Pernambuco

FIGURAS

Figura 1. Documentação do resultado da técnica da PCR, com amostras coradas com brometo de etídio.

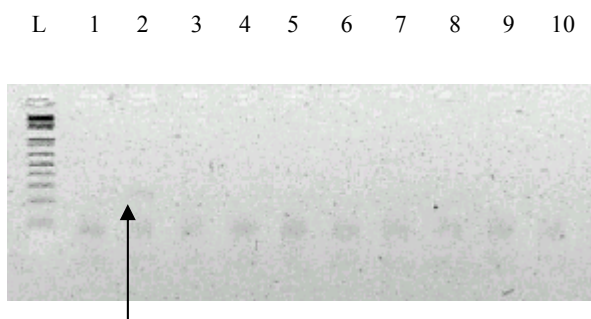


Figura 2. Documentação do resultado da técnica da PCR, com amostras coradas com brometo de etídio

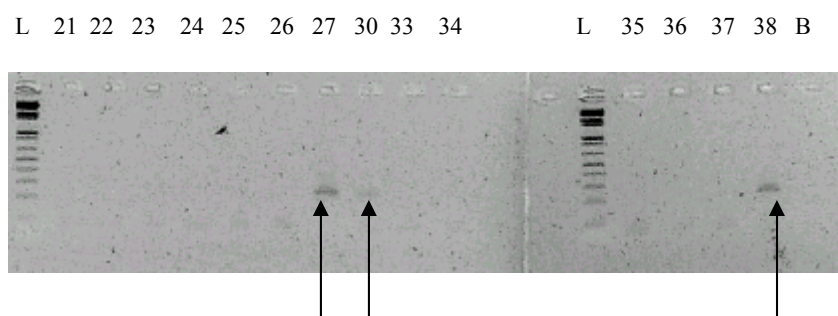




Figura 3. Paciente apresentando mucosite oral grau II.



Figura 4. Paciente apresentando mucosite oral grau II.

* Fonte: Hospital de Câncer de Pernambuco



Figura 5. Paciente apresentando mucosite oral grau III.



Figura 6. Paciente apresentando mucosite oral grau IV

* Fonte: Hospital de Câncer de Pernambuco

ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto de Pesquisa nº 032/2006 intitulado "AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO DNA VIRAL (HSV-1 E HSV-2) EM PACIENTES PORTADORES DE MUCOSITE ORAL", apresentado pela pesquisadora Andreza Veruska Lira da Silva, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer -SPCC/HCP,

Recife, 21 de novembro de 2006.

Atenciosamente,



Dr. Felipe Lorenzato
Coordenador
Comissão de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Pernambuco

Dr. Felipe Lorenzato
Assessor de Pesquisa Científica
Coordenador de Ensino e Pesquisa Científica -CEPC
Hospital de Câncer de Pernambuco -HCP/SPCC



Av Cruz Cabarga 1.597
Santa Amaro-Recife/PE
CEP: 50040-000
PABX - (81) 3423.2068
www.hospocancer.pe.org.br

SEQUENCIAMENTO

(Amostras Positivas para HSV)

Paciente 27

GTAATAAGGGGATTCCGGCCAATGACTGCACATTGGCGTCACTTGTGACG
ACCATCGGCCGCGAGATGCTGCTCGCGACCCGCGAGTACGTCCACGCGCG
CTGGGCGGCCTTCGAACAGCTCCTGGCCGATTTCCCGGAGGCGGCCGACA
TGCGCGCCCCCGGGCCCTATTCCATGCGCATCATCTACGGCGACACGGAC
TCTGTG

(Resultado: herpes 1)

Paciente 2

GAAAAAATGGGGGGAGGATTACGGCGGCGGGACTCTGTGAAGCTGCAG
GCCGCACGATGTCGGAGCGGGCCAAGGCCTTCGTGGAGGCCCTGAGCCCC
GCCAACCTGCAGGCCCTGGCCCCCTCCCCGGACGCCTGGGCGCCCCCTCAA
CCCCGAGGGCCAGCTTCGAGTCATTTACGGCGACACGGACTCTGTGA

(Resultado:Herpes 4)

Paciente 30

GAACTCGGTGTATGGATTTANGNGGNTACGGACTCNGTGAACGCTGCAGG
NCCGCACGATGTTGGAGCGGGGCCAAGGCCTTCGTGGAGGCCCTGAGCCC
CGCCAACCTGCAGTCCCTGNGCCCCCTCCCCGGACGCCTTGCGCGCCCCC
TCAACCCCGAGGGCCAGCTTCGGAGTCATTTTANGGGGAAACGGGNNTCT
TNNGANANNNGNGGGNTNGNGGGGCGNNAGGGAGANGAGATNTANAAGG

(Resultado:Herpes 4)

Paciente 38

AAAATAAACCTCCTTTTCATTGGAATTCCCGGTGATCGCCACTCACGTAA
CGCTGCAGGGCCGCGACGATGTTGGAGCGGGCCAAGGCCTTCGTGGAGGCC
CTGAGCCCCGCCAACCTGCAGGCCCTGGCCCCCTCCCCAGACGCCTGGGC
GCCCCTCAACCCCGAGGGCCAGCTTCGAGTCATCTATGGCGACACGGACT
CTGTG

(Resultado:Herpes 4)

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: FATORES COADJUVANTES NO AGRAVAMENTO DA MUCOSITE ORAL RADIOINDUZIDA

Orientanda: Andreza Veruska Lira Correia

Orientadora: Profa. Dra. Jurema Freire Lisboa de Castro

Co-Orientador: Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Objetivo: Identificar fatores de risco que possam atuar no agravamento da mucosite oral radioinduzida.

Metodologia: Estudo constituído pela entrevista do paciente e avaliação de prontuário, bem como de coleta de material através do esfregaço de amostras oriundas de mucosa jugal, língua e mucosa labial de pacientes submetidos a tratamento de radioterapia (RxT) atendidos Hospital do Câncer de Pernambuco - CERAPE - e que aceitem sua participação na referida pesquisa através da assinatura do presente termo.

Benefícios: Esta pesquisa procura avaliar a relação existente entre idade, gênero, tipo e dose de radiação, estado de saúde oral, estado de saúde geral, etilismo, tabagismo e a presença do *Herpesvírus 1 Humano (HSV 1)* e a ocorrência de quadros de mucosite persistentes, através de técnica de detecção viral (PCR). Caso seja comprovada sua relação, medidas terapêuticas preventivas poderão ser utilizadas em pacientes portadores do vírus minimizando assim o surgimento da mucosite, tão prejudicial ao tratamento do paciente.

Eu, _____

Abaixo assino, tendo sido esclarecido das informações acima, ciente e consciente dos meus direitos abaixo relacionados, inclusive que não receberia nenhum benefício financeiro por minha participação e que poderei retirar esta declaração de participar do presente estudo a qualquer época da pesquisa para dissertação do curso de mestrado em clínica integrada do curso de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco. Autorizo ainda através desse termo, a divulgação dos resultados em revistas e reuniões científicas.

DIREITOS:

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa.
2. A liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar, de participar no estudo sem que isso me traga prejuízo à continuação do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido caráter confidencial da informação relacionada com minha privacidade.

4. A disponibilidade de tratamento médico e a indenização que legalmente teria direito por parte da pesquisadora, em caso de danos que justifiquem, diretamente causados pela pesquisa
5. O compromisso de proporcionar-me informações atualizadas durante o estudo ainda que este possa afetar a minha vontade de continuar participando
6. Caso existirem gastos adicionais estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa
7. Poderei contatar o Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - SPCC/HCP para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa ou ensaio clínico através do telefone 3217-8000, o qual encaminhará o procedimento necessário.

Tendo ciência do exposto acima, desejo participar da pesquisa

Recife, _____ de _____ de 20____

Assinatura do Paciente

RG: _____

CPF: _____

Assinatura do pesquisador

Assinatura do Orientador

Testemunha

Testemunha

Andreza Veruska Lira da Correia
Fone: 88533812
CRO/PE: 6737

APÊNDICE IINº do Paciente
_____Data
_____Registro Geral
_____**FICHA CLÍNICA**

Nome: _____

Data: _____

Procedência: _____

Filiação: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ anos e ____ meses

Gênero: _____ Estado Civil: _____ Profissão: _____

Identidade: _____ CPF: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Médico Responsável: _____

Diagnóstico: _____ CID: _____

Localização: _____ TNM: _____

Hábitos: **Tabagismo** () **Tempo:** _____ **Etilismo** () **Tempo:** _____

Passado Clínico: _____

Passado Cirúrgico: _____

Histórico Familiar: _____

QP/HDA: _____

Associação: _____ Finalidade: _____

Área Irradiada: _____

Aparelho Utilizado: _____

Dose / Área / Dia: _____ N° Campos / Área / Dia: _____

Início: _____ Término: _____

Passado Odontológico: _____

Estado Oral Atual:

Restos rad. () Cáries () Dça. Period. () _____

Trauma () _____

Condição de Saúde Oral: () Boa () Regular () Ruim

Condição de Saúde Geral: _____

Outras Alterações na Mucosa: _____

Passado de Herpes: _____

Outras Observações: _____

FICHA DE AVALIAÇÃO

Paciente: _____

Nº: _____

Registro Geral: _____

Aspectos Clínicos

Graduação da mucosite	E.O.I.	1 ^a semana	2 ^a semana	3 ^a semana	4 ^a semana	5 ^a semana	6 ^a semana	7 ^a semana
Grau O								
Grau I								
Grau II								
Grau III								
Grau IV								

Graus da Mucosite

Pontuação da mucosite	0	I	II	III	IV
Parâmetros clínicos	Nenhuma alteração	Aspecto esbranquiçado	Eritema	Camada branca	Úlceras
Prejuízo Funcional	Nenhum sintoma	Pouco dolorido	Dor leve ingere sólidos	Não ingere sólidos	Suporte nutricional

Fonte: WHO (1979)

Presença de Sinais Clínicos de Herpes Recorrente

NÃO () SIM ()

Descrição: _____

Localização: _____

Data/Período: _____

Avaliador (a): _____

Datas: ____/____/____ ____/____/____ ____/____/____

Datas: ____/____/____ ____/____/____ ____/____/____

Datas: ____/____/____ ____/____/____ ____/____/____

Escala de Performance: Karnofsky

100%	Sem sinais ou queixas, sem evidência de doença.
90%	Mínimos sinais e sintomas, capaz de realiza suas atividades com esforço.
80%	Sinais e sintomas maiores, realiza suas atividades com esforço.
70%	Cuida de si mesmo, não é capaz de trabalhar.
60%	Necessita de assistência ocasional, capaz de trabalhar .
50%	Necessita de assistência considerável e cuidados médicos freqüentes.
40%	Necessita de cuidados médicos especiais.
30%	Extremamente incapacitado, necessita de hospitalização, mas sem iminência de morte.
20%	Muito doente, necessita suporte.
10%	Moribundo, morte iminente.