FABIO LUIZ CORACIN

ESTUDO DO POLIMORFISMO C677T DO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM PACIENTES COM MUCOSITE DO TRATO GASTROINTESTINAL APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA

São Paulo

2009

Fabio Luiz Coracin

Estudo do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (mthfr) em pacientes com mucosite do trato gastrointestinal após transplante alogênico de medula óssea

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof.Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2009

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Coracin, Fabio Luiz
Estudo do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes com mucosite do trato gastrointestinal após transplante alogênico de medula óssea / Fabio Luiz Coracin; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2009.
110p. : tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Estomatite – Transplante de medula óssea 2. Polimorfismo – Enzima metilenotetrahidrofolato redutase 3. Patologia Bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Coracin FL. Estudo do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes com mucosite do trato gastrointestinal após transplante alogênico de medula óssea.

São Paulo, / / 2009

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Luiz** e **Cecília** e à minha irmã **Luciana**.

Novamente estou nessa situação de dedicar e agradecer o que de mais importante me foi dado: vocês como família: a base sólida e o apoio incondicional foram mais do que importantes para eu chegar até aqui. Agradeço a Deus por ter vindo com pessoas que sempre deram o suor e não pouparam esforços na minha educação, na minha formação, nos conceitos e no caráter. Amo vocês!

Muito obrigado....

... e complemento, agora, com agradecimentos ao meu cunhado **Robson** por cuidar tão bem da minha irmã e por ter participado da vinda da minha linda sobrinha **Gabriela** ao mundo!

Agradeço à toda minha família por sempre apoiar minhas decisões...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha *amiguxa* e irmã de olhos puxados **Patrícia Adachi** pela amizade, pelo companheirismo e pela fraternidade criada nestes anos. Mesmo no pouco tempo de convívio pudemos rir juntos, divagar sobre a Vida, e, aprendemos o real sentido da palavra “amigo”. Estes momentos foram únicos e ímpares. Uma certeza que há é que sempre estarão guardados em um lugar especial e lá ficarão... até o fechar permanente dos olhos. **OBRIGADO** por tudo.

À pessoa responsável pela minha vinda para São Paulo e conclusão desta etapa. Agradeço muito ao meu amigo **Paulo Sérgio**. Que Deus te dê sempre forças para militar na nossa área e que sempre seja sempre fiel aos seus princípios, conceitos e à amizade que você cultiva nas pessoas! Obrigado pelas horas de conversa, pelos seus ensinamentos, por suas reflexões, enfim, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Fábio Daumas Nunes, exemplo de pessoa, exemplo de profissional, exemplo de pesquisador e orientador. Que me abriu as portas do seu Laboratório para a execução deste trabalho. Por compartilhar características individuais tão semelhantes, tal qual um virginiano de 15 de setembro, que me fizeram encontrar respostas e fazer outros questionamentos seja através de palavras ou no reflexo das atitudes visualizadas num espelho imaginário.

Ao Prof. Dr. Frederico Dulley, Chefe do Serviço de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP, pela oportunidade de trabalhar com sua equipe e permitir que este trabalho fosse realizado. Agradeço pela confiança e pelo crescer profissional que está sendo proporcionado.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal: Andréa Mantesso, Décio dos Santos Pinto Jr, Karem Ortega, Marília Trierveiler Martins e Suzana Orsini Machado de Souza. Agradeço diariamente todos os dias pela oportunidade de estar com vocês e aprender com vocês. Agradeço pelos ensinamentos como pessoa, como profissional e como pesquisador.

À Professora Marina Magalhães pelo exemplo de pessoa, pela contribuição e colaboração neste trabalho e, também, na minha formação.

À minha tia Roseli Politani pela inspiração na escolha da profissão.

Aos membros do Laboratório de Patologia Molecular: Camila Rodini, Fernanda Amorim, Katiúcia Paiva, Márcia Campos, Maria Fernanda, Tatiana Libório, Thaís Acquafreda. Vocês foram e serão sempre muito importantes.

Aos amigos Flávia Caló, Tessa Botelho, Alexandre Borba, Aluana e Aline Abrahão pela amizade, pelo companheirismo e pelos conselhos. Vocês se tornaram especiais.

Aos colegas da pós-graduação: Alexandra Fontes, Ana Cláudia Luiz, Tuti, Brunno, Camila Fragata, Carla Dinelli, Chayne de Castro, Erika Pereira, Fabiana Martins e Márcio Oliveira, Felipe Sperandio, Felipe Daltoé, Fernanda Amorim, Fernanda Yamamoto, Fernanda Giudice, Henrique Rosseto, Juliana Schussel, Juliana Noguti, Karin Sá, Kívia Ferrazzo, Lourdes Vanesa, Luciana Marocchio, Marco Aurélio, Marina de Deus, Fátima Klingbeil, Maria Fernanda, Mayra Vasques, Nathalie Rezende, Nelise Lascane, Paulo Braz, Renata Acay, Roberto Rejas, Ronald Vargas, Valtuir Felix, Yonara Freire.

Aos colegas Helder e Flávia Pontes, e Cury: exemplos de profissionais, exemplos de amigos por tudo o que nos foi proporcionado conviver.

Às funcionárias da Patologia Bucal: Zilda, Néia, Nair, Elisa, Bia, Edna e Débora.

Ao Professor Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone, Professor Titular da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Faculdade de Medicina da USP, pela oportunidade em realizar este estudo nesta Instituição.

À Rosaura Saboya, médica do Serviço de TMO do HCFMUSP, pela amizade e pela colaboração.

Às enfermeiras e amigas Alessandra, Priscila, Flávia, Catarina e toda equipe de enfermagem do Ambulatório de TMO. Este trabalho não teria sido realizado sem a ajuda de vocês.

Às Enfermeiras Tânia Alves de Lima, Viviane, Elizandra representando toda equipe de Enfermagem do ICHC e do INCOR pela ajuda no desenvolver deste trabalho.

Aos Funcionários do TMO: Ricardo, Elke, Rita, Landri, Cristina, Mirandinha pela ajuda e pela amizade.

Agradeço sempre às amigas, Nilda Rodrigues, Terezinha dos Anjos e Laís Crochik pela amizade.

Aos meus "*roommates"* Sanseray Machado e Rafael Bonafé pelos anos de convivência.

À minha segunda família, Denise e José Furlan, Alan, André e Lívia pelo apoio que sempre me foi dado nestas etapas conquistadas.

À Profa. Dra Joyce Maria Annicchino-Bizzachi e à Maria Lúcia (Ucha) pela imensa colaboração com uma alíquota que foi de grande importância na realização deste trabalho.

À Patrícia Kato, consultora técnica da Qiagen no Brasil, pelo auxílio na padronização das reações e na interpretação das mesmas.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento da Pesquisa (CNPQ).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à Pesquisa (2007/01755-4).

Aos pacientes do Serviço de Transplante de Medula Óssea do HCFMUSP por terem participado e contribuído para a realização deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram este trabalho acontecer.

“O futuro tem muitos nomes. Para os fracos é o inalcançável. Para os temerosos, é o desconhecido. Para os valentes é a oportunidade.”

Victor Hugo

“O passado é lição para se meditar, não para se reproduzir.”

Mário de Andrade

Coracin FL. Estudo do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes com mucosite do trato gastrointestinal após transplante alogênico de medula óssea. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

RESUMO

A mucosite oral, também chamada recentemente de mucosite do trato gastrointestinal, continua sendo um importante efeito colateral que pode comprometer o resultado do transplante de células tronco hematopoéticas. Ela pode ocorrer em 100% dos pacientes submetidos ao transplante alogênico de células-tronco e a maior incidência neste pode ser atribuída à administração de metotrexate. A ocorrência de mucosite ulcerativa está relacionada ao aumento dos custos hospitalares, a redução da sobrevida em 100 dias e infecção sistêmica aumentando o risco de sepse. A última década foi muito importante para a compreensão da mucosite oral, incluindo a predisposição genética dos indivíduos e alterações nas enzimas responsáveis a metabolização de quimioterápicos. Recentemente, o polimorfismo C677T no gene metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) têm ganhado enfoque na relação com a incidência da mucosite. Esta enzima metaboliza o metotrexate e a ela é atribuída maior ou menor atividade levando a modificações na metabolização do fármaco. Poucos trabalhos prospectivos e caso-controle são encontrados na literatura corrente com relação ao polimorfismo C677T e a incidência da mucosite. O objetivo deste estudo foi uma análise prospectiva caso-controle da relação do polimorfismo MTHFR C677T com a incidência da mucosite. Além

disso, a influência da condição de saúde bucal (presença de placa dental e inflamação gengival) com a incidência de mucosite oral foi analisada. Foram inseridos 97 pacientes divididos em 2 grupos: 35 pacientes submetidos ao transplante alogênico e 62 pacientes submetidos ao transplante autólogo. A mediana de idade foi de 41,5 anos. O regime de condicionamento consistiu de busulfano e melfalano ou regime BEAM - becenum, etoposide, citarabina e melfalano (para a Doença de Hodgkin e Linfoma não Hodgkin). A profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro foi feita com ciclosporina e metotrexate, no transplante alogênico. Não foi feito resgate com ácido folínico durante a administração de metotrexato. Os resultados mostraram que o polimorfismo C677T não foi significativo no grupo de estudo em comparação com o grupo controle na previsão de incidência e severidade da mucosite oral. No entanto, a incidência e gravidade da mucosite oral foram influenciadas pela condição de saúde bucal. Em conclusão, o polimorfismo C677T da MTHFR não foi relacionado ao oral mucosite, mas o estado de saúde oral foi um fator importante no desenvolvimento da mucosite. Estes resultados reforçam a importância de um dentista na equipe multiprofissional de assistência a estes pacientes.

Palavras-Chave: Mucosite. Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. Condicionamento Pré-Transplante. Polimorfismo Genético

Coracin FL. Analysis of single nucleotide polymorphisms C677T of methylenetetrahidrofolate reductase (MTHFR) on the development of oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

ABSTRACT

Oral mucositis remains an important side-effect and life-threatening complication of hematopoietic stem cell transplantation. It can occurs in 100% of patients underwenting allogeneic stem cell transplantation. The differences in incidence between allogeneic and autologous transplantation may be due to methotrexate administration in the first. Ulcerative mucositis is related to increase hospitalar costs, reduced 100-days survival and systemic infections leading to sepsis risk. The last decade was very important to the understanding of oral mucositis, including genetics changes in enzymes responsible to drug metabolization, as the C677T polymorphism in the methylenetethrahidrofolate reductase gene (MTHFR). A prospective evaluation of oral mucositis in relation to the C677T MTHFR polymorphism was done. Also, the influence of oral health condition (presence of dental plaque and gingival inflammation) with the incidence of oral mucositis was analyzed. A cohort of 97 patients (35 allogeneic-study group and 62 autologous-control group) with median age of 41.5 years was evaluated. Conditioning regimen comprised busulfan and melphalan or becenum based conditioning regimen (BEAM – becenum, etoposide, cytarabin and melphalan. GVHD prophylaxis comprised cyclosporine A plus short course of methotrexate in allogeneic transplantation. No rescue

with folinic acid was done in the methotrexate administration. Results showed that C677T polymorphism was not significant in the study group compared with control group in predicting incidence and severity of oral mucositis. However, the incidence and severity of oral mucositis was influenced by oral health condition. In conclusion, C677T MTHFR polymorphism was not related to oral mucositis, but oral health status was an important factor in developing mucositis. These findings reinforce the importance of a dentist in the multiprofessional team to assist these patients.

Keywords: Mucositis. Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Transplantation Conditioning. Polymorphism, Genetic.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µl	Microlitro
µMOL/L	Micromol por litro
BEAM	Protocolo de condicionamento à base de Becenum, etoposideo, citarabina, melfalano
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CPOD	Índice de dentes Cariados, Perdidos e Obturados
D+	Dias contados após o transplante de medula óssea
DECH	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	flavina-adenina dinucleótido ou dinucleótido de flavina-adenina
GC	Grupo Controle
GE	Grupo de Estudo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HRM	Curva de melting de alta resolução *(High Resolution Melting)*
IG	Índice Gengival
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IP	Índice de Placa
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase
MTX	Metotrexate

ng/ µl	Nanograma por microlitro
nM	Nanomolar
ºC	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da Polimerase em Cadeira (*Polymerase chain reaction)*
RFC	Carreador de folato reduzido
RPM	Rotações por minuto
TMO	Transplante de medula óssea
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DA LITERATURA 19

2.1 O Transplante de Medula Óssea 19

2.2 Alterações Bucais do Transplante de Medula Óssea 19

2.3 Mucosite 21

2.4 Enzima Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) 25

2.5 Metotrexate 29

2.6 Prevenção e tratamento da mucosite 31

3 PROPOSIÇÃO 33

4 MATERIAL E MÉTODOS 34

4.1 Inserção dos pacientes 34

4.2 Aspectos Éticos 34

4.3 Avaliação clínica odontológica 35

4.4 Avaliação da mucosite oral – escala Organização Mundial da Saúde 39

4.5 Dosagem de ácido fólico pré TMO 41

4.6 Dosagem de metotrexate sérico 41

4.7 Coletas do sangue e purificação do material genético 42

4.8 Reação da Polimerase em Cadeira (PCR) para determinação dos polimorfismos 44

4.9 Análise Estatística 46

5 RESULTADOS 47

5.1 Avaliação da Mucosite - Escala OMS 49

5.2 Dosagem de ácido fólico pré TMO 51

5.3 Dosagem de Metotrexate pós TMO 52

5.4 Resultados da avaliação clínica odontológica Pré TMO 53

5.5 Análise dos polimorfismos C677T e a relação com a mucosite 54

5.6 Implicações clínicas da mucosite oral 58

6 DISCUSSÃO 61

7 CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS 70

ANEXOS 80

1 INTRODUÇÃO

O transplante de medula óssea (TMO) é o tratamento de escolha para diversas doenças onco-hematológicas. Os pacientes submetidos ao TMO apresentam alterações na mucosa oral agudas, como a mucosite e a ocorrência de infecções, e crônicas, como a doença do enxerto contra o hospedeiro e a disfunção das glândulas salivares. Essas manifestações podem interferir sobremaneira na conduta e na terapêutica empregada, bem como na sobrevida do paciente.

Dentre as alterações bucais relatadas, a mucosite é a mais freqüente e é definida como reação tóxica inflamatória na mucosa desencadeada pela quimioterapia do regime de condicionamento. A ocorrência da mucosite depende de alguns fatores, como por exemplo, o tipo de transplante a ser realizado. O transplante alogênico provoca maior ocorrência quando comparado com o transplante autólogo. O regime de condicionamento também é um fator relacionado com a gravidade da mucosite: quando é utilizada a radioterapia corporal total juntamente com a quimioterapia a incidência da mucosite aumenta. A mucosite nos pacientes submetidos ao TMO está relacionada com o aumento do risco de sepsis e aumento no número de dias de hospitalização (SONIS et al., 2001). Pacientes submetidos ao transplante autólogo e que desenvolveram mucosite ulcerativa apresentam risco três vezes maior de infecções por estafilococos alfa-hemolíticos quando comparados com o mesmo grupo de pacientes, porém sem ulceração (RUESCHER et al., 1998). Outro fator bastante importante nas implicações clínicas da mucosite é a

sobrevida em 100 dias. Os dados da literatura são unânimes em dizer que a ocorrência de mucosite ulcerativa reduz a sobrevida em 100 dias (RUESCHER et al.,1998; SONIS et al., 2001).

O metotrexate é uma droga utilizada como antagonista do ácido fólico competindo com o folato intra-celular pela ligação com a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), como resultado ocorre a depleção total de substratos do ácido fólico, tais como, tetrahidrofolato e 5,10 metilenotetrahidrofolato. É utilizado nos pacientes submetidos ao TMO alogênico para profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) e os seus efeitos secundários incluem mucosite e mielossupressão. Recentemente, a análise dos haplótipos da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) tem mostrado que os sítios de mutação no gene podem apontar menor atividade da enzima em indivíduos homozigotos para o alelo mutante T, e acarretando maior toxicidade.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Transplante de Medula Óssea

O transplante de medula óssea (TMO) tem sido utilizado como medida terapêutica para doenças onco-hematológicas, insuficiências medulares ou distúrbios congênitos da hematopoiese, tais como leucemias, linfomas, tumores de mama e anemia aplástica grave (WOO; LEE; SCHUBERT, et al., 1997). O regime de condicionamento pré TMO utiliza altas doses de quimioterapia com o objetivo de: (1) estabelecer um grau de imunossupressão suficiente para que o enxerto não seja destruído pelas células imunocompetentes do receptor, (2) destruir um número máximo de células neoplásicas residuais do receptor, e (3) criar um “espaço” onde a nova medula possa proliferar (STORB, 1994).

2.2 Alterações Bucais do Transplante de Medula Óssea

A cavidade bucal é um local de freqüentes complicações do TMO (MAIN et al., 1984; SONIS et al., 2004). Essas complicações podem estar relacionadas com a citotoxicidade medicamentosa na mucosa e nas glândulas salivares causadas pelo regime de condicionamento quimioterápico (SCHUBERT; IZUTSU, 1987). A xerostomia é uma das principais alterações

em glândulas salivares que os pacientes apresentam durante os 100 primeiros dias após o TMO e é representada pela redução na função das glândulas salivares maiores (CORACIN et al., 2006). A redução na capacidade de produção e eliminação da saliva pelas glândulas maiores foi estudada nos 100 primeiros dias após o TMO utilizando cintilografia com pertecnetato99mTc e foi observado que os pacientes apresentaram redução na eliminação do radiofármaco e redução do fluxo salivar por volta do D+30 com possível recuperação funcional por volta do D+100 (CORACIN et al., 2006).

A mucosite é outra complicação aguda comum da quimioterapia do câncer, sendo toxicidade dose-limitante para a continuidade do tratamento (SONIS et al., 2004). Recentemente, foi descrito que a mucosite ocorre em 100% dos pacientes submetidos a quimioterapia de alta dosagem seguida por TMO (SONIS et al., 2004) sendo observada ao redor do 10º dia após o início do condicionamento com maior intensidade entre os dias +7 e +11, podendo durar de 2 a 3 semanas (LOCKHART; SONIS, 1981).

A mucosite pode ser responsável por um aumento de infecções sistêmicas, seja viral, bacteriana ou fúngica, devido à ruptura da barreira mucosa natural, podendo evoluir para uma bacteremia persistente e sepsis nesses pacientes imunocomprometidos (COWEN et al., 1997; DAZZI et al.,2003; PAPAS et al., 2003). Algumas condições bucais aumentam o risco para complicações, tais como cálculos salivares, raízes residuais, abscessos periapicais crônicos, dentes cariados, placa bacteriana, bolsas periodontais, doença periodontal, polpa dental infectada, lesões em periápice e próteses removíveis (MELKOS; MASSENKEIL; ARNOLD, 2003). Realizar o preparo da cavidade bucal com remoção de focos de infecção e fatores irritantes locais

poderia levar a redução considerável na gravidade da mucosite oral, sendo observado que o preparo da cavidade bucal previamente ao TMO não reduz a incidência da mucosite, porém reduz a gravidade da doença instalada (SANTOS; MAGALHÃES, 2006).

2.3 Mucosite

A mucosite é um efeito grave e dose-limitante do tratamento antineoplásico, cujas lesões ulceradas apresentam grande impacto na morbidade dos pacientes, por apresentar dor, restrição alimentar e servindo como porta de entrada para infecções originadas da mucosa oral, cuja incidência é variável de acordo com a doença de base, idade, condição de saúde oral dose e freqüência da quimioterapia (SONIS; CLARK, 1991). A primeira descrição detalhada dos processos biológicos do desenvolvimento da mucosite foi feito por SONIS (1998). A ocorrência clínica da mucosite acontece inversamente à função da medula óssea, sendo maior no período de nadir da neutropenia e a cicatrização culminando com a recuperação de granulócitos (BLIJLEVENS; DONNELLY ; DE PAUW, 2000). Cada uma das 4 fases descritas acontecem como conseqüência de uma rede de ações mediadas por citocinas inflamatórias, associada com o dano ao epitélio promovido pelo agente quimioterápico e/ou radioterapia. A presença da flora bacteriana oral e a situação da medula óssea influenciam na evolução (SONIS, 1998). As fases incluem:

1. Fase inflamatória ou de reação vascular ocorre como reação inicial à exposição aos agentes quimioterápicos, sendo amplificada quando há associação da radioterapia. Nesta fase ocorre a liberação de citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral, com exacerbação da resposta tecidual;
2. A fase epitelial acontece como resposta não seletiva do epitélio às drogas utilizadas no tratamento do câncer. As células em divisão são afetadas da mesma maneira que as células tumorais culminando com a redução na renovação celular. Esta fase está profundamente relacionada com a produção de lesões ulceradas, decorrente da atrofia epitelial secundária à renovação celular reduzida;
3. A fase ulcerativa é uma conseqüência da atrofia epitelial e facilitada pelo atrito e pelos microtraumas à mucosa oral.
4. A última fase culmina com a cicatrização das lesões e está diretamente relacionada com a renovação celular que volta a ocorrer, voltando à divisão e diferenciação celular.

A partir de 2004 a mucosite é descrita como um processo complexo caracterizado pela ocorrência de 5 fases compreendendo eventos não apenas epiteliais mas relacionados a outros tecidos envolvidos pela toxicidade do tratamento do câncer (SONIS et al., 2004).

1. A fase de iniciação da mucosite acontece pela liberação de íons reativos de oxigênio no tecido envolvido em resposta à quimioterapia e/ou radioterapia, causando exposição do tecido a estes agentes tóxicos levando ao dano

direto às células, tecidos e vasos sanguíneos (GATE et al., 1999). Estes íons reativos de oxigênio podem estimular um número grande de fatores de transcrição que caracterizam a resposta do tecido aos agentes citotóxicos (CULY; SPENCER, 2001).

2. A próxima fase, de super-regulação com geração de mensageiros celulares, é resultado de vários eventos acontecendo juntos culminando na morte celular programada após o dano do DNA pelos íons reativos de oxigênio gerados na fase de iniciação. Esta morte celular não é suficiente para desencadear as lesões de mucosite comumente vistas, sendo que concomitante a isto a liberação de fatores, como o fator nuclear B (NF-κB), o proteassoma 26S presentes no estresse oxidativo da mucosa, a via da esfingomielinase e a cadeia das caspases podem super-regular o processo (MADDENS et al., 2002).
3. Na fase de sinalização e amplificação as citocinas inflamatórias liberadas durante a quimioterapia e/ou radioterapia atuam aumentando a lesão na mucosa previamente iniciada. A ativação das cadeias esfingomielinase e caspase pelos mensageiros leva à liberação de fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Estas citocinas são mediadoras da lesão tecidual secundária ao TNF-α. A conseqüência desta fase culmina com um tecido biologicamente alterado, porém com aparência clinica normal.
4. Na fase de ulceração a colonização bacteriana por gram-positivos, gram-negativos e anaeróbios podem levar à bacteremia e sepsis. Os produtos da parede celular bacteriana podem ativar os macrófagos teciduais levando à liberação de maior quantidade de fatores pró-inflamatórios (TNF-α, IL-1, IL-

6), aumentando e acelerando os danos teciduais. Por fim, com a recuperação dos neutrófilos, a renovação celular começa a se re-estabelecer. Após a cicatrização a mucosa ficará aparentemente normal, porém o micro-ambiente continua alterado significantemente com indícios de angiogênese residual (SONIS et al., 2004).

Atualmente sabe-se que todos os tecidos envolvidos no processo da mucosite podem apresentar modificações genéticas ou serem resistentes à toxicidade relacionada ao tratamento. Esta possibilidade pode ser evidenciada pelas diferenças individuais na susceptibilidade à quimioterapia e/ou radioterapia (DORR; SPEKL; MARTIN, 2002), e pela existência de polimorfismos de genes relacionados com o metabolismo das drogas utilizadas (por exemplo o metotrexate e o melfalan) (ULRICH et al, 2001; KUHNE et al., 2008).

As taxas de incidência da mucosite oral graus 3 e 4 variam de 5% a 15% podendo alterar a conduta clínica (modificação do esquema terapêutico) e os resultados econômicos (aumento nos dias de internação, utilização de analgésicos opióides, nutrição parenteral total) (SONIS et al., 2001). Dados encontrados na literatura mostram que pacientes com mucosite grave, utilizando 5-fluorouracil seguido de resgate com leucovorin, podem ter um gasto adicional de mais de US$113,00 por ciclo de quimioterapia (GROENER et al., 1999) e US$ 42.749,00 no caso de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (SONIS et al., 2001). Os casos de mucosites não ulcerativas podem vir a requerer US$ 2725,00 excedentes em serviços (ELTING et al., 2003).

A associação entre a mucosite e infecção foi observada por RUESCHER et al. (1998) afirmando que as bacteremias mais comuns em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea eram de origem estreptocócica (RUESCHER et al., 1998).

2.4 Enzima Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

Atualmente a farmacogenética é um instrumento potencialmente importante para a prática clínica e laboratorial como uma nova ferramenta que procura individualizar as terapêuticas e tornar as intervenções alvo-específico. Diversos polimorfismos envolvidos em processos como metabolismo e transporte de fármacos estão sendo relatados como marcadores para se tentar aperfeiçoar o resultado do tratamento (DE MATTIA; TOFFOLI, 2009).

O polimorfismo C677 T da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é um dos alvos estudados e analisados para identificar fatores preditivos da resposta aos agentes anti-folato (ULRICH et al., 2001; ROBIEN et al., 2004; DE MATTIA; TOFFOLI, 2009;). O gene responsável pela codificação da enzima MTHFR foi primeiramente descrito por Goyette et al. (1994), está localizado no cromossomo 1 região 1p36.3 e é constituído por 11 éxons (GOYETTE et al. 1998). A proteína resultante é formada por 656 aminoácidos e possui peso molecular aproximado de 150KDA. Possui um domínio catalítico do tipo amino-terminal dependente de flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) responsável pela conversão irreversível do metilenotetrahidrofolato em

metiltetrahidrofolato (UELAND; HUSTAD; SCHNEEDE; REFSUM; VOLLSET, 2001). Esta conversão atua como doador do radical metil para remetilação da homocisteína em metionina. Esta enzima recebeu grande atenção após a descoberta de uma variável termolábil associada com incidência de doença cardiovascular e acúmulo de homocisteína plasmática (KANG; PASSEN; RUGGIE; WONG; SORA, 1993).

As mutações no gene da MTHFR implicam em deficiência de ácido fólico e a partir do isolamento da porção codificadora do gene da MTHFR, mutações puderam ser identificadas (GOYETTE et al., 1994). O ácido fólico executa funções importantes no organismo, participando de várias reações metabólicas. Essas funções são catalisadas por diversas enzimas, entre elas a 5,10-metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). A enzima MTHFR é uma enzima-chave, pois catalisa a redução de 5,10-metilenotetraidrofolato para 5-metiltetraidrofolato, que é a forma primária e predominante do ácido fólico na circulação. Atua ainda como doadora de radicais metil para a remetilação de homocisteína (Hci) para metionina (Met), catalisada na maioria dos tecidos pela metionina sintase, que requer como cofator vitamina B12 (FROSST et al.,1995; GOYETTE et al., 1995). Um polimorfismo comum na enzima MTHFR ocorre na posição 677 com a substituição de uma citosina por uma timina (C→T), resultando na troca de uma alanina por uma valina, no códon 222, da proteína processada (FROSST et al., 1995), reduzindo a atividade dessa enzima e tornando-a termolábil (FROSST et al., 1995; VAN DER PUT et al., 1995). Quanto à atividade específica da enzima, comparando-se os genótipos mutantes com o genótipo normal (C/C), sabe-se que ocorre redução da especificidade de 35% no genótipo (C/T) e de 70% no genótipo (T/T) (KANG et

al., 1988). A frequência dos polimorfismos na enzima MTHFR varia de acordo com a área geográfica apresentando maior incidência em brancos e asiáticos (aproximadamente 25% - 45%), enquanto são raras em negros (9,5%) (BOTTO; YANG, 2000; YNOUE et al., 2007). Na população brasileira foram encontradas diferenças significativas entre diferentes grupos étnicos e a prevalência de homozigotos para o alelo com a mutação “T” entre descendentes de caucasóides foi de 10%, enquanto em negros de 1,45% e entre indígenas de 1,2% (ARRUDA et al., 1998; FRANCO et al., 1998).

Porém, recentemente, a análise dos haplótipos da enzima tem mostrado que os sítios de mutação no gene podem apresentar alterações combinados com outras mutações. Uma hipótese recente aponta menores atividades da enzima em indivíduos homozigotos para o alelo mutante T quando associado à presença de gene homozigoto mutante C da mutação A1298C da mesma enzima (ISOTALO; WELLS; DONNELLY, 2000; CHEN et al., 2002; RADY et al., 2002; URANO et al., 2002; MARTIN; BOERSMA; HOWE, 2006; GOEKKURT et al., 2007; ULVIK et al., 2007). A presença das duas mutações juntas poderia apresentar efeito sinérgico quando combinadas (BOTTIGER et al., 2007; ULVIK et al. 2007), porém não há um estudo epidemiológico com grande número de pacientes inseridos que comprove esta teoria (DE MATTIA; TOFFOLI, 2009).

A análise dos haplótipos da enzima tem mostrado que os sítios de mutação no gene podem apresentar alterações combinados com outras mutações. Uma hipótese recente reserva menores atividades da enzima em indivíduos homozigotos para o alelo mutante T quando associado à presença de gene homozigoto mutante C da mutação A1298C da mesma enzima

(ISOTALO et al., 2000; CHEN et al., 2002; ULVIK et al., 2007; URANO et al., 2002; RADY et al., 2002; MARTIN; BOERSMA; HOWE, 2006; GOEKKURT et al., 2007). A enzima MTHFR pode apresentar modificação conformacional de acordo com a presença de mutações, por exemplo, C677T e A1298C, isoladas ou quando combinadas (ULVIK et al., 2007). Os indivíduos que apresentam a mutação C677T podem apresentar conseqüências importantes no metabolismo de folato decorrente da idade, hábitos (etilismo e tabagismo) por modificarem desequilíbrio do metabolismo (LARSSON; GIOVANNUCCI; WOLK, 2006; BOCCIA et al., 2008; KIM, 2007). A presença do polimorfismo C677T pode resultar em modificações fenotípicas da enzima diretamente afetadas pelos níveis de folato, sendo sugerido que a estabilidade da ação é significativamente modificada pelos níveis de folato. Uma alteração tridimensional da estrutura pode levar às alterações termolábeis (BAYLEY; GREGORY, 1999; ULVIK et al., 2007) descritas por KANG et al. (1988) e ocasionando uma redução na atividade da enzima.

A relação mais discutida atualmente sobre os polimorfismos da enzima MTHFR dizem respeito à mutação C677T e o metabolismo do metotrexate, aumentando sua toxicidade. O que se sabe é que não há dados que suportem a relação da enzima MTHFR, tanto C677T quanto A1298C, levando a uma concentração aumentada dos metabólitos de metotrexate séricos (WESSELS et al., 2006; SHIMASAKI et al., 2006; AGGARWAL et al., 2006; SUGIMOTO et al., 2008).

Atualmente encontram-se descrições de modulação genética relacionada ao risco de mucosite oral (ULRICH et al., 2001; ROBIEN et al., 2004). Os indivíduos que expressam fenótipos que resultam na deficiência de

enzimas necessárias para o metabolismo de drogas específicas apresentam risco aumentado de toxicidade (SONIS et al., 2004). O polimorfismo C677T que modifica a produção da enzima MTHFR pode predispor os indivíduos submetidos ao TMO e que fizeram uso de metotrexate como profilaxia da DECH aos efeitos tóxicos da droga, como aumento da gravidade de mucosite oral (ULRICH et al., 2001).

2.5 Metotrexate

O metotrexate (MTX) é uma droga utilizada como antagonista do ácido fólico e é composto por aminopterina e seu uso é relatado desde a década de 1940 quando foi empregado no tratamento de leucemia aguda em crianças (KREMER et al., 2004). O MTX compete com o folato intra-celular pela ligação com a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), resultando na depleção total de substratos do ácido fólico, tais como, tetrahidrofolato e 5,10 metilenotetrahidrofolato (FRIDLAND, 1974; GENESTIER et al., 1998). Alteração na eficiência da enzima MTHFR está associada com níveis aumentados de homocisteína e conseqüentemente, doença cardiovascular, neuropatia, coagulopatia (CRONSTEIN, 2005). Há algum tempo os autores tem discutido que mutações associadas à variabilidade da enzima MTHFR podem tornar mais susceptível ao MTX, bem como, aumento dos efeitos tóxicos gastrointestinais e na medula óssea (CRONSTEIN, 2005). Os polimorfismos genéticos podem ocorrer em >1% da população e a prevalência em genes que

codificam enzimas metabolizadoras tanto do folato quanto do metotrexate faz com quem alguns destes polimorfismos possam estar associados a diferentes respostas clínicas e efeitos tóxicos (KREMER et al., 2005). Um dos genes primeiramente investigados na relação de atividade versus polimorfismo foi o gene transportador do folato para o interior da célula (RFC-1) (6). Depois se começou a estudar a relação da enzima MTHFR na ocorrência de efeitos adversos ao MTX, culminando, em alguns casos, em suspensão da terapêutica. Esta enzima apresenta um genótipo selvagem CC e duas mutações CT (heterozigoto para o alelo) e TT mutante para ambos os alelos (STAMP et al., 2006).

Atualmente é utilizado nos pacientes submetidos ao TMO alogênico para profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (STORB et al., 1986) e os efeitos secundários do seu uso incluem mucosite e mielossupressão (BOLWELL et al., 2004). Pode ser administrado via oral, intramuscular ou intravenoso e sua biodisponibilidade varia de paciente para pacientes atingindo quase 70% (CRONSTEIN, 2005). Aproximadamente 10% do metotrexato é convertido no fígado em 7-hidroximetotrexato e a excreção é feita via renal (65% - 80%) (CUTOLO et al., 2001;CRONSTEIN, 2005). A sua meia-vida sérica é de 10 horas, sendo indetectável após 24 horas da administração. Porém, os níveis séricos não são considerados um bom indicador da eficácia, pois a droga é convertida em derivados de poliglutamatos e ficam reservados no interior das células (VAN EDE et al., 1998). O mecanismo de ação do metotrexate ainda não é completamente conhecido, mas sabe-se que causa a inibição da enzima dihidrofolato redutase levando a uma diminuição da concentração de folato intracelular com conseqüente redução do metabolismo

das purinas e pirimidinas e síntese de ácidos nucléicos. Da mesma forma, atua inibindo o metabolismo da metionina e homocisteína por inibição da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR).

A utilização do metotrexate como profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro nos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea aumenta o risco de toxicidades, como a ocorrência de mucosite. A mucosite pode apresentar mediana de duração de 9,5 dias em pacientes que fizeram uso de metotrexate contra 4,5 dias comparando com aqueles pacientes que não fizeram uso (CUTLER et al., 2005). A utilização do metotrexate apresenta um risco de ocorrência de mucosite de quase 70% comparado com 30,2% que não fizeram uso da droga (OHBAYASHI et al., 2008).

2.6 Prevenção e tratamento da mucosite

O uso de protocolos de prevenção de infecções orais em pacientes que serão submetidos transplante de medula óssea, como erradicação de potenciais focos de infecção previamente ao transplante, tem demonstrado diminuição de culturas positivas de bactérias de 35% para 5,4% ao final do transplante, associado com redução da incidência de mucosite. (GALILI; TAGGER; GARFUNKEL, 1995). Posteriormente, foi descrita a associação de bactérias da flora bucal com a bacteremia que ocorreu em pacientes submetidos ao transplante autólogo, e que desenvolveram lesões ulceradas de mucosite, (RUESCHER et al., 1998).

Ainda não existe um protocolo padrão ouro para tratamento e/ou profilaxia da mucosite. A remoção de focos infecciosos dentários e/ou periodontais, remoção de cáries ativas e manutenção da escovação e higiene oral associados com solução tópica de clorexidina é um dos protocolos encontrados (SCHUBERT; WILLIAMS; LLOID; DONALDSON;CHAPKO, 1992; MELKOS et al., 2003).

É consenso que a utilização da clorexidina como coadjuvante na prevenção de infecções oportunistas oriundas da mucosa oral é útil e válida (SCHUBERT; WILLIAMS; LLOID; DONALDSON;CHAPKO, 1992; DONNELLY et al., 2003; SONIS et al. 2004). A ação da clorexidina pode apresentar menor redução nas lesões em crianças tratadas para leucemia linfóide aguda (RATKAUSKAS E DAVIES, 1993).

Outra possibilidade de intervenção para profilaxia da mucosite é a utilização de laser de baixa potência. Estudos referem redução na incidência e na gravidade das lesões além de contribuir para uma possível reparação tecidual. Estudos brasileiros também demonstraram a eficácia clínica do uso do laser de baixa potência na prevenção de mucosite oral (SANTOS; DAVI; CASTRO; BARROS, 2006; ANTUNES et al., 2008; EDUARDO et al., 2008; KHOURI et al., 2009).

3 PROPOSIÇÃO

- Realizar um estudo observacional do tipo caso-controle para avaliar a incidência e a gravidade da mucosite oral e comparar com os polimorfismos C677T do gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase.
    - Avaliar a incidência e gravidade da mucosite nos sujeitos que fizeram uso de metotrexate durante o transplante de medula óssea alogênico e comparar com aqueles que foram tratados com TMO autólogo (sem MTX).

- Analisar a relação da condição de saúde bucal no desenvolvimento da mucosite nos pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas.
    - Avaliar os índices de saúde bucal – índice de placa, índice gengival e CPOD (dentes cariados, perdidos e obturados) e determinar se há relação com a incidência da mucosite.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Inserção dos pacientes

Para a realização deste estudo foram analisados pacientes a partir do momento que aguardavam o transplante de medula óssea no Serviço de Transplante de Medula Óssea da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo durante o período de fevereiro de 2008 a abril de 2009. Os pacientes não foram submetidos a nenhum transplante de medula prévio para serem inseridos no estudo. O regime de condicionamento consistiu de altas doses de quimioterapia, sem radioterapia corporal total. As drogas utilizadas foram bussulfano (3 mg/kg/dia nos dias -5, -4, -3 e -2) e melfalano 100 mg/m^2 (no dia -1), para os candidatos ao transplante autólogo, e bussulfano 4 mg/kg/dia (por 4 dias – dias -5, -4, -3 e -2) e melfalano 140 mg/m^2 (dia -1), para os candidatos ao transplante alogênico. Para os pacientes portadores de doença de Hodgkin o regime de condicionamento consistiu de altas doses de quimioterapia segundo o protocolo BEAM (doses cumulativas: becenum 300 mg/m², etoposide 800 mg/m², citarabina 1600mg/m² e melfalano 140 mg/m²). Nenhum dos pacientes recebeu radioterapia corporal total ou radioterapia em linfonodos como parte do regime de condicionamento. Os pacientes do grupo de estudo (GE) foram submetidos ao transplante alogênico de medula óssea e que utilizaram metotrexate na profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro

não dosagem de 15mg/kg no dia+1 e 10mg/kg nos dias +3,+6 e +11. Foi constituído um grupo controle (GC) com pacientes submetidos ao transplante autólogo, que, portanto, não se utilizou metotrexate para critérios de comparação. Procurou-se parear os regimes de condicionamento com os pacientes do GE.

4.2 Aspectos Éticos

O protocolo de estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – processo n.º 0122/07 (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – processo nº187/06 (ANEXO B). Todos os pacientes foram esclarecidos e aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de consentimento esclarecido determinado para este protocolo.

4.3 Avaliação clínica odontológica

Os pacientes inseridos no estudo foram submetidos à avaliação clínica através de uma consulta durante o período pré-transplante com o objetivo de se realizar um levantamento epidemiológico das condições de saúde bucal de cada um deles. Foram coletados os dados referentes à saúde bucal, representados por:

1. Índices de Placa (IP), descrito por LÖE (1967);
2. Índice Gengival (IG), descrito por SILNESS e LÖE (1966).
3. Índice CPOD, avaliando as condições dentárias – dentes cariados, perdidos e obturados preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS – 1977).

Índice Gengival (IG): com este índice, foi avaliada a gravidade da gengivite e sua localização em quatro sítios avaliando um segmento da boca ou um grupo de dentes (LÖE, 1967). O tecido gengival ao redor de cada dente foi dividido em quatro unidades mensuráveis (papila distovestibular, margem vestibular, papila mesio-vestibular e toda margem lingual). A mensuração foi feita através de método visual e, quando julgado necessário, utilizou-se sonda periodontal de ponta romba. As quatro unidades gengivais foram avaliadas segundo os critérios descritos por CARRANZA & NEWMAN (1996). Para esse trabalho foi convencionado avaliar seis dentes índices (primeiro molar superior direito, incisivo central superior direito, primeiro molar superior esquerdo, primeiro molar inferior esquerdo, incisivo central inferior esquerdo e o primeiro molar inferior direito). O resultado obtido da soma dos valores de cada região mensurada e da divisão dos mesmos pelo número de dentes examinados será considerado como valor do IG do paciente. Os valores numéricos do IG serão

associados clinicamente a diferentes graus de gengivite. A Tabela 4.1 mostra os critérios clínicos do índice gengival, segundo SILNESS & LÖE (1966) e a Tabela 4.2 mostra os valores numéricos associados ao grau de gengivite (adaptada de CARRANZA & NEWMAN 1996).

Tabela 4.1 - Critérios para definição do Índice Gengival (SILNESS ; LÖE, 1966)

Graduação	Correlação clínica
0	Gengiva normal
1	Leve inflamação; pequena alteração de cor, pouco edema, nenhum sangramento à palpação
2	Inflamação moderada; rubor, edema e superfície brilhante, sangramento à palpação
3	Inflamação grave; rubor intenso e edema, ulcerações, tendência a ocorrer sangramento espontâneo.

Tabela 4.2 - Valores numéricos associados ao grau de gengivite (adaptada de CARRANZA ; NEWMAN 1996)

Score	**Grau de Gengivite**
0,1 – 1	Leve
1,1 – 2	Moderada
2,1 - 3	Grave

Índice de Placa (IP): com este índice, foi avaliada por método visual a distribuição da placa bacteriana (dentária) na área gengival do dente. Por ter sido desenvolvido como um componente de comparação do IG de SILNESS &

LÖE (1966), este índice também examina as mesmas unidades de contagem dos dentes: disto-vestibular, vestibular, mésio-vestibular e lingual. Os mesmos dentes índices utilizados para o IG foram utilizados neste exame. Da mesma maneira, o resultado obtido da soma dos valores de cada região dentária mensurada e da divisão dos mesmos pelo número de dentes examinados foi considerado o valor do IP do paciente. Os valores numéricos do IP serão associados, clinicamente, à quantidade de placa dentária, conforme descrito na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Critérios para definição do Índice de Placa (SILNESS ; LÖE, 1966)

Graduação	Correlação clínica
0	Nenhuma placa na área gengival
1	Película de placa aderida na margem gengival livre e na área adjacente do dente
2	Acúmulo moderado de resíduos moles dentro da bolsa gengival, na margem gengival e/ou na superfície adjacente do dente, podendo ser vista a olho nu.
3	Acúmulo de grande quantidade de resíduos moles dentro da bolsa gengival e/ou margem gengival e na superfície adjacente do dente

Índice CPOD: é um índice epidemiológico padrão da Organização Mundial da Saúde cujo objetivo foi avaliar a média do número total de dentes permanentes cariados (C), perdidos (P) (extraídos ou com extração indicada) e obturados (O) em um grupo de indivíduos. A letra “D” adicionada ao final significa “dente” para diferenciar de outros índices existentes, como por exemplo, aquele que estuda as superfícies dentárias (S) (CPOS). Os resultados obtidos através dessa avaliação são apresentados considerando-se o total de dentes CPO segundo seus componentes e não dente por dente como

nos levantamentos epidemiológicos locais tradicionais (OMS, 1997). Neste estudo foi considerado dente cariado aquele elemento que apresentou evidências clínicas de descalcificação, existindo uma cavidade definida com descoloração ou opacidade ao longo das margens em quaisquer faces (vestibular, lingual, palatina, mesial, distal ou oclusal). Dentes com manchas brancas (fase inicial do processo de descalcificação do esmalte) não cavitadas e fissuras/cicatrículas pigmentadas não foram considerados como cariados. Dentes restaurados que apresentaram infiltrações ou outros pontos cavitados também foram considerados como dentes cariados. Foram considerados dentes obturados aqueles que apresentaram um material restaurador reconstituindo-os, não apresentando infiltrações nem fraturas ou qualquer outra alteração que pudesse ser sugestiva da presença de cárie. As ausências de dentes no arco foram avaliadas como dentes perdidos, assim como os restos radiculares (presença somente da raiz dentária). Em caso de dúvidas sobre a ausência do dente, foi questionado ao paciente o motivo da extração e, também, avaliou-se a presença do dente homólogo.

Nenhum dos pacientes inseridos foi submetido a preparo bucal pré TMO como protocolo de adequação do meio bucal e remoção de focos de infecção e agentes locais.

4.4 Avaliação da mucosite oral – escala Organização Mundial da Saúde

A mucosite foi avaliada baseada na escala da Organização Mundial da Saúde (OMS) que avalia a presença de ulceração e pseudomembrana bem como a capacidade dos indivíduos de deglutir alimentos sólidos e líquidos (Tabela 4.4). Os pacientes foram avaliados durante o período de internação para o transplante, começando no primeiro dia do regime de condicionamento e continuando até o D+30 pós-transplante. Sabendo-se que a mucosite oral apresenta pico de incidência entre os dias +7 e +11 e resolução ao redor dos dias +18 ao +21 pós-transplante foram feitas avaliações clínicas para se avaliar a incidência nestes períodos. Com o intuito de se facilitar a coleta e analise dos dados convencionou-se dividir os dias de avaliação pós transplante em 5 períodos, sendo:

a) dos dias +1 a +5;
b) dos dias +6 ao +10;
c) dos dias +11 ao +15;
d) dos dias +16 ao +21;
e) dos dias 21 ao +30.

Tabela 4.4 - Graduação da mucosite baseada nos critérios da Organização Mundial da Saúde (1979)

Grau	Aparência Clínica
0	Sem alterações
1	Eritema, dor
2	Eritema, ulcerações, alimentação com sólidos
3	Ulcerações grande, por vezes coalescentes, somente dieta líquida
4	Ulcerações grandes com impossibilidade de alimentação

4.5 Dosagem de ácido fólico pré TMO

Foram realizadas segundo normas do Laboratório Central do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. O sangue foi coletado em tubo seco e mantido em temperatura ambiente para posterior envio ao laboratório. Os exames foram feitos pelo método da eletroquimioluminescência e considerados como valores de referencia aqueles situados entre 3 a 17 ng/ml. Os valores entre os referenciais de normalidade foram considerados normais e aqueles valores fora destes referenciais foram considerados anormais para o parâmetro.

4.6 Dosagem de metotrexate sérico

Foram realizadas segundo normas do Laboratório Central do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Foi realizado através de um exame bioquímico para análise do pico de concentração após a administração da droga. O sangue foi coletado no dia+12, até 10 horas após administração do metotrexate, em tubo com EDTA a 7% e mantido em temperatura ambiente e protegido da luz até a entrega no laboratório. O método utilizado foi por ImunoFluorescência polarizada por imunensaio de ligação competitiva por reação a um antígeno marcado (fluorescente) e o antígeno do paciente competem pelos sítios de ligação de

um anticorpo. O antígeno fluorescente ligado a uma molécula grande de anticorpo não se encontra livre e, desta maneira, retém a polarização da luz de excitação. Quando a reação competitiva entrou em equilíbrio com uma amostra de paciente que contém baixa concentração de antígeno, a concentração de antígeno fluorescente ligado ao anticorpo foi alta, sendo também alta, a polarização. Se a amostra do paciente apresentou alta concentração de antígeno, houve baixa concentração de antígeno fluorescente ligado e a polarização foi baixa. A relação precisa entre polarização e concentração, de uma droga, foi estabelecida medindo-se os valores de polarização de calibradores com valores de concentração conhecidos. Os valores de referência foram considerados como: concentrações tóxicas para os valores >0.02 umol/L.

4.7 Coletas do sangue e purificação do material genético

As amostras de sangue periférico foram coletadas no Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – São Paulo/SP pela equipe de Enfermagem do Serviço, e através de cateter venoso central implantado nos pacientes desde o período pré-transplante. As amostras foram conservadas em geladeira, por até 15 dias e, posteriormente, processadas no laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Foi utilizado método de purificação à base de coluna de sílica (DNA

QIAamp tech, Quiagen®) cujo mecanismo de ação é a ligação específica do DNA à uma membrana e a passagem dos contaminantes por ela. Sob condições salinas e de pH ajustados do lisado, e com a ligação do material genético à membrana de sílica, as proteínas e outros contaminantes que interfeririam na reação de PCR não ficam retidos. Ao contrário, o DNA contido no lisado com as soluções tampão apresentam afinidade iônica com a membrana e conseqüentemente permite uma ligação estável. Portanto, os inibidores da reação de PCR, tais como cátions bivalentes e proteínas, são completamente removidos após as duas eluições com solução tampão, seguidas por centrifugações. A Figura 4.1 representa esquematicamente as fases de ligação do DNA à membrana de sílica e posterior lavagens para remoção dos contaminantes.

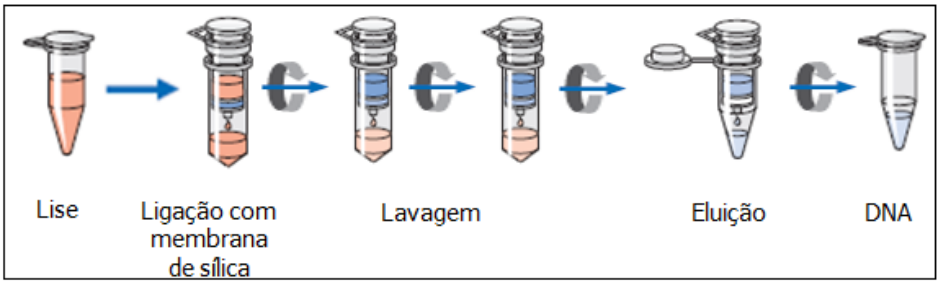

Figura 4.1 - Representação da técnica de purificação do material genético (QIAamp DNA Mini and Blood Handbook, Qiagen)

O protocolo para purificação do material genético foi realizado à temperatura ambiente seguindo as recomendações do fabricante:

1. Etapa de lise dos leucócitos: colocação de protease seguida de 200µl de amostra de sangue e finalizando com 200µl do tampão de lise;
2. Ativação da protease para iniciar quebra das proteínas: incubação do produto do item 1 em banho maria a 56ºC durante 10 minutos;

3. Passagem do produto para as colunas contendo a membrana de sílica, fornecidas pelo fabricante;
4. Centrifugação com velocidade de 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 minuto para redução da contaminação existente;
5. Adição de 500µl do primeiro tampão de lavagem e centrifugação com velocidade de 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 minuto;
6. Adição de 500µl do segundo tampão de lavagem e centrifugação com velocidade de 20.000 x g (14.000rpm) por 3 minutos;
7. Adição de 200µl do tampão de eluição e centrifugação com velocidade de 6.000 x g (8.000 rpm) por 1 minuto. Este passo tem por objetivo realizar a passagem do DNA pela membrana para posterior estocagem.

4.8 Reação da Polimerase em Cadeira (PCR) para determinação dos polimorfismos

Após o material genético das amostras serem extraídos, foram conservados em freezer -20ºC para posterior genotipagem. As amostras foram submetidas à reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real, onde a determinação dos polimorfismos foi dada pela Curva de Melting de alta resolução (HRM – high resolution melting) utilizando-se o equipamento RotorGene 6000 (Corbett Research). Esta metodologia baseia-se na diferença de temperatura necessária para dissociação da dupla fita de DNA, isto é, a temperatura que se faz necessária para dissociar a fita dupla em fita simples.

Durante a reação, há captação dos sinais fluorescentes com grande precisão óptica e térmica que permite a leitura pelo aparelho. Dentre as formas comerciais da fluorescência, para este estudo optou-se pelo EvaGreen (Fast EvaGreen® Master Mix para qPCR e HRM; Biotium, Hayvard, CA). A reação de qPCR utilizada foi aquela preconizada pelo fabricante da fluorescência utilizada e consistiu dos seguintes parâmetros: (1) 96ºC por 2 minutos para ativação da enzima Taq polimerase seguidos por (2) 45 ciclos de repetição a 96ºC por 5 segundos para desnaturação inicial da dupla fita de DNA seguido por 60ºC por 30 segundos para associação dos nucleotídeos. Para análise da curva de dissociação (HRM) utilizou-se o seguinte parâmetro após a amplificação por qPCR: elevação da temperatura de 65ºC até 95ºC elevando-se 0,1ºC a cada 2 segundo. As reações foram realizadas numa concentração de 125ng/µl de amostra de DNA, 1µl de cada iniciador (senso e anti-senso) a 10nM e 10µl da fluorescência EvaGreen. Os iniciadores foram desenhados e sintetizados de acordo com os dados do GeneBank, sendo o iniciador senso: 5' CTTTGAGGCTGACCTGAAGC 3' e o anti-senso: 5' GAAAAGCTGCGTGATGATGA 3'.

4.9 Análise Estatística

A avaliação da influência do grupo de estudo versus grupo controle, e dos genótipos da enzima MTHFR sobre as avaliações temporais de mucosite foi feita através do ajuste de Modelos Lineares Generalizados para Medidas Repetidas. A estatística de Wilk´s foi empregada para a análise multivariada. A comparação das médias observadas de ácido fólico nos grupos foi feita usando a técnica de Análise de Variância – ANOVA, com a estatística F - Fischer. Intervalos simultâneos de confiança foram ajustados com base no Método de Bonferroni para comparações múltiplas. O coeficiente de confiança adotado foi de 95%. Curvas de vida foram construídas para aplicação da Metodologia de Kaplan- Meier visando obter a sobrevida para os grupos de estudo e grupo controle. O teste comparativo foi feito usando a estatística de Breslow. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%. O nível descritivo p foi calculado e apresentado em todos os testes. O Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado para ambos os grupos e em ambos pode ser aceito (grupo controle p=1,0; grupo de estudo p=0,179).

5 RESULTADOS

Foram inseridos no estudo, 97 pacientes portadores de doenças onco-hematológicas, candidatos ao transplante de medula óssea (35 pacientes do grupo de estudo e 62 pacientes do grupo controle). A mediana de idade dos pacientes foi de 41,5 anos (18-65). Destes, 54 (56,7%) são do gênero masculino e 43 (43,3%) são do gênero feminino. As doenças de base dos pacientes foram: 26 (26%) pacientes com mieloma múltiplo, 22 (23%) com leucemia mielóide aguda, 12 (14%) com linfoma não Hodgkin, 12 (12%) com doença de Hodgkin, 9 (9%) portadores de outras doenças (carcinoma de testículo, leucemia linfóide aguda, leucemia mielomonocítica crônica, mielofibrose), 7 (7%) portadores de síndrome mielodisplásica, 5 (5%) portadores de anemia aplástica grave e 4 (4%) pacientes com leucemia mielóide crônica. Os dados demográficos dos pacientes bem como as doenças de base estão representados na Tabela 5.1 e no Gráfico 5.1.

Tabela 1.1- . Características clínicas dos pacientes inseridos no estudo.

Número de pacientes	97
Masculino	54 (56,7%)
Feminino	43 (43,3%)
Mediana de Idade (range):	41,5 anos (18-65)
Doença de base:	
Anemia Aplástica Grave	5
Doença de Hodgkin	12
Leucemia Mielóide Aguda	22
Leucemia Mielóide Crônica	4
Linfoma não Hodgkin	12
Mieloma Múltiplo	26
Síndrome Mielodisplásica	7
Outras doenças	9
Tipos de Transplante	
Alogênico	35
Autólogo	62

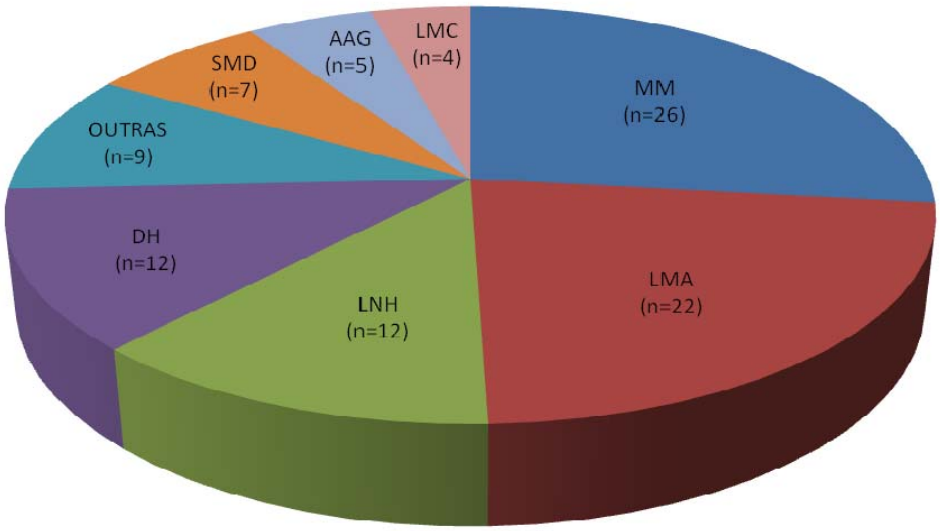

Gráfico 5.1- Distribuição das doenças de base (número absoluto) (LMA: leucemia mielóide aguda; LNH: linfoma não Hodgkin; DH: doença de Hodgkin; Outras: carcinoma de testículo, leucemia linfóide aguda, leucemia mielomonocítica crônica, mielofibrose; SMD: síndrome mielodisplásica; AAG: anemia aplástica grave; LMC: leucemia mielóide aguda; MM: mieloma múltiplo

5.1 Avaliação da Mucosite - Escala OMS

A mucosite foi avaliada baseada na escala da Organização Mundial da Saúde (OMS) que avalia a presença de ulceração e pseudomembrana e, também, a capacidade dos indivíduos de deglutir alimentos sólidos e líquidos. De acordo com os dados obtidos das 5 mensurações da mucosite, a média da incidência nos pacientes submetidos ao transplante alogênico foi de: 0,9 (entre os dias +1 e +5); 1,7 (entre os dias +6 e +10); 1,8 (entre os dias +11 e +15); 1,2 (entre os dias +16 e +20) e 0,3 (entre os dias +21 e +30). Para os pacientes submetidos ao transplante autólogo, a média da incidência da mucosite foi de 1,0 (entre os dias +1 e +5); 1,0 (entre os dias +6 e +10); 1,0 (entre os dias +11 e +15); 0,0 (entre os dias +16 e +20) e 0,0 (entre os dias +21 e +30). Notou-se uma discreta tendência a menor gravidade e menor tempo de duração nos pacientes submetidos ao transplante autólogo.

A Figura 5.1 ilustra dois casos de mucosite no D+9 pós transplante autólogo (mucosite grau II – OMS) e no D+13 pós transplante alogênico (mucosite grau IV - OMS).

Figura 5.1: Apresentação clínica da mucosite: A e B: paciente no D+9 pós transplante autólogo (mucosite grau II – OMS); C e D: paciente no D+13 pós transplante alogênico (mucosite grau IV - OMS)

As médias de incidência da mucosite mostraram-se semelhante aos dados encontrados na literatura, com pico entre os dias +6 ao +15 (Gráfico 5.2). As avaliações distinguindo os grupos de estudo e controle mostrou diferenças estatisticamente significantes (P<0.001), onde foi notada maior incidência nos pacientes submetidos ao transplante alogênico (Gráfico 5.3).

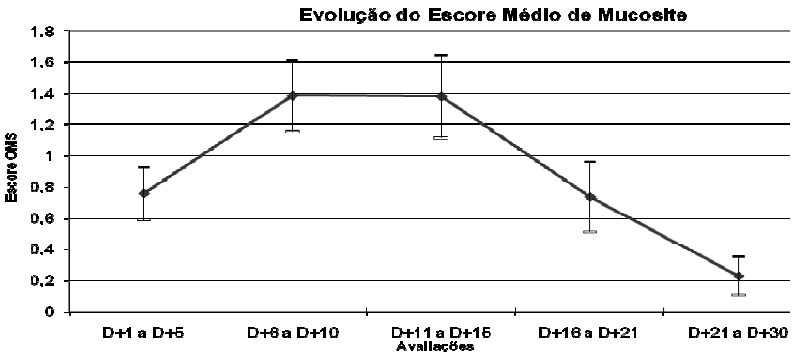

Gráfico 5.2 - Evolução global da mucosite pós-transplante nos períodos de avaliação

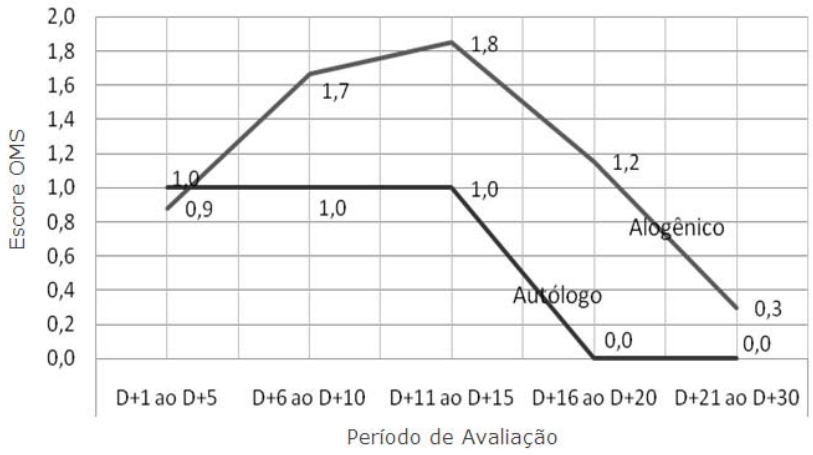

Gráfico 5.3 - Evolução da mucosite pós-transplante separadas por tipo de transplante, nos períodos de avaliação

A incidência da mucosite apresentou comportamento diferenciado durante os períodos de avaliação, sendo que a incidência global bem como a incidência encontrada nos períodos de avaliação foi maior nos pacientes submetidos ao transplante alogênico ($p<0,001$), salientando que houve grande variação na incidência.

5.2 Dosagem de ácido fólico pré TMO

Os níveis de ácido fólico foram dosados a partir do soro nos pacientes inseridos na pesquisa antes do início do regime de condicionamento. A mediana dos níveis de ácido fólico nos pacientes inseridos foi de 9,8ng/ml (variação: 0,0ng/ml – 80,9ng/ml). Os valores de referência adotados para as dosagens de ácido fólico foram 3 - 17 ng/ml. O Gráfico 5.4 representa a relação

dos níveis de ácido fólico com a incidência da mucosite nos grupos de estudo e controle.

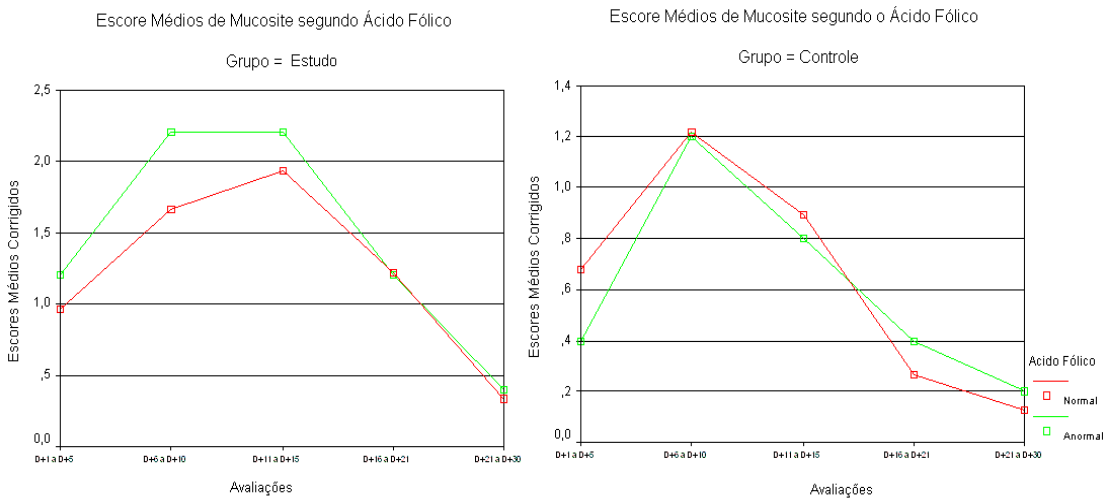

Gráfico 5.4 - Representação da incidência da mucosite nos grupos de estudo e controle de acordo com os níveis de ácido fólico obtidos previamente ao transplante

Embora não tenha ocorrido uma diferença estatisticamente significante na relação dos níveis de ácido fólico entre os pacientes de ambos os grupos, a incidência da mucosite foi maior nos pacientes do grupo de estudo com níveis séricos de ácido fólico fora dos limites de normalidade.

5.3 Dosagem de Metotrexate pós TMO

A profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro foi realizada, segundo protocolo Institucional, nos D+1, D+3, D+6 e D+11 pós-transplante. Baseados nestes dados e na metabolização da droga, os níveis de metotrexate

foram dosados no D+12 pós TMO. Dos 35 pacientes submetidos ao transplante alogênico inseridos no estudo, as dosagens de metotrexate sérico obtidas foram <0,02umol/L exceto em: 1 paciente em que foi indetectável; 1 paciente apresentou 0,03umol/L e 1 que foi a óbito antes do D+12.

Mesmo não havendo método de comparação dos níveis séricos de metotrexate em decorrência dos valores obtidos serem idênticos ou muito semelhantes, a maior incidência de mucosite neste grupo de pacientes foi francamente observada.

5.4 Resultados da avaliação clínica odontológica Pré-TCPH

Índice Gengival (IG): A mediana do índice gengival encontrada foi de 0,42 (variação: 0,0 a 1,90).

Índice de Placa (IP): A mediana do índice de placa encontrada foi de 0,42 (variação: 0,0 a 1,67).

Índice CPOD: O índice CPOD mostrou uma mediana de 15,5 (variação 0-32), considerado como um valor alto pela Organização Mundial da Saúde, porém valor este encontrado nas populações dos países em desenvolvimento.

Para a avaliação dos índices de saúde bucal e sua possível relação com a incidência da mucosite foram considerados os 3 índices isoladamente e, também, o possível efeito sinérgico entre eles. Somente foi significante para explicar a incidência da mucosite o índice gengival (p=0.04). Porém quando

analisada a relação entre os índices de saúde bucal no período de maior incidência da mucosite (dia+9 ao dia+15), os índices de placa (p=0.04) e gengival (p=0.01) apresentaram relação significativa com a mucosite. O índice CPOD em nenhuma das análises apresentou relação com a incidência da mucosite. Estas informações estão representadas no Gráfico 5.5, onde é notada a relação de maior índices de placa e gengival com a ocorrência de mucosite graus 3 e 4.

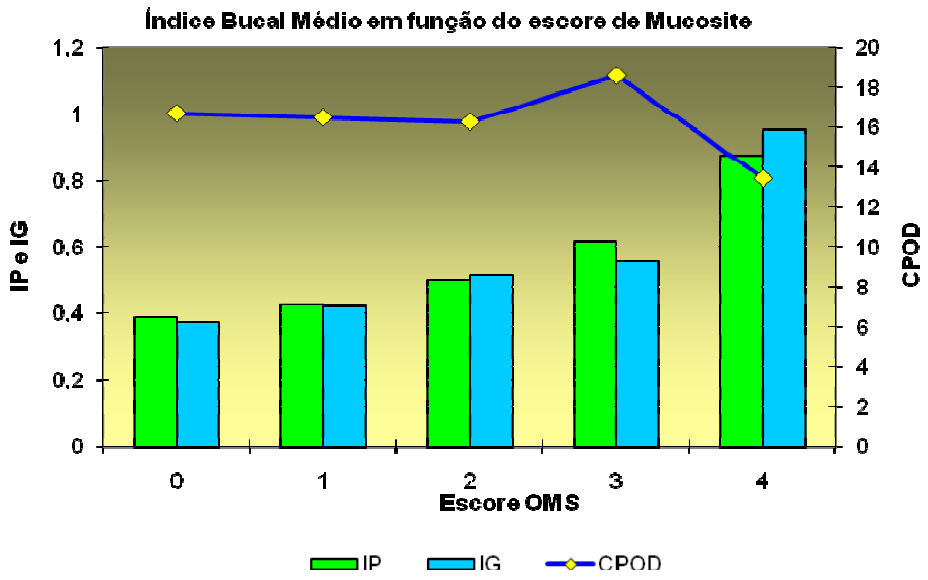

Gráfico 5.5 - Representação dos índices de saúde bucal e a relação com a mucosite

5.5 Análise dos polimorfismos C677T e a relação com a mucosite

Na população estudada (n=97) foram encontrados 47 pacientes do genótipo selvagem da enzima MTHFR (CC); 38 pacientes heterozigotos para o

alelo T (CT) e 12 pacientes homozigotos mutantes (TT). Esta freqüência está similar com os dados obtidos na população brasileira (ARRUDA et al., 1998). A Tabela 5.2 representa a ocorrência dos genótipos na população e a Tabela 5.3 e o Gráfico 5.6 representam a freqüência dos genótipos por grupo de estudo.

Tabela 5.2 -. Freqüência dos polimorfismos na população estudada

	População (n=97)	**(%)**
CC	47	48,4%
CT	38	39,2%
TT	12	12,4%

Tabela 5.3 - Freqüência dos polimorfismos na população estudada, por grupo de pacientes (p=NS)

	Grupo de Estudo (n=35)	**Grupo Controle (n=62)**
CC	18 (51,4%)	29 (46,8%)
CT	11 (31,5%)	27 (43,5%)
TT	6 (17,1%)	6 (9,7%)

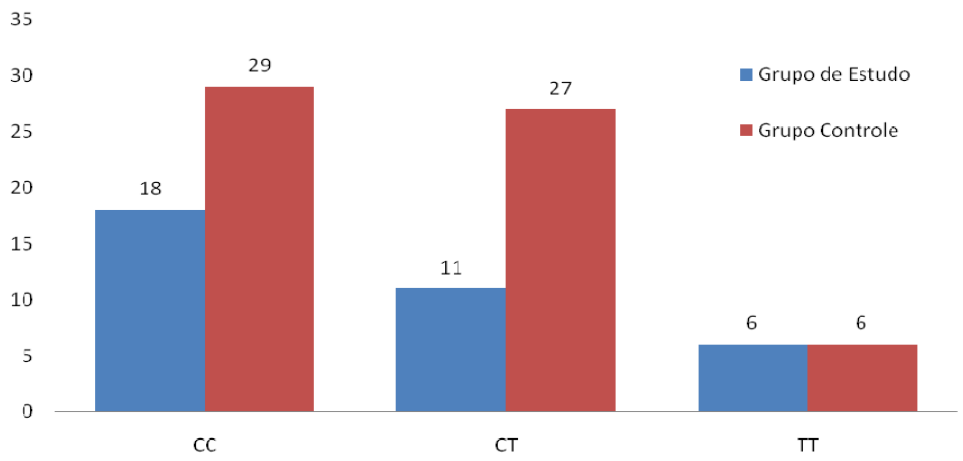

Gráfico 5.6 - Representação do número de genótipos encontrados por grupo de pacientes (eixo Y: número absoluto de pacientes)

O Gráfico 5.7 representa a relação entre os genótipos da enzima MTHFR e a incidência global da mucosite em ambos os grupos de estudo. Não houve relação estatisticamente significante entre estes genótipos e a incidência da mucosite.

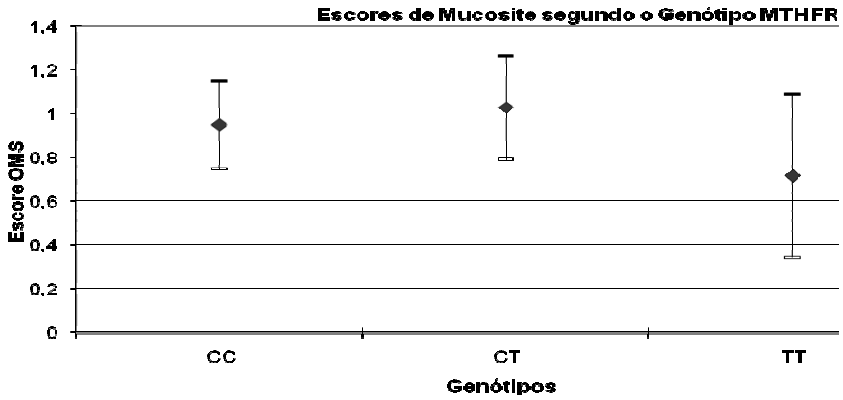

Gráfico 5.7 - Incidência global da mucosite dividida pelo genótipo MTHFR, em ambos os grupos

Não foi observada relação estatisticamente significante quando comparado os genótipos da enzima MTHFR com a incidência da mucosite (p=NS). De acordo com os dados a mucosite apresentou um pico de incidência por volta do dia+10 pós-transplante com redução por volta do dia+20 com queda significativa perto do dia+30. Quando comparados os 3 genótipos com esta incidência da mucosite, foi observado um comportamento similar entre eles, tanto para o grupo controle quanto para o grupo de estudo (Gráfico 5.8).

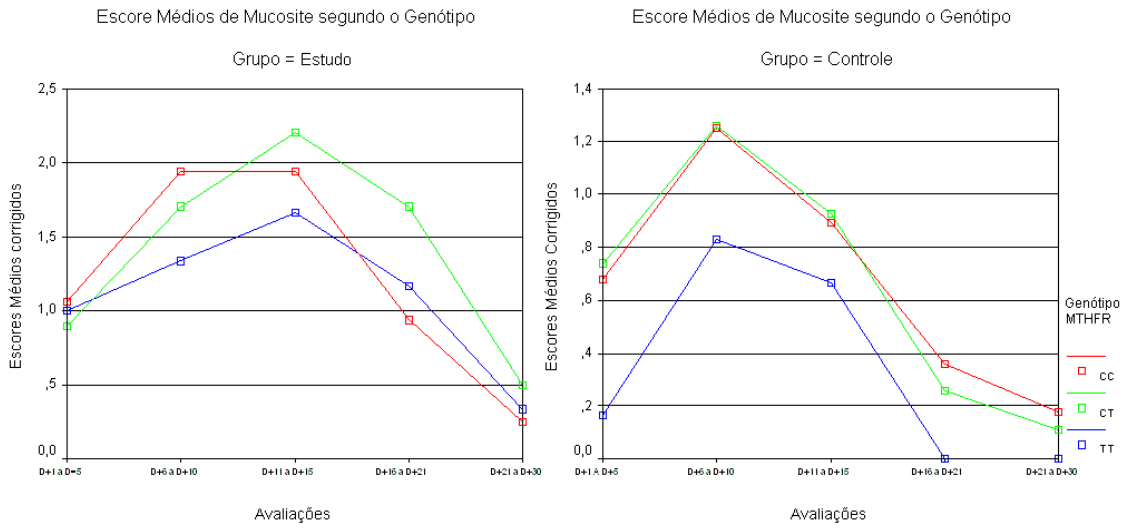

Gráfico 5.8 - Representação da relação dos genótipos da enzima MTHFR e a incidência da mucosite

Com o objetivo de avaliar a atividade residual da enzima para os indivíduos portadores do genótipo TT, comparou-se os genótipos CC+CT versus TT. Não foi vista relação significativa entre a ocorrência da mucosite (escores: CC+CT=0.98; TT=0.72) (Gráfico 5.9).

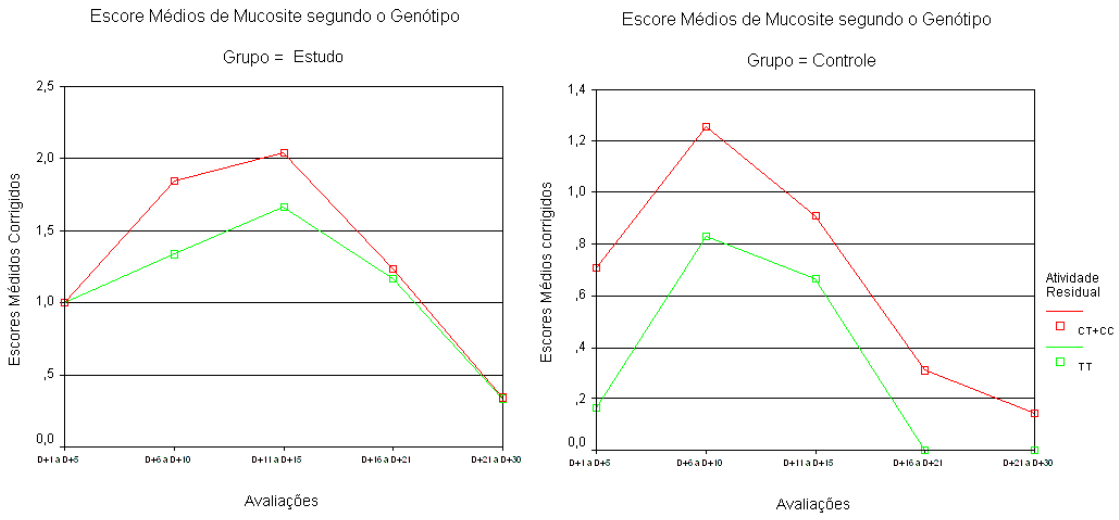

Gráfico 5.9 - Representação da relação da atividade residual da enzima MTHFR e a incidência da mucosite

Uma limitação desta análise foi o número de pacientes portadores do genótipo TT, sendo necessário um aumento da casuística para poder confirmar esta hipótese.

A avaliação complementar da enzima MTHFR no metabolismo do ácido fólico foi analisada para buscar relação com a atividade. Quando comparado o nível de ácido fólico com os genótipos da enzima MTHFR não se encontrou relação entre eles, bem como quando analisada a atividade residual (CC+CT versus TT) da enzima nos níveis de ácido fólico ($p=0.56$). Pode-se inferir que a atividade da enzima não influenciou o metabolismo do ácido fólico. Embora o nível de metotrexate não possa ser avaliado devido a assumirem o mesmo valor pós metabolização, é sabido que ele este é um agente responsável pela ocorrência da mucosite. Portanto, podemos assumir que a maior incidência da mucosite no grupo de estudo é causada pela administração do metotrexate. A Figura 14 mostra a incidência global de mucosite divididos pelos genótipos.

5.6 Implicações clínicas da mucosite oral

A incidência da mucosite oral teve grande influência na sobrevida dos pacientes avaliados. A análise da sobrevida foi feita pelo método de Kaplan e Meier e o produto analisado pelo “log-rank sum test”. A sobrevida global foi estatisticamente diferente quando comparado os grupos de estudo e o grupo controle ($p<0.0001$). De acordo com a incidência de mucosite, graus 1-2 e 3-4, os pacientes que apresentaram mucosite grave (graus 3 – 4) apresentaram

menor sobrevida comparados com aqueles com mucosite leve (graus 1 – 2) (Gráficos 5.10 e 5.11).

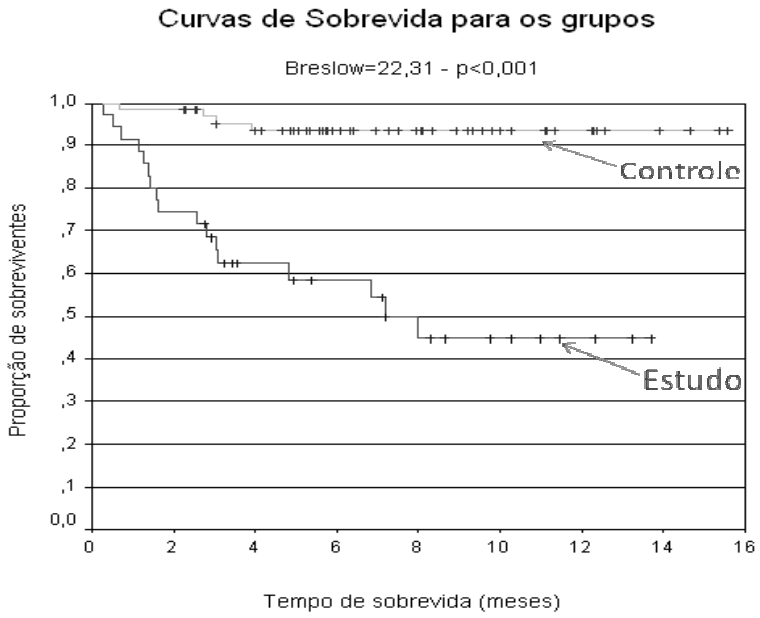

Gráfico 5.10 - Sobrevida dos pacientes de acordo com o grupo de estudo versus grupo controle

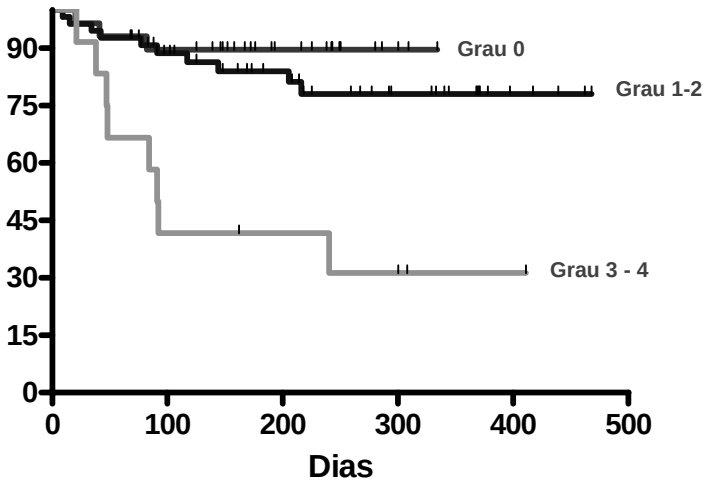

Gráfico 5.11 - Sobrevida dos pacientes estudados de acordo com o grau da mucosite, a porcentagem de sobrevida (em dias pós-transplante)

A ocorrência da quebra da barreira mucosa pode ser responsável pela entrada de microorganismos da flora bacteriana da cavidade oral para a corrente sanguínea. Este processo pode ser responsável pelo aumento do

número de infecções e ocorrência de febre nos pacientes. Quando analisamos a incidência da mucosite no período do nadir da neutropenia, de acordo com o tipo de transplante, observou-se que o transplante alogênico apresentou maior incidência ($p<0.0001$) (Gráfico 5.12).

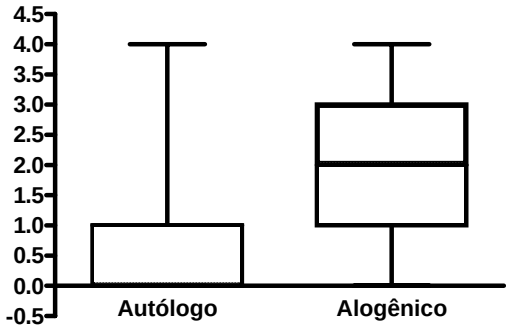

Gráfico 5.12 - Incidência da mucosite no nadir de acordo com o tipo de transplante

6 DISCUSSÃO

Este é um estudo prospectivo do tipo caso-controle cujo objetivo principal foi identificação de uma possível relação entre o polimorfismo da enzima metilenotetrahidrofolato redutase na incidência da mucosite oral. Na literatura há uma carência de estudos prospectivos e caso-controle que corroborem com a relação dos polimorfismos da enzima MTHFR com a incidência da mucosite oral. Há controvérsia em relação a este assunto, onde alguns autores referem que há uma relação (ROBIEN et al., 2004) e outros não a encontraram (RUIZ-ARGUELLES et al., 2007). A carência na literatura de estudos prospectivos e estudando um grupo que fez uso de metotrexate juntamente com um grupo que não utilizou esta droga, nos faz acreditar que os resultados aqui obtidos possam auxiliar no entendimento da fisiopatologia da mucosite.

Sabemos que a mucosite é a complicação mais comum dos regimes de tratamento do câncer e é considerada uma condição grave, principalmente para os pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (SONIS et al., 2001). O transplante é precedido por um regime de condicionamento no qual são empregadas altas doses de quimioterapia (associada ou não à radioterapia) que tem como função combater a doença de base, causar mieloablação e, ao mesmo tempo, um grau de imunossupressão permitindo a enxertia das células transplantadas. A prática clínica com enfoque nos pacientes oncológicos e submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas proporciona o convívio e nos faz presenciar as complicações

produzidas por estas modalidades de tratamento. Nos pacientes submetidos ao TCTH a mucosite oral pode necessitar de analgésicos narcóticos para controle da dor e, quando a ingestão oral está comprometida, há a necessidade de nutrição parenteral total ou prolongada. Devido à neutropenia causada pelo regime de condicionamento associada à quebra da barreira mucosa, a mucosite oral pode predispor o indivíduo à infecção sistêmica e até óbito (SONIS et al., 2001; BELLM et al., 2000; RUESCHER et al., 1998). O único dado que pudemos observar neste estudo em relação à sobrevida dos pacientes foi que naqueles que houve a presença de lesões graves de mucosite, a sobrevida foi menor do que nos demais ($P<0.0001$). Não fez parte desta metodologia a busca detalhada das fontes de infecções nem se o óbito foi decorrente de infecção, porém os pacientes com lesões maiores de mucosite apresentaram maior quantidade de dias de febre (dado não mostrado). Isto foi um achado clínico que pode ser observado durante a condução deste estudo.

A compreensão da fisiopatologia da mucosite oral, bem como os fatores preditivos permite a ação do profissional com medidas específicas para prevenção e/ou terapêutica, proporcionando maior efetividade no tratamento destas alterações (SONIS et al., 2001).

O diagnóstico clínico precoce da mucosite é complexo, pois é multifatorial e por apresentar diversas apresentações clínicas desde eritema de graus variados até ulcerações (principalmente nas áreas de mucosa livre como o freio lingual, língua, mucosa labial e jugal, pilares amidalianos e assoalho da boca). Durante a coleta dos dados na execução deste estudo pudemos observar que os pacientes apresentavam graus variados de mucosite e,

clinicamente, notamos a presença de ulcerações, eritema, leucoedema e, em alguns casos, dificuldade para deglutir. Esta dificuldade maior nos reflexos fisiológicos de deglutição que, algumas vezes estavam associados com a dor, foi observada com maior intensidade nos pacientes submetidos ao transplante alogênico.

O conhecimento da fisiopatologia da mucosite e as suas fases de desenvolvimento permitem melhor atuação profissional com medidas específicas de prevenção e terapêutica em cada uma das fases (SONIS et AL., 2004).

Alguns estudos têm avaliado a incidência da mucosite oral de acordo com o tipo de transplante, regime de condicionamento e outros fatores associados. Um dos aspectos é a rotina de cuidados bucais prévios ao transplante. Alguns autores dizem que não é significante na incidência da mucosite oral (Ohbayashi et al., 2008). Segundo Borowski et al (1994) o preparo bucal antes do início do regime de condicionamento tem por objetivo reduzir os índices de complicações bucais e sistêmicas durante o período de imunossupressão. Neste estudo, nenhum dos pacientes inseridos recebeu cuidados bucais prévios como rotina e a incidência da mucosite foi bastante variável na amostra. Em um estudo prévio realizado por nosso grupo pudemos observar que os cuidados odontológicos prévios ao transplante não está relacionado com menor incidência da mucosite, porém, relaciona-se com menor tempo de duração do processo (SANTOS et al., submetido). Embora nossos pacientes tenham apresentado os índices de placa e gengival muito semelhantes, e o índice CPOD considerado alto pela Organização Mundial da Saúde, os resultados da incidência da mucosite mostraram leve tendência a

serem maiores quanto maiores os índices de saúde oral IP e IG. O índice CPOD, nesta coorte, não foi significativo para explicar a incidência da mucosite.

O tempo de duração da mucosite neste estudo foi semelhante, sendo maior no transplante alogênico do que no transplante autólogo. O tipo do regime de condicionamento é outro fator importante no desenvolvimento da mucosite. Aqueles regimes onde são utilizados altas doses de melfalano associados com ciclofosfamida ou bussulfano apresentam menor incidência de mucosite quando comparado com os regimes de condicionamento contendo carmustina . Na nossa amostra, a grande maioria dos pacientes foi condicionada com busulfano associado a melfalano ou busulfano associado a ciclofosfamida enquanto 24 pacientes foram condicionados com regime contento carmustina. Neste grupo de pacientes que utilizaram regimes à base de carmustina pudemos observar, clinicamente, uma incidência significante de mucosite, porém com menor período de duração (dado não mostrado). Embora não tenhamos visto diferença estatística, clinicamente é um fator importante a se considerar na prática clínica. O tipo de transplante também foi um fator de significância estatística no desenvolvimento da mucosite, sendo que os pacientes submetidos ao transplante alogênico apresentaram maior gravidade e maior tempo de duração da mucosite.

Segundo dados de um trabalho conduzido por Sonis et al. (2001), a maior ocorrência de mucosite nos pacientes submetidos ao transplante alogênico pode ser atribuída, em parte, à administração do metotrexate como profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro. Este dado foi observado neste estudo, pois os pacientes submetidos ao transplante alogênico

apresentaram maior gravidade e maior tempo de duração da mucosite. Porém, a relação entre a metabolização do metotrexate é controversa na literatura onde alguns autores relacionam o metabolismo do metotrexate com a gravidade da mucosite oral (ROBIEN et al., 2004; ROBIEN et al., 2001), e outros autores não colocam este fator como preponderante na toxicidade e desenvolvimento da mucosite (RUIZ-ARGUILLES et al., 2007).

ROCHA et al. (2009) estudaram a metabolização de diferentes quimioterápicos, e sua associação com a toxicidade e o desenvolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro, nos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea. O polimorfismo C677T foi avaliado e apresentado como fator preditivo para a ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro e não para a mucosite. Para os autores, a toxicidade e, conseqüentemente, a mucosite foi relacionada com as enzimas da família do citocromo P450 (ROCHA et al., 2009). Nesse estudo, pudemos observar que a ocorrência da mucosite nos pacientes não foi relacionada com os polimorfismos da enzima MTHFR.

Há evidências da menor produção de co-fatores do ácido fólico com o polimorfismo C677T da enzima MTHFR, devido a redução na produção do 5-metiltetrahidrofolato pela enzima (BAGLEY; SELHUB, 1998). Alguns relatos referem que a concentração plasmática de folato está reduzida em indivíduos portadores do genótipo TT da enzima MTHFR (BRATTSTROM et al., 1998; NELEN et al., 1998; JACQUES et al., 1996; VAN DER PUT et al., 1995). Estes dados são semelhantes àqueles que encontramos e pudemos observar que os pacientes do grupo de estudo que possuíam níveis séricos de ácido fólico dentro dos limites da normalidade apresentaram menor incidência de mucosite.

Nos pacientes do grupo controle, esta relação é mais tênue. Nossos pacientes apresentaram a mediana dos níveis de ácido fólico dentro dos limites da normalidade. Neste estudo a relação da atividade da enzima MTHFR com os níveis de ácido fólico não foram significantes. Procurando avaliar a relação do genótipo TT tanto com os índices de ácido fólico quanto com a incidência da mucosite, analisamos os genótipos CC+CT versus TT, e não foi encontrada relação entre eles e os níveis do ácido fólico e a mucosite

Os níveis de ácido fólico pré-transplante pode ser um fator indicador da incidência da mucosite nos pacientes submetidos ao transplante alogênico e deve ser considerado na prática clínica para possível predição da condição. A ingestão de folato na dieta é citada como responsáveis pela redução da incidência da mucosite nos pacientes avaliados por RUIZ-ARGUILLES et al. (2007). Como este estudo não objetivou avaliar a ingestão de folato pelos pacientes, pesquisas futuras envolvendo a dieta rica ou pobre em folato deveriam ser conduzidas para melhor elucidação, também, da relação do folato ingerido com o metabolizado pela enzima MTHFR.

Os níveis do metotrexate não puderam ser avaliados em decorrência da uniformidade dos resultados, onde em todos os pacientes submetidos ao transplante alogênico foi igual (<0,02), exceto em 2 pacientes que apresentaram 0,03 e concentração não quantificada. Esta uniformidade nos valores pode ser atribuída à farmacocinética da medicação. Optamos por fazer a coleta dos exames de dosagem de metotrexate sérico no D+12 (12 horas após a administração), por ser um tempo importante no ciclo de metabolização do fármaco. Como resultado deste estudo prospectivo caso-controle da relação do polimorfismo C677T da enzima metilenotetrahidrofolato redutase sugerimos

que pode não haver uma relação entre a ocorrência deste com a mucosite. Porém, o tamanho reduzido da amostra pode ter influenciado nesta análise.

A condição de saúde bucal, embora não significativa nesta coorte, mostrou uma tendência a aumentar a incidência da mucosite. Os índices de placa e gengival foram fatores que podem estar relacionados com a incidência da mucosite oral e, portanto, a avaliação e cuidados bucais antes do transplante poderia reduzir a mucosite. Sobremaneira, é importante, também, salientar a relação da quebra da barreira mucosa com transporte de microorganismos da flora bucal para a corrente sanguínea e possível infecção nestes pacientes imunocomprometidos. Portanto, a presença de um cirurgião dentista na equipe multiprofissional é de grande importância para que uma adequada conduta clínica seja adotada e assim reduzir esta incidência. Este dado é corroborado por outro trabalho do nosso grupo que mostrou que os cuidados bucais pré-transplante reduziram o tempo de duração da mucosite nos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea.

Embora a relação do polimorfismo C677T não tenha demonstrado influência no desenvolvimento da mucosite oral, novos estudos devem ser conduzidos, com número maior de pacientes, para tentar elucidar esta relação. Além do polimorfismo C677T associado com menor atividade da enzima MTHFR, WIESBERG et al. (1998) descreveram o polimorfismo A1298C como coadjuvante neste efeito. Este polimorfismo A1298C da enzima MTHFR provocaria uma alteração adicional no gene, levando assim a uma alteração conformacional mais importante na estrutura da enzima, e afetando de forma mais efetiva a sua atividade. Uma análise simultânea de ambos os polimorfismos, associados com a ingestão e metabolização do ácido fólico

poderia ser útil na explicação do desenvolvimento da mucosite. Estudos adicionais já estão sendo conduzidos nesse sentido.

7 CONCLUSÕES

- A mucosite apresentou comportamento diferenciado nos períodos de avaliação, sendo maior a incidência no grupo que fez uso do metotrexate;
- O comportamento da mucosite foi similar para os 3 genótipos, sendo que os escores foram relativamente maiores no grupo de estudo (nos pacientes que fizeram uso de metotrexate);
- Os níveis de ácido fólico não foram influenciados pelos genótipos, nem pela atividade residual da enzima MTHFR, e, também, sem relação com a mucosite;
- Em relação aos índices de saúde bucal somente o índice gengival apresentou relação com a incidência da mucosite;
- Quando analisada a incidência da mucosite no período de nadir (maior neutropenia), os índices de placa e gengival tiveram relação positiva com a incidência;
- A sobrevida dos pacientes foi influenciada pela ocorrência de mucosite grave, porém não o foi pelos genótipos da enzima MTHFR.

REFERÊNCIAS [1]

Aggarwal P, Naik S, Mishra KP, Aggarwal A, Misra R. Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation. Ind J Med Res. 2006;124:521–26.

Antunes HS, Ferreira EM, de Matos VD, Pinheiro CT, Ferreira CG. The Impact of low power laser in the treatment of conditioning-induced oral mucositis: a report of 11 clinical cases and their review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13(3):E189-92.

Arruda VR, Siqueira LH, Gonçalves MS, von Zuben PM, Soares MC, Menezes R, et al. Prevalence of the mutation C677 → T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. Am J Med Genet. 1998; 78(4):332-5.

Bagley PJ. Selhub J. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of non-methylated tetrahydrofolate in red blood cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:13217–20.

Bailey LB, Gregory JF. Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and other enzymes: metabolic significance, risks and impact on folate requirement. J Nutr. 1999;129:919–22.

Blijlevens NM, Donnelly JP, De Pauw BE. Mucosal barrier injury: biology, pathology, clinical counterparts and consequences of intensive treatment for haematological malignancy: an overview. Bone Marrow Transplant. 2000; 25(12):1269-78.

Boccia S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MP, Fang JY et al.. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer risk: a huge-GSEC review. Am J Epidemiol. 2008;167(5):505-16.

[1] De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bolwell B, Sobecks R, Pohlman B, Andresen S, Rybicki L, Kuczkowski E et al.. A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant. 2004;34(7):621-5.

Bottiger AK, Hurtig-Wennlof A, Sjostrom M, Yngve A, Nilsson TK. Association of total plasma homocysteine with methylenetetrahydrofolate reductase genotypes 677C > T, 1298A > C, and 1793G > A and the corresponding haplotypes in Swedish children and adolescents. Int J Mol Med 2007;19:659–65.

Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. Am J Epidemiol 2000;151:862–77.

Borowski B, Benhamou E, Pico JL, Laplanche A, Margainaud JP, Hayat M.Prevention of oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation: a randomised controlled trial comparing two protocols of dental care. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1994;30B:93-7.

Brattstrom L, Wilchen DE, Ohrvik J, Brudin L. Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. Circulation. 1998; 98(23):2520-6.

Carranza F.; NEWMAN MG. Classification of periodontal disease. In: Clinical Periodontology. FCaM Newman (Eds). New York, WB Saunders Company. 1996: 61-4.

Chen J, Ma J, Stampfer MJ, Palomeque C, Selhub J, Hunter DJ. Linkage disequilibrium between the 677C > T and 1298A > C polymorphisms in human methylenetetrahydrofolate reductase gene and their contributions to risk of colorectal cancer. Pharmacogenetics. 2002;12:339–42.

Coracin FL, Pizzigatti Correa ME, Camargo EE, Peterson DE, de Oliveira Santos A, Vigorito AC et al.. Major salivary gland damage in allogeneic hematopoietic progenitor cell transplantation assessed by scintigraphic methods. Bone Marrow Transplant. 2006; 37(10):955-9.

Cowen D, Tardieu C, Schubert M, Peterson D, Resbeut M, Faucher C et al. Low energy helium-neon laser in the prevention of oral mucositis in patient undergoing bone marrow transplant: results of a double blind randomized trial. Int J Radiation Oncology Biol Phys. 1997; 38(4): 697-703.

Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. Pharmacol Rev. 2005;57:163-72.

Culy C, Spencer C. Amifostine: an update on its clinical status as a cytoprotectant in patients with cancer receiving chemotherapy or radiotherapy and its potential therapeutic application in myelodysplastic syndrome. Drugs. 2001;61:641–84.

Cutler C, Li S, Kim HT, Laglenne P, Szeto KC, Hoffmeister L et al.. Mucositis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort study of methotrexate and non-methotrexate-containing graft-versus-host disease prophylaxis regimens. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11:383-88.

Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Seriolo C, Siraub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. Ann Rhem Dis. 2001;60:729-35.

Dazzi C, Cariello A, Giovanis P, Monti M, Vertogen B, Leoni M et al.. Prophylaxis with GM-CSF mouthwashes does not reduce frequency and duration of severe oral mucositis in patients with solid tumors undergoing high-dose chemotherapy with autologous peripheral blood stem cell transplantation rescue: a double blind randomized, placebo-controlled study. Annals of Oncology. 2003; 14: 559-63.

De Mattia E, Toffoli G. C677T and A1298C MTHFR polymorphisms, a challenge for antifolate and fluoropyrimidine-based therapy personalisation. Eur J Cancer. 2009;45:1333-51.

Donnelly JP, Bellm LA, Epstein JB, Sonis ST, Symonds RP. Antimicrobial therapy to prevent or treat oral mucositis. Lancet Infect Dis. 2003; 3: 405-12.

Dorr W, Spekl K, Martin M. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. Cell Prolif. 2002;35(Suppl 1): 60–7.

Eduardo FD, Bezinelli L, Luiz AC, Correa L, Vogel C, Eduardo CD. Severity of Oral Mucositis in Patients Undergoing Hematopoietic Cell Transplantation and an Oral Laser Phototherapy Protocol: A Survey of 30 Patients. Photomed Laser Surg. 2008.12 (Epub ahead of print).

Elting L, Cooksley C, Chambers M, Cantor S, Manzullo E, Rubenstein E. The burdens of cancer therapy: clinical and economic outcomes of chemotherapy-induced mucositis. Cancer. 2003;98:1531–9.

Franco, RF, Araujo AG, Guerreiro JF, Elion J, Zago MA. Analysis of the 677 C → T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic groups. Thromb Haemost. 1998; 79:119-21.

Fridland A. Effect of methotrexate on deoxyribonucleotide pools and DNA synthesis in human lymphocyte cells. Cancer Res. 1974; 34: 1883-8.

Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Mathews RG et al.. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common methylenetetrahydrofolate reductase mutation causes thermoinstability. Nat Genet. 1995; 10:111-3.

Galili D, Tagger N, Garfunkel AA. Surveillance of oral cultures for Enterobacteriaceae during bone marrow transplantation. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1995; 31B:58-62.

Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. Biomed Pharmacother. 1999;53:169–80.

Genestier L, Paillot R, Fournel S, Ferraro C, Meiossec P,Reveillard JP. Immunosuppressive properties of methotrexate: apoptosis and clonal deletion of activated T cells. J Clin Invest. 1998; 102: 322-8.

Goekkurt E, Stoehlmacher J, Stueber C. Pharmacogenetic analysis of liver toxicity after busulfan/ cyclophosphamide-based allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Anticancer Res. 2007;27:4377–80.

Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z Et al.. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mamm Genome. 1998. 9:652-6.

Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. Am J Hum Genet. 1995; 56:1052-59.

Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG et al.. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. Nat Genet. 1994; 7:195-200.

Groener M, van Ineveld B, Byttebier G, van Hout B, Rutten F. An economic evaluation of Tomudexa (raltitrexed) and 5-fluourouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer. Anticancer Drugs. 1999;10:283–88.

Inoue S, Hashiguchi M, Chiyoda T, Sunami Y, Tanaka T, Mochizuki M. Pharmacogenetic study of methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase in Japanese and assessment of ethnic and gender differences. Pharmacogenomics. 2007;8:41–7.

Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. Am J Hum Genet. 2000;67:986–90.

Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, Ellison RC, Eckfeldt JH, Rosenberg IH et al.. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. Circulation. 1996; 93: 7–9.

Kang SS, Wong PWK, Cook H, Zhou J, Sora J, Lessick M et al.. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase in patients with coronary artery disease. Metabolism. 1998; 37:611-13.

Kang SS, Passen EL, Ruggie N, Wong PW, Sora H. Thermolabile defect of methylenetetrahydrofolate reductase in coronary artery disease. Circulation. 1993;88:1463-9.

Khouri VY, Stracieri AB, Rodrigues MC, Moraes DA, Pieroni F, Simões BP et al.. Use of therapeutic laser for prevention and treatment of oral mucositis. Braz Dent J. 2009;20:215-20.

Kim DH. The interactive effect of methyl-group diet and polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase on the risk of colorectal cancer. Mutat Res. 2007;622:14–8.

Kremer JM. Methotrexate pharmacogenomics. Ann Rheum Dis. 2006;65:1121-3.

Kremer JM. Toward a better understanding of methotrexate. Arthritis Rheumatism. 2004;50:1370-82.

Kühne A, Sezer O, Heider U, Meineke I, Muhlke S, Niere W et al.. Population pharmacokinetics of melphalan and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to side effects. Clin Pharmacol Ther. 2008;83:749-57.

Larsson SC, Giovannucci E, Wolk A. Folate intake, MTHFR polymorphisms, and risk of esophageal, gastric, and pancreatic cancer: a meta-analysis. Gastroenterology. 2006;131:1271–83.

Lockhart PB, Sonis ST. Alterations in the oral mucosa caused by chemotherapeutic agents. A histologic study. J Dermatol Surg Oncol. 1981; 7: 1019-25.

Löe, H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. J Periodontol.1967, 38 (Suppl): 610-16.

Maddens S, Charruyer A, Plo I, Dubreuil P, Berger S, Salles B et al.. Kit signaling inhibits the sphingomyelin-ceramide pathway through PLC gamma-1: implication in stem cell factor radioprotective effect. Blood. 2002;100:1294–01.

Main BE, Calman KC, Ferguson MM, Kaye SB, MacFarlane TW, Mairs RJ et al.. The effect of cytotoxic therapy on saliva and oral flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1984; 58: 545-8.

Martin DN, Boersma BJ, Howe TM. Association of MTHFR gene polymorphisms with breast cancer survival. BMC Cancer. 2006; 6:257-66.

Melkos AB, Massenkeil G, Arnold R, Reichart PA. Dental treatment prior to stem cell transplantation and its influence on the posttransplantation outcome. Clin Oral Investig. 2003;7:113-5.

Nelen WLDM, Blom HJ, Thomas CMG, Steegers EAP, Boers GHJ, Eskes TKAB. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism affects the change in homocysteine and folate concentrations resulting from low dose folic acid supplementation in women with unexplained recurrent miscarriages. J Nutr. 1998; 128: 1336–41.

Ohbayashi Y, Imataki O, Ohnishi H, Iwasaki A, Ogawa T, Inagaki N et al.. Multivariate analysis of factors influencing oral mucositis in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Ann Hematol. 2008;87:837-45.

Papas AS, Clark RE, Martuscelli G, O'Loughlin KT, Johansen E, Miller KB. A Prospective, randomized trial for the prevention of mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 2003; 31: 705-12.

Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H et al.. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. Am J Med Genet. 2002;107:162–8.

Ratkauskas JT, Davis JW. Effects of chlorhexidine during immunosuppressive chemotherapy: a preliminary report. Oral Surg Oral Medicine Oral Pathology. 1993; 76(4): 441-8.

Robien K, Schubert MM, Bruemmer B, Lloid ME, Potter JD, Ulrich CM et al.. Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic cell transplants for chronic myelogenous leukemia. J Clin Oncol. 2004: 22:1268-75.

Rocha V, Porcher R, Fernandes JF, Filion A, Bittencourt H, Silva W Jr et al..Association of drug metabolism gene polymorphisms with toxicities, graft-versus-host disease and survival after HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for patients with leukemia. Leukemia. 2009; 23:545-56.

Ruescher TJ, Sodeifi A, Scrivani SJ, Kaban LB, Sonis ST. The impact of mucositis on alpha-hemolytic streptococcal infection in patients undergoing autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancies. Cancer. 1998; 82:2275-81.

Ruiz-Argüelles GJ, Coconi-Linares LN, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V. Methotrexate-induced mucositis in acute leukemia patients is not associated with the MTHFR 677T allele in Mexico. Hematology. 2007;12:387-91.

Santos PSS; Coracin FL; Dulley FL; Barros JCA; Nunes FD et al. Impact of oral care prior to BMT on the severity and clinical outcomes of oral mucositis.. Clin Transpl. 2009 (Submetido).

Santos PSS, Davi RV, Castro NS, Barros JCA. Profilaxia da mucosite oral com laser de baixa potência em pacientes transplantados de medula óssea. Revista Bras de Hematol. 2004; 26 (supp 1): 55.

Santos PSS, Magalhães MHCG. Avaliação da mucosite oral em pacientes que receberam adequação bucal prévia ao transplante de medula óssea. RPG Rev Pós Grad. 2006;13(1):77-82.

Schubert MM; Izutsu KT. Iatrogenic causes of salivary gland dysfunction. J Dent Res. 1987, 66 Spec No: 680-8.

Schubert MM, Williams BE, Lloid ME, Donaldson G, Chapko MK. Clinical assessment scale for the rating of oral mucosal changes associated with bone marrow transplantation. Development of an oral mucositis index. Cancer. 1992; 69:2469-77.

Shimasaki N, Mori T, Samejima H, Sato R, Shimada H, Yahagi N et al.. Effects of methylenetetrahydrofolate reductase and reduced folate carrier 1 polymorphisms on high-dose methotrexateinduced toxicities in children with acute lymphoblastic leukemia or lymphoma. J Pediatr Hematol Oncol. 2006; 28:64–8.

Silness J, Löe H. Periodontal disease in pregnancy. 3. Response to local treatment. Acta Odontol Scand. 1966;24: 747-59.

Sonis S, Clark J. Prevention and management of oral mucositis induced by antineoplastic therapy. Oncology. 1991; 5: 6-10.

Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M et al.. Perspectives on Cancer Therapy-Induced Mucosal Injury- pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. Cancer Supp. 2004; 100 (9): 1995-2025.

Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J et al.. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol. 2001;19:2201-5.

Sonis, ST. Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. Oral Oncology. 1998; 34: 39-43.

Stamp L, Roberts R, Kennedy M, Barclay M, O'Donnel J, Chapman P. The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis - are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? Biomed Pharmacother. 2006;60: 678-87.

Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W et al.. Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. N Eng J Med. 1986; 314: 729-35.

Storb R. Preparative regimens for patients with leukemias and severe aplastic anemia (overview): biological basis, experimental animal studies and clinical trials at the Fred Hutchinson Cancer Research Center. Bone Marrow Transplant. 1994; 14 Suppl: S1-3.

Sugimoto K, Murata M, Onizuka M, Inamoto Y, Terakura S, Kuwatsuka Y et al.. Decreased risk of acute graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype. Int J Hematol. 2008; 87(5):451-8.

Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE.Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. Trends Pharmacol Sci. 2001;22:195-201.

Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J et al.. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. Blood. 2001; 98:231-4.

Ulvik A, Ueland PM, Fredriksen A, Meyer K, Vollset SE, Hoff G et al.. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. Hum Genet. 2007;121:57–64.

Urano W, Taniguchi A, Yamanaka H, Tanaka E, Nakajima H, Matsuda Y et al.. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. Pharmacogenetics. 2002;12: 183–90.

van der Put NM, Steegers-Theunissen RP, Frosst P, Trijbels FJ, Eskes TK, van den Heuvel LP et al.. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. Lancet. 1995; 346:1070-1.

van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. Semin Arthritis Rheumatism.1998;27:277-92.

Wessels JA, de Vries-Bouwstra JK, Heijmans BT, Slagboom PE, Goekoop-Ruiterman YP, Allaart CF et al.. Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. Arthritis Rheum. 2006; 54:1087–95.

Woo SB, Lee SJ, Schubert MM. Graft-vs.-host disease. Crit Rev Oral Biol Med. 1997; 8(2): 201-16.

ANEXO A – Aprovação CAPPESQ – HCFMUSP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.04.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa **nº 0122/07**, intitulado: **"ESTUDO DO POLIMORFISMO C677T DO GENE DA METILENOTETRAHIDROFOLATO REDUTASE (MTHFR) EM PACIENTES COM MUCOSITE DO TRATO GASTROINTESTINAL APÓS TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE MEDULA ÓSSEA"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA,** inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley**
Pesquisador(a) Executante: **Fábio Luiz Coracin**

CAPPesq, 18 de abril de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 – São Paulo – SP
Fone: 011 - 30696442 fax : 011 - 3069 6492 – e-mail : cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
sol

ANEXO B – Aprovação CEP/FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Protocolo 187/06

Informamos a Vossa Senhoria, que diante do Parecer da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, estamos cientes da aprovação do projeto de pesquisa intitulado "**Estudo do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato dredutase (MTHFR) em pacientes com mucosite do trato gastrointestinal após transplante alogênico de medula óssea**" de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Fábio Luiz Coracin, sob orientação do Professor Doutor Frederico Luiz Dulley, não havendo nenhuma oposição por parte deste CEP, com relação a sua realização.

São Paulo, 15 de maio de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - FAX (0XX11) 3091-7887.

ANEXO C – Ficha de Avaliação Clínica

NOME: _____

REGISTRO: _____IDADE:_____

DOENÇA: _____

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____

DATA DO TRANSPLANTE: _____

FONTE DE CÉLULA: _____

DOADOR: _____ IDADE:_____

REGIME DE CONDICIONAMENTO: _____

PROFILAXIA DA DECH: _____

Índice de Placa:

6		1		6		6		1		6

Índice Gengival:

6		1		6		6		1		6

Avaliação Dentária Pré TMO - CPOD

			5	4	3	2	1	1	2	3	4	5			
8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
8	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8
			5	4	3	2	1	1	2	3	4	5			

AVALIAÇÃO DA MUCOSITE - OMS

	D+	D+	D+	D+	D+	D+	D+
Graduação							

	D-		D-
Ácido Fólico		Metotrexate	

ANEXO D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE .:.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Estudo do polimorfismo C677T do gene da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) em pacientes com mucosite bucal após transplante alogênico de medula óssea.

PESQUISADOR: Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley

CARGO/FUNÇÃO: .Médico

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 33.842

UNIDADE DO HCFMUSP: Transplante de Medula Óssea

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO □ RISCO MÍNIMO [X] RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : março de 2007 a março de 2009

II - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Este estudo vai avaliar geneticamente o risco de desenvolvimento de mucosite na boca após o transplante de medula óssea

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Para isso, será coletada uma amostra de sangue e serão realizadas avaliações da boca durante alguns dias no período de internação. Cada avaliação vai ser realizada para verificar a presença de feridas e/ou dor. O sangue será processado e analisado se tem uma variação genética que pode dar mais ou menos feridas na boca.

3. desconfortos e riscos esperados

Esta pesquisa não tem riscos pois apenas será coletado um pouco de sangue como se fosse para fazer um hemograma.

4. benefícios que poderão ser obtidos

Você poderá ser encaminhado para avaliação no Ambulatório de Odontologia do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Não há procedimentos alternativos para este estudo.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Em qualquer momento do estudo os sujeitos, seus responsáveis e familiares terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de dúvidas e sobre o andamento do trabalho.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Fui esclarecido(a) que posso retirar meu consentimento a qualquer momento sem necessidade de justificar o motivo da desistência, antes ou durante o mesmo, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada qualquer informação que possa levar a sua identificação

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Fábio Luiz Coracin – (11) 3061-5544 ramal 218

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes - (11) 3091-7902

Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley - (11) 3061-5544 ramal 218

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal	assinatura do pesquisador (carimbo ou nome Legível)

ANEXO E – Cópia do Manuscrito de Revisao enviado para o periódico Critical Reviews in Oncology/Hematology

Elsevier Editorial System(tm) for Critical Reviews in Oncology/Hematology

Manuscript Draft

Recent advances in oral mucositis knowledge and development

Keywords: mucositis; drug therapy; single nucleotide polymorphism; bone marrow transplantation.

Corresponding Author: Mr Fabio Luiz Coracin, MsC

Corresponding Author's Institution: University of Sao Paulo - School of Dentistry

First Author: Fabio Luiz Coracin, MsC

Order of Authors: Fabio Luiz Coracin, MsC; Paulo S Silva Santos, PhD; Giovanni Lodi, PhD; Frederico L Dulley, PhD; Fabio D Nunes, PhD

Abstract: Oral mucositis remains as a painful condition with potentially life-threatening sequelae leading to an adverse impact on the quality of life of patients. This disease is frequently associated with allogeneic bone marrow transplantation. Also, mucositis is related to an increased risk of systemic infections, mainly after HSCT, escalating the cost with drugs, hospitalization and the risk of dead by sepsis. Recently, single nucleotide polymorphisms in genes that codify enzymes metabolizing chemotherapeutic drugs were related to increase the incidence and severity of oral mucositis. Few papers in the literature have described the genetic risk of oral mucositis development and relating to the variable response to the toxicity of chemotherapeutic drugs. The focus of this article is to examine the current literature relative to the role of genetic mutations resulting in deficiencies of metabolism of specific

chemotherapeutic drugs, particularly methotrexate. Furthermore, specific approaches to prevent or minimizes oral mucositis remains a challenge to clinicians, what encourages researchers to investigate its molecular mechanisms and clinicians to contribute to its management. Since new concepts of oral mucositis development has been published, it is important for clinicians and researchers to be aware that individual changes in metabolizing drugs are closely related to mucositis development and severity.

Abstract

Oral mucositis remains as a painful condition with potentially life-threateningsequelae leading to an adverse impact on the quality of life of patients. This disease is frequently associated with allogeneic bone marrow transplantation. Also, mucositis is related to an increased risk of systemic infections, mainly after HSCT, escalating the cost with drugs, hospitalization and the risk of dead by sepsis. Recently, single nucleotide polymorphisms in genes that codify enzymes metabolizing chemotherapeutic drugs were related to increase the incidence and severity of oral mucositis. Few papers in the literature have described the genetic risk of oral mucositis development and relating to the variable response to the toxicity of chemotherapeutic drugs. The focus of this article is to examine the current literature relative to the role of genetic mutations resulting in deficiencies of metabolism of specific chemotherapeutic drugs, particularly methotrexate. Furthermore, specific approaches to prevent or minimizes oral mucositis remains a challenge to clinicians, what encourages researchers to investigate its molecular mechanisms and clinicians to contribute to its management. Since new

concepts of oral mucositis development hás been published, it is important for clinicians and researchers to be aware that

individual changes in metabolizing drugs are closely related to mucositis development and severity.

Keywords:

mucositis, drug therapy, single nucleotide polymorphism, bone marrow transplantation

1. Introduction

Oral mucositis is a painful condition with potentially life-threatening sequelae, often develops in association with allogeneic bone marrow transplantation. This condition has an adverse impact on the quality of life of patients undergoing marrow transplantation therapy. The severe pain often necessitates the use of systemic opioid analgesics and the patients with severe mucositis have great difficulty in swallowing and may need parentheral nutritional support1. Recently, mutations in genes that codify enzymes metabolizing chemotherapeutic drugs were related in promoting an increase in the incidence and severity of oral mucositis. Thus, the focus of this article is to examine the current literature relative to the role of genetic mutations resulting in deficiencies of metabolism of specific chemotherapeutic drugs, particularly methotrexate. Since new concepts of oral mucositis development has been published, it is important for clinicians and researchers to know that individual changes in metabolizing drugs are closely related to mucositis development and severity.

2. Epidemiology

Oral mucositis can affect up to 100% of patients undergoing high-dose chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation, around 80% of patients with malignancies of the head and neck receiving radiation therapy, and a wide range of patients receiving different chemotherapic drugs[3].

3. Pathogenesis

Oral mucositis is characterized by a toxic reaction that affects the entire gastrointestinal tract as a result of exposure to chemotherapy agents and/or ionizing radiation[1-3]. In the mouth, mitosis of basal cells is affected and the epithelium suffers, becomes atrophic and ulcerated, exposing the subjacent connective tissue. The consequence is intense pain, secondary infection, and difficulty in feeding and speaking. Such symptoms may increase the risk of morbidity and mortality among patients undergoing antineoplastic treatment[1,2] and even leads to interruption of the treatment[2].

The first hypothesis for mucositis development was proposed in 1998 by Sonis and was based on animal and clinical data[1]. Mucositis was described as a four interdependent phases process, consequence of a series of processes mediated by cytokines, direct drug effects on epithelium, oral flora and bone marrow status: inflammatory/vascular, epithelial, ulcerative/ bacteriological and healing[1]. New hypothesis of mucositis, also developed by Sonis et al (2004), is based on a five phase's process: initiation, with generation of reactive oxygen species by chemotherapeutic agents or radiation, upregulation and generation of messenger signals, signaling and amplification of mucosal injury. This hypothesis is also based mainly on the release of proinflamatory cytokines, ulceration and healing[3]. At first, the pathobiology of mucositis was considered to be limited to direct epithelial injury. Nowadays, mucositis is the culmination of a

series of biologically complex and interactive events that occur in all tissues of the mucosa[3].

4. Scoring oral mucositis

The most used oral toxicities scale is based on World Health Organization and measures anatomic, symptomatic, and functional components of oral mucositis. Severity is graded from 0 (no mucositis) to 4 (alimentation not possible and the patient needs total parenteral feeding)4. The Oral Mucositis Assessment Scale (OMAS) provides an objective assessment based on score

of the degree of ulceration/ pseudomembrane (score, 0 to 3) and erythema (score, 0 to 2) on the labial mucosa, right and left buccal mucosa, right and left ventral and lateral tongue, floor of the mouth, soft palate/fauces, and hard palate5. The OMAS has been shown to be highly reproducible between observers, responsive over time, and to accurately record the elements

considered to be associated with mucositis. Other scale used score oral mucositis is the National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) that provides a rating of the severity of oral mucositis on a scale of 0 (none) to 4 (most severe)6.

5. Risk Factors

It is important that the pathobiology of mucositis is fully determined and clarified so that treatment and management strategies can be developed. Efficacy and toxicity of anticancer agents vary greatly among patients. These differences in response to agents are attributable to the activities of drug metabolizing enzymes and to alterations of target molecules in tumors cells. Polymorphisms of the genes encoding these proteins are known to cause heterogeneity in drug response7. Recently, two classes of drugs are under investigation,

methotrexate and melphalan. Methotrexate is an anti-folate agent and largely used in cancer chemotherapy as well as in graft-versus-host disease (GVHD) prophylaxys following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Methotrexate is metabolized by 5,10 methilenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) that converts it into an active form. Melphalan is a chemotherapy drug belonging to the class of nitrogen mustard alkylating agents metabolized by gluthatione-S-transferase.

6. Methotrexate and methylenetetrahydrofolate reductase gene Methotrexate is used in cancer therapy as an antagonist of folic acid. In HSCT patients, methotrexate is used to GVHD prophylaxis in association to cyclosporine after allogeneic HSCT8,9. Folate is required as donor methyl group to convert homocystein to methionine as well as to nucleotide synthesis and it needed for DNA synthesis and cell repair. Tissues with rapidly dividing cells (as gastrointestinal tract cells) represents the usual site of toxicities10. MTHFR hás an important role in the metabolism of folate and methionine11. MTHFR synthesizes 5-methyltetrahydrofolate, the primary circulatory form of folate, which serves as a methyl donor for homocysteine remethylation to methionine[12].

The enzyme MTHFR activity received more interest after the work published by Kang (1993) associating a termolabile MTHFR variant with cardiovascular disease followed by a study conducted by Frosst describing the C677T polymorphisms in MTHFR gene13. Twenty nine other mutations (misense/nonsense) are listed in the Human Gene Mutation Database at The Institute of Medical Genetics in Cardiff (http://www.hgmd.cf.ac.uk) including homocysteinuria14-18, methylenetetrahydrofolate reductase deficiency19-20,

as well as, association with cardiovascular disease, association to additional risk of neural tube defect and association with preeclampsia[13,21]. Nowadays, a few papers have described the genetic risk of oral mucositis development and relating to the variable response to the toxicity of chemotherapeutic drugs[22-24]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) affecting enzymes needed for metabolism of chemotherapeutic agents, were identified as important prognostic determinants of response to chemotherapy[25] and individuals who express different phenotypes can have increased risk of drugs toxicities[3]. Two common SNPs of metilenetetrahidrofolate reductase (MTHFR - C677T and A1298C) have been described as having opposite effects on cancer patients, reducing cancer susceptibility and increasing drug-related toxicities, when methotrexate are used[22,25]. C677T is characterized by cytosine to valine change in codon 222 causing an alanine to valine substitution in DNA coding sequence[24]. The clinical relevance of this SNP on HSCT patients is related to a decrease of enzyme activity, reported as 30% in homozygous mutant genotype (TT) and 60% in heterozygous genotype (CT)[24,26]. A1298C polymorphism clearly reduces enzyme activity, albeit to a lesser extent than the C677T [27].

7. Melphalan and Glutatione-S-transferase

Melphalan is another drug with wide range use on cancer therapy. High dose melphalan and autologous bone marrow transplantation is used in some cases of multiple myeloma. Clinical studies have demonstrated that response to treatment increases with dose, however there is an increase on the incidence and severity of side effects28,29. Glutatione-S-transferase (GST) is responsible to metabolize the complex melphalan-glutatione30. GST gene carries two polymorphisms [Ile □Val (codon 105) and Ala → Val (codon114)] that reduce

enzyme activity31,32. In a recent study, Kühne et al analyzed whether melphalan's side effect (diarrhea, mucositis and leucopenia) might be reduced according to drug metabolism (pharmacokinetic measurements). In this cohort of 84 patients treated with melphalan, the incidence of grade 4 oral mucositis, of WHO scale, reached a plateau and was observed lower carriers of GSTP1 valine104 variant[33].

8. Clinical Aspects and Outcomes

Mucositis represents a severe complication after HSCT favoring the entry of microorganisms, mainly in the period of myelosuppression, and predisposing to infection[2]. Furthermore, it is consensus that the extent and severity of oral mucositis is highly related to days of injectable narcotics, total parenteral nutrition, injectable antibiotics, infections, hospital days and charges and mortality[2]. Seven to 10 days after chemotherapy or at cumulative radiation doses of 30 Gy, ulcers develop, resulting in marked discomfort. Chemotherapy induced mucositis generally heals spontaneously by 21 days after infusion, while radiation-induced mucositis stays at a peak for at least 2 weeks following the completion of radiotherapy (typically 60–70 Gy)[34].

9. Future Perspectives

Mucositis is related to an increased risk of systemic infections mainly after HSCT; consequently the cost with drugs and hospitalization will be higher. It is well known that oral mucositis also increase the morbidity and mortality following bone marrow transplantation and decrease the quality of life. Specific approaches to prevent or minimizes oral mucositis remains a challenge to clinicians, what encourages researchers to investigate its molecular mechanisms and clinicians to contribute to its management. Predicting

response to possibly life-threatening toxic effects is highly important. Pharmacogenetic research using the pharmacological-pathway approach and research using the genomic or proteomic approaches will complement each other[10]. Very few studies were performed to establish the relationship between drugs related toxicities and genetic alterations. It has been reported that single nucleotide polymorphisms in the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase (C677T and A1298C), could increase the incidence and occurrence of oral mucositis in patients treated with methotrexate. Recently, there is no data on the literature comparing these SNPs in patients treated with and without MTX. Studies relating drugs toxicity with genetic alterations or gene expression will better explain mucositis pathogenesis thus contributing to improve clinical protocols and patients quality of life. New investigations are in progress to understand the pathobiology of regimen-related toxicities, and to use genetic testing as a predictor of toxicity risk.

Bibliography

1. Sonis ST: Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity. Oral Oncol 1998;34:39-43.

2. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, Hayden V, Eilers J, Epstein JB, LeVeque FG, Miller C, Peterson DE, Schubert MM, Spijkervet FK, Horowitz M: Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 2001;19:2201-2205.

3. Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB: Perspectives on câncer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. Cancer 2004;100:1995-2025.

4. Parulekar W, Mackenzie R, Bjarnason G, Jordan RC: Scoring oral mucositis. Oral Oncol 1998;34:63-71.

5. Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, LeVeque FG, Liggett WH, Jr., Mulagha MT, Peterson DE, Rose AH, Schubert MM, Spijkervet FK, Wittes JP: Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. Mucositis Study Group. Cancer 1999;85:2103-2113.

6. Trotti A, Byhardt R, Stetz J, Gwede C, Corn B, Fu K, Gunderson L, McCormick B, Morrisintegral M, Rich T, Shipley W, Curran W: Common toxicity criteria: version 2.0. an improved reference for grading the acute effects of cancer treatment: impact on

radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000;47:13-47.

7. Sekine I, Saijo N: Polymorphisms of metabolizing enzymes and transporter proteins involved in the clearance of anticancer agents. Ann Oncol 2001;12:1515-1525.

8. Storb R, Deeg HJ, Pepe M, Appelbaum F, Anasetti C, Beatty P, Bensinger W, Berenson R, Buckner CD, Clift R, et al.: Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLAidentical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of a controlled trial. Blood 1989;73:1729-1734.

9. Storb R, Deeg HJ, Whitehead J, Appelbaum F, Beatty P, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Farewell V, et al.: Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. N Engl J Med 1986;314:729-735.

10. Ulrich CM, Robien K, McLeod HL: Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. Nat Rev Cancer 2003;3:912-920.

11. Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, Laurenti L, Sora F, Mele L, Annino L, Leone G, Sica S: Preponderance of methylenetetrahydrofolate reductase C677T homozygosity among leukemia patients intolerant to methotrexate. Ann Oncol 2002;13:1915-1918.

12. Rozen R: Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. J Inherit Metab Dis 1996;19:589-594.

13. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, et al.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995;10:111-113.

14. Goyette P, Christensen B, Rosenblatt DS, Rozen R: Severe and mild mutations in cis for the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene, and description of five novel mutations in MTHFR. Am J Hum Genet 1996;59:1268-1275.

15. Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R: Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. Am J Hum Genet 1995;56:1052-1059.

16. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R: Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA mapping and mutation identification. Nat Genet 1994;7:551.

17. Sibani S, Christensen B, O'Ferrall E, Saadi I, Hiou-Tim F, Rosenblatt DS, Rozen R: Characterization of six novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene in patients with homocystinuria. Hum Mutat 2000;15:280-287.

18. Sibani S, Leclerc D, Weisberg IS, O'Ferrall E, Watkins D, Artigas C, Rosenblatt DS, Rozen R: Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. Hum Mutat 2003;21:509-520.

19. Kluijtmans LA, Wendel U, Stevens EM, van den Heuvel LP, Trijbels FJ, Blom HJ: Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. Eur J Hum Genet 1998;6:257-265.

20. Tonetti C, Amiel J, Munnich A, Zittoun J: Impact of new mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene assessed on biochemical phenotypes: a familial study. J Inherit Metab Dis 2001;24:833-842.

21. Pegoraro RJ, Chikosi A, Rom L, Roberts C, Moodley J: Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in black South Africans and the association with preeclampsia. Acta Obstet Gynecol Scand 2004;83:449-454.

22. Robien K, Schubert MM, Bruemmer B, Lloid ME, Potter JD, Ulrich CM: Predictors of oral mucositis in patients receiving hematopoietic cell transplants for chronic myelogenous leukemia. J Clin Oncol 2004;22:1268-1275.

23. Robien K, Schubert MM, Chay T, Bigler J, Storb R, Yasui Y, Potter JD, Ulrich CM: Methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genotypes modify oral mucositis severity following hematopoietic stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2006;37:799-800.

24. Ulrich CM, Yasui Y, Storb R, Schubert MM, Wagner JL, Bigler J, Ariail KS, Keener CL, Li S, Liu H, Farin FM, Potter JD: Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism. Blood 2001;98:231-234.

25. Gemmati D, Ongaro A, Tognazzo S, Catozzi L, Federici F, Mauro E, Della Porta M, Campioni D, Bardi A, Gilli G, Pellati A, Caruso A, Scapoli GL, De Mattei M: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C gene variants in adult non-Hodgkin's lymphoma patients: association with toxicity and survival. Haematologica 2007;92:478-485.

26. Toffoli G, Veronesi A, Boiocchi M, Crivellari D: MTHFR gene polymorphism and severe toxicity during adjuvant treatment of early breast cancer with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil (CMF). Ann Oncol 2000;11:373-374.

27. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R: A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Mol Genet Metab 1998;64:169-172.

28. Moreau P, Le Bonniec M, Harousseau JL: [High-dose melphalan in patients with multiple myeloma]. Bull Cancer 1999;86:283-288.

29. Moreau P, Milpied N, Mahe B, Juge-Morineau N, Rapp MJ, Bataille R, Harousseau JL: Melphalan 220 mg/m2 followed by peripheral blood stem cell

transplantation in 27 patients with advanced multiple myeloma. Bone Marrow Transplant 1999;23:1003-1006.

30. Hall AG, Matheson E, Hickson ID, Foster SA, Hogarth L: Purification of an alpha class glutathione S-transferase from melphalan-resistant Chinese hamster ovary cells and demonstration of its ability to catalyze melphalan-glutathione adduct formation. Cancer Res 1994;54:3369-3372.

31. Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA: Human glutathione Stransferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. Carcinogenesis 1998;19:275-280.

32. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal SS, Srivastava SK, Awasthi S, Awasthi YC: Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. Eur J Biochem 1994;224:893-899.

33. Kuhne A, Sezer O, Heider U, Meineke I, Muhlke S, Niere W, Overbeck T, Hohloch K, Trumper L, Brockmoller J, Kaiser R: Population pharmacokinetics of melphalan and glutathione S-transferase polymorphisms in relation to side effects. Clin Pharmacol Ther 2008;83:749-757.

34. Scully C, Sonis S, Diz PD: Oral mucositis. Oral Dis 2006;12:229-241.

ANEXO F – Cópia do Manuscrito enviado para o periódico Clinical Transplantation

IMPACT OF ORAL CARE PRIOR TO BMT ON THE SEVERITY AND CLINICAL OUTCOMES OF ORAL MUCOSITIS

Santos PSS; Coracin FL; Barros JCA; Dulley FL; Nunes FD; Magalhaes MG

Keywords:

adverse effects, mouth diseases, bone marrow transplantation, stomatitis, drug therapy

Abstract:

The patients who underwent BMT frequently experience gastrointestinal toxicity as a result of the preparative regimen. The most frequent manifestation is oral mucositis (OM) and diarrhea. We have studied the effects of oral care prior to BMT on the severity of OM. The purpose of this study was to assess and compare the incidence, severity and time elapsed of oral mucositis in patients who receive oral care before BMT (Study Group SG), and without oral care before BMT (Control Group CG). Seventy patients suffering from hematological malignancies who undergone to allogeneic or autologous BMT under-conditioning chemotherapy without radiotherapy, were evaluated by two previously calibrated dentists using the WHO scale for assessing the severity of OM, divided into 2 groups (35 patients - SG, 35 – CG). The results showed no differences ($p=0.20$) in the incidence or severity of OM among the groups. Indeed, SG showed shorter time elapsed ($p<0.001$) comparing with the CG.

This study show the importance of simple, inexpensive preventive intervention to control the time elapsed of OM, reducing morbidity as well as time in the hospital and cost of the treatment. Our results suggest that it is important to include dentists in the organ and tissue transplant teams.

INTRODUCTION

Oral mucositis (OM) is one of the most frequent adverse effects of bone marrow transplantation (BMT). It is characterized by a toxic reaction that affects the entire gastrointestinal tract as a result of exposure to chemotherapy agents and/or ionizing radiation. In the mouth, mitosis of basal cells, which normally undergo rapid cell division, is affected. When cell division is compromised, the epithelium suffers, becomes atrophic and ulcerated, and exposes the subjacent connective tissue[1,2]. This causes intense pain, secondary infection, and difficulty when eating or speaking. Such symptoms may increase the risk of morbidity and mortality among patients receiving antineoplastic treatment1,2 and even interrupt the treatment. Pre-existing oral diseases act as reservoirs of opportunistic and pathogenic organisms and may be risk factors for local and systemic infections in transplant patients. Immunosuppression or neutropenia may lead to infections3 which in turn may worsen OM and cause local and systemic complications. The most common signs and symptoms of OM are erythema, edema, burning sensation, increased sensitivity to hot and spicy foods, white patches on mucous membranes of the cheeks, lips, tongue and palate, and subsequent painful ulcers. The latter makes it hard to swallow, which leads to malnutrition and dehydration, consequently affecting mucosal

regeneration4. Oral lesions usually disappear after recovery, and there is no scar formation unless OM is worsened by severe infection5. Sonis et al (2001) established a relationship between OM and bacteremia, and showed that poor oral care could lead to infected oral ulcers and disseminated infection. Oral care protocols prior to BMT have been increasingly recommended and discussed in scientific literature. These protocols include careful clinical and radiographic examination of the mouth and the removal of all infectious foci before transplantation. Some authors have demonstrated that proper oral care before BMT reduces the severity of OM during the immunosuppression period6,7. But few authors have conducted prospective and comparative studies. The purpose of this study was compare the incidence and severity of OM between a group of patients submitted to BMT who received proper oral care prior to transplantation and a group of patients underwent to BMT who did not receive any dental treatment.

METHODS

Seventy patients suffering from hematological malignancies and undergone to allogeneic and autologous BMT were included in this study. The patients were divided into 2 groups: the Study Group (SG) was composed of 35 patients with chronic myeloid leukemia (CML) who received allogeneic BMT and the Control Group (CG) was composed of 35 patients suffering from hematological malignancies who received allogeneic and autologous BMT. The patients in the SG received homogeneous type of combination chemotherapy, which included Busulfan (4 mg/kg/day) for four days and Cyclophosphamide (60 mg/kg/day) for

two days, and prophylaxis of Graft-versus-Host-Disease (GVHD), i.e., methotrexate and cyclosporine. The CG conditioning regimen was performed using Bussulfan (3 mg/kg/day) for four days, plus Melphalan (100mg/m²) (for autologous transplantation for multiple myeloma), Busulfan (4 mg/kg/day) for four days plus Melphalan (140mg/m²) (for allogeneic transplantation) and, in one case, Fludarabina (25mg/m²/day) for five days plus Melphalan (90mg/m²/day) for two days (in non-myeloablative transplantation). Oral examinations prior to transplantation were performed always by the same two trained oral health care professionals, with the patient on a gurney, under artificial light, using a dental mirror and a dental probe. Panoramic radiographs of all study group patients were taken. All information were transcribed to a form especially designed to this study. Clinical examination of patients from SG focused the presence of caries and periodontal disease, as well as integrity of restorations and prosthesis. Opportunistic infections were assessed both clinically and through exfoliative cytology. The SG patients received general dental treatment according to their individual needs. The CG patients did not receive any dental treatment prior to BMT. After hospital admission for transplantation, all patients (SG and CG) were monitored by the oral health care professionals and the nursing staff. After hospital admission, oral care was carried out with alcohol-free chlorhexidine mouth rinse (0.12%), and oral hygiene using the Stillman method. When oral mucositis was detected, topical treatment with anesthetic and anti-inflammatory solutions of benzidamine (1.5mg/six times a day) was given. In cases of grade 3 and 4 oral mucositis, systemic analgesics such as morphine were used.

The incidence, the severity according to the WHO classification, and time elapsed of OM were compared between the SG and CG. The incidence of OM between the groups was analyzed by the Fisher's exact test. The severity of OM in both SG and CG was analyzed by the t-student statistical test. The time elapsed of OM for both the SG and CG was compared and analyzed by the Two-Sample T Test.

ETHICAL FEATURES

This study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil.

RESULTS

Among the 35 patients from SG, 30 (85.71%) showed signs and symptoms of oral mucositis. Of these, 25 (71.42%) had grade 1 or 2 OM, which meant that they could still eat, and 5 patients (14.28%) had grade 3 or 4 OM, which made food intake impossible, thus requiring prolonged parenteral nutrition. Among the 35 patients from CG, 34 (97.14%) showed signs and symptoms of oral mucositis. Of these, 13 (74.28%) had grade 1 or 2 OM, which allowed them to be fed, and 5 (25.71%) had grade 3 or 4 OM. There was no statistical difference in the incidence between the groups(Fisher’s exact test, p=0,20) and no statistical difference in the severity of OM between the SG and CG (t-student statistical test, $p>0.05$). The time elapsed of OM for both the SG (median=10 days) and CG (median=20 days) was compared and the SG showed shorter time elapse (Two-Sample T-Test; $p<0.001$).

DISCUSSION

The results obtained by this study show that the incidence of oral mucositis in patients with chronic myeloid leukemia who received oral care prior to BMT (SG) was percentually lower in the group without oral care prior to BMT (CG). According severity there was no statistical difference between the groups. But fewer cases of severe OM (grades 3 and 4) were observed in SG. Our study suggests that patients with the same primary disease, submitted to the same chemotherapy regimen and who received standardized oral care prior to bone marrow transplantation showed lower incidence and no differences in severity (p=NS), although the time elapsed of oral mucositis was shorter ($p<0.001$). Oral care prior to BMT was statistically significant in the time elapsed in OM in the study group. When we compared with the international literature, the incidence of grade 3 (8.57%) and 4 (5.71%) OM among patients from SG was lower than that reported by other authors8. Aslan (2003) noted that 19.64% of the transplant patients Who developed grade 4 OM were not given oral care prior to BMT, but received topical care over the period following hospital admission for transplantation. Hwang et AL (2004) noted that 63.33% of the patients from a group that did not receive prophylaxis for oral mucositis developed grade 3 or 4 OM. Although it is accepted that prior oral care is important to promote better well being after chemotherapy11 there are not many studies demonstrating its effect. Melkos ET al (2003) carried out a comparative study of patients submitted to BMT, with and without prior oral care, and observed that patients who were treated before transplantation suffered less from severe OM (36.20% of patients with grade 3 or 4 OM). In this study, the study group was standardized, composed of patients who were diagnosed with the same

disease, submitted to the same chemotherapy regimen and monitored by the same team of oral health care providers. Therefore, it was difficult to compare the results we obtained with those found in the literature, especially because of the lack of homogeneity of the samples in those studies, composed mostly of patients with different primary diseases who required different types of chemotherapy regimen. This makes it difficult to accurately assess the role of prior oral care because important variables such as the chemotherapy drug used were not the same in all cases. In this study, the underlying diseases showed difficulties in standardizations. However the conditioning regimens showed more similarities and it could affect the time elapsed of OM in both groups but not the severity of OM. During a systematic review of The Cochrane Library, Clarkson et al (2003) foundonly two studies that assessed oral care and its relationship with oral mucositis, namely the studies conducted by Borowski (1994) and Shieh (1997). The former analyzed patients submitted to BMT, but did not use the WHO classification for oral mucositis. The latter was related to radiotherapy. The study conducted by Clarkson et al (2007) reported that oral care prior to radiotherapy or chemotherapy had little impact on preventing oral mucositis. This literature review did not assess the relationship between prior oral care and the severity of oral mucositis. In addition to the oral care prior to HSCT recent research investigated the clinical effects of low-power laser therapy (LPLT), showing that there is indication for the use of upfront LPLT in patients who have undergone HSCT is a powerful instrument in reducing the incidence of OM17,18. Our present study shows the importance of simple, inexpensive preventive intervention to control the time elapsed of OM, reducing morbidity as well as time in the hospital and cost of the treatment. In addition,

the results we obtained suggest that it is important to include dentists in the organ and tissue transplant teams.

REFERENCES:

1. Horowitz MM, Oster G, Fuchs H. Oral Mucositis Assessment Scale (OMAS) as a predictor of clinical and economic outcomes in bone marrow transplant patients. Blood 1999;94(suppl 1):399a.

2. Sonis ST, Oster G, Fuchs H, Bellm L, Bradford WZ, Edelsberg J, et al. Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation. J Clin Oncol 2001;19(8):2001-2005.

3. Duncan M, Grant G. Review article: oral and intestinal mucositis — causes and possible treatments. AP&T 2003;18(9):853–874.

4. Sonis ST. The pathobiology of mucositis. Cancer Nature Reviews 2004;4:277- 284.

5. 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.

6. Schubert MM, Williams BE, Lloid ME, Donaldson G, Chapko MK. Clinical assessment scale for the rating of oral mucosal changes associated with bone marrow transplantation. Cancer 1992;69(10):2469-2477.

7. Woo SB, Treister N. Chemotherapy-Induced oral mucositis. Available from URL: www.emedicine.com/derm/topic682.htm [2005 Feb. 10].

8. Wardley AM, Jayson GC, Swindel R, Morgenstern GR, Chang J, Bloor R, et al. Prospective evaluation of oral mucositis in patients receiving myeloablative

conditioning regimens and haematopoietic progenitor rescue. Br J Haematol 2000;110(2):292-299

9. Aslan, Ö.; Öztürk, Ü.; Bulut, Z.; Arpaci, F.; Özet, A. Oral care in bone marrow transplanted patients who develop mucositis Bone Marrow Transplantation 2003;31(Suppl 1):S280.

10. Hwang HYK; Koh LP; Ng HJ; Tan PHC; Chuah CTH; Fook SC, et al. A randomized trial of amifostine as a cytoprotectant for patients receiving myeloablative therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation Bone Marrow Transplantation 2004; 34: 51–56.

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

12. Melkos AB, Massenkeil G, Arnolde R, Reichart PA. Dental treatment prior to stem cell transplantation and its influence on the prost transplantation outcome. Clin Oral Invest 2003;7:113-115.

13. Clarkson JE, Worthington HV, Eden OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2003;3:CD000978.

14. Clarkson JE, Worthington HV, Eden OB. Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment. Cochrane Database Syst Rev. 2007;18(2):CD001973.

15. Borowski B, Benhamou E, Pico JL, Laplanche A, Margainaud JP, Hayat M. Prevention of oral mucositis in patients treated with high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation: a randomised controlled trial comparing two protocols of dental care. Eur J Cancer B Oral Oncol 1994;30B(2):93-97.

16. Shieh SH, Wang ST, Tsai ST, Tseng CC. Mouth care for nasopharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy. Oral Oncology 1997;33(1):36-41.

17. Migliorati CA, Oberle-Edwards L, Schubert MM. The role of alternative and natural agents, cryotherapy, and/or laser for management of alimentary mucositis. Support Care Cancer 2006;14(6):533-540.

18. Antunes HS, Azevedo AM, Bouzas LFS, Adão CAE, Pinheiro CT, Mayhe R, ET al. Low-power laser in the prevention of induced oral mucositis in bone marrow transplantation patients: a randomized trial. Blood 2007;109(5):2250-2255.