ERIKA MONT'ALVERNE PEREIRA SILVA

**Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de
pacientes pediátricos antes e depois do transplante renal**

São Paulo

2010

ERIKA MONT'ALVERNE PEREIRA SILVA

**Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de
pacientes pediátricos antes e depois do transplante renal**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor
em Odontologia

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra Marina Helena Cury
Gallottinni de Magalhães

São Paulo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Silva EMAP. Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de pacientes pediátricos pré e pós-transplante renal. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao **Vitor** (*in memorian*), meu pai, que com certeza não esteve presente apenas nos momentos difíceis desta vida, mas de muitas outras, mostrando-me através de seus atos de amor o quanto preciso evoluir para me tornar uma pessoa melhor. Sem você eu nada seria. Você é parte de mim e sempre vou te amar! Tenho a certeza que nunca vou ficar só, você estará sempre ao meu lado.

"Enquanto houver você do outro lado
Aqui do outro eu consigo me orientar
A cena repete a cena se inverte
Enchendo a minh'alma d'aquilo que outrora eu deixei de acreditar

Tua palavra, tua história
Tua verdade fazendo escola
E tua ausência fazendo silêncio em todo lugar

Metade de mim
Agora é assim
De um lado a poesia, o verbo, a saudade
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar ao fim
E o fim é belo incerto... Depende de como você vê
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só

Só enquanto eu respirar
Vou me lembrar de você
Só enquanto eu respirar"

O ANJO MAIS VELHO
Fernando Anitelli

A **Waltair**, minha mãe, incansável mulher, mãe, médica, filha e irmã. Todo dia penso em tudo que você é e em tudo que você faz para ajudar quem precisa e para conquistar seus sonhos...

Certifico-me que quando cheguei neste mundo escolhi a mãe certa pra mim, aquela que com seu amor incondicional, sua força de vida me ensina a lutar por meus objetivos, buscando uma vida profissional e pessoal melhor.

Como você disse um dia: "Mesmo tendo um ninho novo, nunca vou deixar de ter nosso ninho e com certeza nossas energias (que são enormes) devem se entrelaçar sempre, assim seremos presentes em qualquer que seja o lugar, e onde quer que estejamos".

Nossas perdas nos fazem crescer e você sempre faz as minhas dores serem menores e minhas alegrias maiores, na verdade Deus me presenteou quando me deu pais tão maravilhosos!

Obrigado por ser parte de mim, e também obrigado por deixar ser sua parte e me receber como sua filha! Te amo muito!!

Ao meu marido **Breno**, que me faz um ser humano feliz, retratando o que Augusto Cury disse: "Se você passar por uma guerra no trabalho, mas tiver paz quando chegar em casa, será um ser humano feliz..."

Tenha a certeza que é assim que me sinto. Você, junto com nossos dois pequeninos (Tchuco e Bambina), são fundamentais na minha vida.

"De uma coisa podemos ter certeza: de nada adianta querer apressar as coisas; tudo vem ao seu tempo, dentro do prazo que lhe foi previsto. Mas a natureza humana não é muito paciente. Temos pressa em tudo e aí acontecem os atropelos do destino, aquela situação que você mesmo provoca, por pura ansiedade de não aguardar o tempo certo..."

Muitos foram nossos atropelos, muito foi minha ansiedade, mas hoje sei que foi a melhor opção pra minha vida: ficar com você e viver o resto de nossas vidas juntos!!!

Te amo muito!!

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida e permitiu fazer minhas escolhas.

À minha orientadora Profa. Dra. Marina Magalhães, obrigada pela paciência, oportunidade e dedicação como profissional e por todos os momentos, bons e difíceis, que me fizeram aprender a valorizar muito a vida.

À Profa. Dra. Vanda Benini, por abrir as portas do ambulatório e possibilitar este trabalho na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, obrigada pela oportunidade, por me ajudar nos momentos mais difíceis. Suas palavras sempre foram de incentivo tanto profissional como pessoal. E, principalmente, por me ensinar a ser patologista.

À Profa. Dra. Suzana C.O.M. Sousa, obrigada pelo exemplo de dedicação e entusiasmo com a patologia.

À Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, pelo carinho e pelos ensinamentos de patologia. Suas observações sempre foram muito válidas.

Aos Professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo: Prof. Dr. Fábio D. Nunes, Profa. Dra. Andréa Mantesso e Profa. Dra. Kareem Ortega, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e incentivos.

À Profa. Dra. Rosa Helena Grande, tia Rosa, mesmo em departamento diferente conhecer você foi uma bênção. Nossas conversas, seus conselhos, seu carinho e seus beijos e abraços carinhosos fizeram momentos difíceis passarem mais rápido. Obrigada pelos exemplos profissionais e pessoas que pude aprender com você.

Aos meus primeiros e sempre mestres Helder e Flávia, obrigada pela oportunidade de conviver com grandes exemplos de família, de pesquisadores, patologistas, professores e clínicos. Vocês me apresentaram a odontologia e me incentivaram sempre a seguir em frente. Obrigada por tudo!!

Aos colegas José Henrique, Profa. Dra. Nathalie e Prof. Dr. Paulo Sérgio Santos que me ajudaram a encontrar meu caminho dentro deste trabalho.

As colegas, Flávia Caló e Maria Fernanda Setubal por me ensinarem o que é a PCR e como fazer as reações, sem vocês o trabalho não estaria completo. Obrigada!!

Aos colegas que conheci na patologia: Alexandra, Aluana, Ana Cláudia, Fábio Coracin, Felipe Daltoé, Fernanda Amorim, Gabriela, Juliana, Karin, Lourdes Vanesa, Luciana, Patrícia, Paulo Braz, Marina, Valtuir, Yonara e Renatas pelos momentos que passamos juntos.

A todos os demais colegas de curso de Pós-Graduação pelo compartilhamento de experiências e saudável convívio.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal: Elisa, Adriana, Giovani, Bia, Débora, Zilda, Néia e Nair minha gratidão pela disponibilidade e atenção sempre que foi preciso.

Às bibliotecárias da FOUSP, pela contribuição na confecção desta tese.

Ao Prof Barbary pela revisão da língua portuguesa.

A minha mãe, Waltair e meu pai Vitor (*in memoriam*), que sempre se esqueceram de si mesmos para que eu brilhasse, derramaram lágrimas para que eu fosse feliz. Acreditaram em mim, apesar de meus erros e de muitas vezes nem eu mesma acreditar. Vocês são tudo!!

Ao meu irmão, André, que com todas as dificuldades da vida continua a perseguir seus sonhos de forma digna e verdadeira. Você é meu exemplo de vencedor!!! Você veio na família Martins Pereira para trazer luz, serenidade, amor, ensinamentos de paz e luta com dignidade e justiça. Deus me presenteou com nossos laços eternos. Obrigada pela ajuda, por ouvir meu choro, por me consolar nos momentos mais difíceis que passei e mais obrigada, ainda, pela comemoração de cada conquista minha da mais simples a mais importante. Te amo muito!!!

Ao Breno, meu marido, obrigada por me levantar nos momentos que queria desistir, obrigada por limpar minhas lágrimas e por me ajudar a ser uma pessoa mais confiante, em mim e nas pessoas que chegam até mim. Você é meu alicerce!

Aos meus "filhos", Tchuco e Bambina, obrigada por me fazerem sorrir com suas brincadeiras. Nunca pensei na dimensão do amor que sentiria por vocês!!

A minha cunhada, Leti, obrigada por amar e incentivar meu irmão, com você ele tem mais equilíbrio e pode me passar um pouco quando precisei. Obrigada, ainda,

pela alegria que você sempre me passa e por me ensinar que a saudade sempre vai fazer parte de nossas vidas, mas sem dor!!

A minha Avó Ellys, obrigada por, mesmo nos momentos ausentes, você ter me mandado pensamentos bons e de luta.

Aos meus queridos avós: Luthgard, Cássio e Jacyra (*in memoriam*), obrigada pela luz de amor e paz que recebo de você todos os dias da minha vida!!

Aos meus tios: Willis e Helena que me deram força pra continuar em São Paulo, quando o que eu mais queria era estar em casa!! Porque sabia que com vocês os dois estariam bem.

Aos meus tios: Tom, Eugênia, João e Bidia por terem orgulho e acreditarem na profissional que sou e terem feito da minha chegada ao mundo um marco!!

A minha família carioca, Tia Wal, Tio Paulo, Héron, Caio e Anna, vocês pertencem ao grupo dos meus maiores incentivadores, Obrigada pela força!!

A minha nova família, Mont'Alverne Silva, obrigada por me proporcionar momentos de alegria, de sonhos e ajudarem a me tornar o que sou.

Antoine de Saint-Exupéry disse: "Cada um que passa em nossas vidas, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossas vidas, e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso" Esse é o verdadeiro significado da amizade, por isso só posso dizer obrigada amigos, vocês são especiais.

Melaine, Diogo, Anna Christina, Karen, Carol, Otávia, Raphael, Fernanda Guidice, Felipe, Aline, Fernanda Yamamoto, Brunno, Fátima, Vinicius, Zé Roberto, Cecy e Zé Sérgio

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

RESUMO

Silva EMAP. Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de pacientes pediátricos pré e pós-transplante renal. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

O transplante renal é uma modalidade de tratamento para substituir os órgãos em falência. As manifestações orais mais frequentes nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica (IRC) e transplantados renais (TR) são as alterações do esmalte, as estomatites, gengivites, diminuição do fluxo salivar, hiperplasias gengivais e as infecções por vírus, bactérias e fungos. A prevalência de infecções ativas causadas pelos herpesvírus aumentam quando há imunossupressão dos indivíduos. Em transplantados renais, apesar de ser realizada a profilaxia antiviral, a infecção clínica pelos vírus desta família tem levado a muitas complicações pós-transplante aumentando a mortalidade e a morbidade destes pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as condições bucais e a presença dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de pacientes pediátricos com IRC, TR e em pacientes normorreativos, através da técnica de PCR. Aplicou-se questionário a todos os pais ou responsáveis para obtenção dos dados demográficos, histórias médica e odontológica. Realizou-se avaliação da saúde bucal e coleta de saliva de 100 pacientes pediátricos de 0 à 16 anos, divididos em 3 grupos. O grupo 1 foi composto por 25 crianças insuficientes renais crônicos, o grupo 2 por 25 crianças transplantadas renais na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e o grupo 3 por 50 crianças normorreativas na Clínica Odontológica da FOU SP. Independentemente do grupo, a maioria das crianças exibia pobre higiene oral, gengivite e moderada incidência de cárie. Entre as manifestações bucais avaliadas as que apresentaram diferença entre os grupos foram: No grupo 1 palidez da mucosa bucal (8/25, 32%), alteração de esmalte (5/25, 20%), manchas brancas (4/25, 16%), e sensação de boca seca (3/25, 12%). No grupo 2 foram: candidíase (1/25, 4%), queilite angular (1/25, 4%), e dentes conóides (1/25, 4%). A hiperplasia gengival medicamentosa esteve presente em 4 dos 25 (16%) dos pacientes desse grupo estudado, sendo em todos os casos grau 1. No grupo 3 observou-se alteração de esmalte (6/50, 12%), manchas brancas (8/50, 16%) e fratura dental (1/50, 2%). Quanto a presença dos

vírus observou-se que o HSV-1 foi encontrado na frequência de: 4% no G1, 28% no G2 e 22% no G3 sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,039$). O EBV foi encontrado em 24% dos pacientes do G1, 60% do G2 e em 44% dos pacientes do G3, sendo a diferença entre G1 e G3 estatisticamente significativa ($p=0,010$). Frente as manifestações bucais e a presença do HSV-1 e do EBV encontradas nesta população evidencia-se a o importante papel do cirurgião dentista na equipe transplantadora, participando de novos métodos de diagnóstico, adequação bucal dos pacientes na fase pré transplante, como também nas intervenções curativas nas fases pré, trans e pós transplante.

Palavras-Chave: Transplante de rim, Insuficiência renal crônica, Manifestações bucais, Herpesvirus humanos.

ABSTRACT

Silva EMAP. Assessment of oral health and detection of HSV-1 and EBV in saliva of pediatric patients before and after renal transplantation [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

Renal transplantation may be a treatment choice for patients with a failing kidney. Patients who present chronic renal failure and have undergone renal transplantation may show enamel abnormalities, periodontal disease, decrease of the salivary flow and gingival enlargement as common oral manifestations. Bacterial, fungal and viral infections can also develop, being the later a major cause of post-transplantation morbidity and mortality despite the antiviral prophylaxis. Thus, the purpose of this study was to observe the occurrence of oral manifestations and also to detect the presence of herpes virus 1 (HSV-1) and Epstein-Barr virus (EBV) in the saliva of pediatric renal transplant patients (RT), pediatric patients with chronic renal failure (CRF) and immunocompetent patients, comparing the results among the three experimental groups. All the analyses were performed through the polymerase chain reaction (PCR). A questionnaire was applied to the respective parents or legal responsible in order to obtain the demographic data, medical and dental histories. Oral manifestation records and saliva samples were obtained from 100 pediatric patients with an age that ranged from 0 to 16 years old. The experimental groups consisted of: Group 1 (G1): 25 children with chronic renal failure, group 2 (G2): 25 children after renal transplantation conducted at Santa Casa de Misericórdia of São Paulo city and group 3 (G3): 50 immunocompetent children clinically examined at the School of Dentistry, University of São Paulo. All of the analyzed children presented poor hygienic conditions, periodontal diseases and decreased rates of dental caries.

G1 presented the following oral manifestations: paleness of oral mucosa (8/25, 32%), enamel abnormalities (5/25, 20%) and xerostomia (3/25, 12%). G2: oral candidiasis (1/25, 4%), angular cheilitis (1/25, 4%) and conic teeth (1/25, 4%). Four patients also presented gingival enlargement at degree one (16%). G3 presented enamel abnormalities (6/50, 12%) and dental fracture (1/50, 2%). HSV-1 was detected in G1 (4%), G2 (28%) and G3 (22%) and presenting statistically significant differences among the groups ($p=0,039$). EBV was detected in 24% of G1, 60% of G2 and 44% of G3, being this difference statistically significant ($p=0,010$). Oral manifestations as well as the presence of HSV-1 and EBV in CRF e RT patients highlight the importance of a dentist in the renal transplant team, providing optimal dental care of patients before and after the renal transplant.

Keywords: Kidney transplantation, Renal insufficiency chronic, oral manifestation, Human herpesvirus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Manifestações gerais e bucais em crianças IRC	16
2.2 Manifestações gerais e bucais em crianças TR	18
2.3 Herpes simples (HSV-1)	19
2.4 Epstein- Barr vírus (EBV)	23
3 PROPOSIÇÃO	28
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
4.1 Análise demográfica e clínica	31
4.2 Análise laboratorial	35
4.3 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Dados demográficos	41
5.2 Doença de base e medicamentos utilizados	41
5.3 Comorbidades	42
5.4 Exames complementares	43
5.5 Manifestações bucais	45
5.6 Presença do HSV-1 e EBV	48
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICES	62
ANEXOS	78

1 INTRODUÇÃO

O transplante renal é o tratamento de escolha para pacientes com insuficiência renal crônica em estágio terminal. Após o transplante, lança-se mão de esquemas de imunossupressão medicamentosa, com a preocupação de que esta não seja excessiva a ponto de facilitar ocorrência de infecções, mas efetiva para evitar a rejeição do órgão transplantado⁽¹⁾.

De acordo com a temporalidade no processo de acompanhamento do transplantado, de uma maneira geral, no primeiro mês pós-transplante, em 95% dos casos predominam as infecções hospitalares, principalmente as da ferida operatória e as urinárias; entre o segundo e o sexto meses, predominam as mais variadas infecções oportunistas, causadas principalmente por vírus, fungos e bactérias, cuja frequência depende da intensidade da imunossupressão instalada e do “status” sorológico para os diversos agentes infecciosos identificados, no paciente, antes do transplante. Após o sexto mês, predominam as infecções comunitárias como as infecções virais respiratórias semelhantes às que ocorrem em qualquer paciente imunocompetente^(2, 3).

Uma parcela dos pacientes, em geral aquela com função renal alterada, diabéticos ou com doses elevadas de imunossupressores, tende a apresentar infecções oportunistas tardias.⁽⁴⁻⁷⁾

As manifestações clínicas, decorrentes de infecções oportunistas ocorridas em transplantados, podem ser observadas em qualquer área topográfica do corpo do paciente, incluindo a cavidade bucal⁽⁴⁻⁷⁾.

As primeiras manifestações orais em transplantados renais (TR) foram descritas em 1851^(6, 7); entre elas estão às alterações do esmalte, as estomatites, gengivites, diminuição do fluxo salivar, hiperplasias gengivais e as infecções por vírus, bactérias e fungos. Desde então, diversos autores têm se preocupado em identificar as manifestações bucais ocorridas nesses pacientes^(6, 8). A maioria dos trabalhos científicos que trazem essas informações foram direcionados para a população adulta, entretanto os poucos trabalhos na área pediátrica também demonstram essas alterações como é o caso do trabalho de Lucas e Roberts, publicado no ano de 2005⁽⁹⁾, em que são demonstradas as alterações encontradas nos pacientes portadores de insuficiência renal crônica (IRC) e TR, os quais passam

por algumas complicações a mais com o início de tratamento imunossupressor, como as hiperplasias gengivais medicamentosas (HGM), o aumento das estomatites, gengivites, diminuição do fluxo salivar e a predisposição às infecções por vírus, bactérias e fungos.

As infecções virais são particularmente as mais frequentes considerando que oito herpesvírus foram, até o momento, isolados em seres humanos (vírus herpes simples 1 [HSV-1], vírus herpes simples 2 [HSV-2], citomegalovírus humano [HCMV], vírus varicella-zoster [VZV], vírus Epstein-Barr [EBV], herpesvírus humano 6 [HHV6], herpesvírus humano 7 [HHV7] e herpesvírus humano 8 [HHV8 ou Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi]). Estudos apontam que o Herpes Simples (HSV-1) e o Epstein-Barr (EBV), conhecido como herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4), são considerados comuns como agentes de infecção e também por estarem presentes na forma latente em 90% da população adulta e em 70% da população pediátrica, e têm suas reativações presentes no momento em que o sistema imunológico apresenta alteração em suas funções⁽¹⁰⁻¹⁶⁾.

A infecção pelo EBV é importante em transplante renal por sua alta prevalência, pela gama variada de síndromes clínicas associadas e pela capacidade imunomoduladora do vírus, assim como pela morbidade e mortalidade que podem resultar. Por esse motivo, é importante o controle adequado das infecções pré, trans e pós-transplante⁽²⁾.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A insuficiência renal crônica (IRC) é definida como a perda progressiva e irreversível da função renal, levando a um desequilíbrio na homeostasia do organismo em sua fase final, quando o paciente necessita de terapia renal substitutiva como a hemodiálise, diálise peritoneal e/ou transplante renal⁽¹⁷⁾.

As principais causas de insuficiência renal crônica na infância são as malformações ou obstruções das vias urinárias, as nefrites, as doenças que cursam com cistos renais (rins policísticos), rins malformados e as doenças renais hereditárias⁽¹⁷⁾.

Segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos⁽³⁾, hoje, no Brasil, aproximadamente 35.000 pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) estão em tratamento pela diálise ou hemodiálise. Estima-se que 1,5% da população na faixa etária entre 0 e 19 anos tenham doença renal crônica dialítica, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (dados de 2007)⁽¹⁸⁾.

Assim como no adulto, o transplante renal é um dos tratamentos de escolha para as crianças com insuficiência renal crônica em estágio terminal. Em 2008 foram realizados aproximadamente 3 mil transplantes renais no Brasil, dos quais 442 ocorreram em pacientes de 0 a 16 anos de idade^(3, 18).

2.1 Manifestações gerais e bucais em crianças IRC

A IRC é uma disfunção renal que é avaliada pela taxa de filtração glomerular (TFG), calculada pelo clearance de creatinina. Pode variar de leve, quando a TFG está em torno de 75ml/min/1,73m² superfície corporal, a grave, quando a TFG é igual ou menor a 10ml/min/1,73m²⁽¹⁷⁾.

À medida em que a deteriorização dos néfrons ocorre, várias alterações clínicas começam a surgir com graus de gravidade que variam de acordo com o grau da perda da função renal⁽¹⁷⁾.

As manifestações clínicas da IRC em crianças podem envolver o sistema cardiovascular, endocrinológico, hematológico, neurológico, causar distúrbios

eletrolíticos e do metabolismo ácido-básico. Crianças com IRC podem apresentar baixa estatura e palidez facial como resultado da anemia secundária. Esta anemia é causada principalmente pela produção renal insuficiente de eritropoetina^(17, 19).

Em relação às manifestações bucais de crianças com IRC a maioria dos autores concorda em seus achados principais tais como: pobre higiene oral, halitose urêmica, sensação de boca seca (xerostomia), diminuição do fluxo salivar, palidez da mucosa, aumento da quantidade de cálculo dental, alterações de esmalte, lesões de cárie, estomatite urêmica e candidíase^(7-9, 17, 20, 21).

Seymour e colaboradores em 1997⁽⁷⁾ estudaram 50 pacientes IRC. Descreveram que a maioria dos pacientes (38/50, 76%) apresentava índice de higiene oral insatisfatório, 20% (10/50) apresentavam doenças gengivais, 40% (20/50) aumento de cálculo dental e 10% (5/50) apresentavam sensação de boca seca e 2% (1/50) apresentavam queilite angular. Concluíram que a equipe médica deve ter a presença constante de dentistas.

Em 2005, Proctor e colaboradores⁽²¹⁾ revisaram estudos que abordavam a saúde bucal de crianças com IRC. Os autores revisaram 168 artigos e concluíram que as manifestações bucais mais freqüentes nos pacientes insuficientes renais crônicos estudados eram: má higiene oral e sensação de boca seca. O aumento do risco de doenças gengivais e periodontais não era importante, segundo os trabalhos revisados. A diminuição do fluxo salivar nestes pacientes pode ocorrer pelo envolvimento urêmico direto das glândulas salivares, pela restrição de ingestão de líquidos e pelos efeitos colaterais de medicamentos. Nestes estudos, os autores salientam ainda a possibilidade de alterações bucais menos freqüentes como a estomatite urêmica (que foi citada em apenas 1 caso dentre 45 pacientes estudados). Os autores concluíram que as complicações orais e sistêmicas das crianças com IRC são resultantes da própria doença ou do tratamento dela e que o manejo geral e bucal destes pacientes pode requerer modificações e cuidados em virtude da anemia, problemas cardiovasculares e endócrinos.

O estudo realizado por Lucas e Roberts em 2005⁽⁹⁾ se propôs a estudar as manifestações bucais de 50 crianças IRC. Os resultados mostraram que a maioria dos pacientes pediátricos IRC (26/50, 52%) apresentavam alteração de esmalte e 22 dos 50 (44%) apresentavam diminuição do fluxo salivar. As lesões cariosas e a inflamação gengival foram menos frequentes (22/50, 44%) quando comparadas com pacientes normorreativos. Os autores acreditam que isto ocorra

em virtude do pH salivar ser mais alcalino e da ocorrência de uremia nos pacientes com IRC.

Em revisão de literatura realizada por Summers e colaboradores, em 2007⁽⁸⁾, os autores analisaram 52 artigos. Concluíram que as crianças com IRC nos EUA, no Canadá e na Europa apresentam alterações bucais mais freqüentemente que crianças normorreativas como a xerostomia, alteração de esmalte, perda prematura de osso e pobre higiene oral. Os autores sugerem que o exame bucal seja padronizado para diagnosticar complicações precocemente e que o tratamento deve ser realizado em associação ao time de médicos que acompanha o paciente.

2.2 Manifestações gerais e bucais em crianças TR

A rejeição crônica do transplante é a principal causa de perda do enxerto após o primeiro ano⁽²²⁾. Para evitar a rejeição do órgão transplantado, é necessário realizar tratamento imunossupressor. Paralelamente, faz-se controle rigoroso da hipertensão arterial, controle da dislipidemia e dieta lipoproteica⁽²²⁾.

Atualmente as drogas mais utilizadas no regime imunossupressor são tacrolimus, micofenolato mofetil, ciclosporina, azatioprina e corticosteróides. Como efeitos colaterais nos pacientes pediátricos, de uma forma geral, pode ocorrer hipertensão arterial, neurotoxicidade e aumento da susceptibilidade a infecções oportunistas. Observa-se, ainda, aumento de pelos, de peso, inibição do acúmulo de neutrófilos e monócitos em locais de inflamação e a supressão das suas atividades fagocíticas^(11, 22, 23).

Os estudos que se propuseram a avaliar as manifestações bucais de crianças transplantadas renais (TR) concluíram que as manifestações mais comuns são alterações do esmalte, estomatites, gengivites, diminuição do fluxo salivar, hiperplasias gengivais medicamentosas e infecções bucais causadas por vírus, bactérias e fungos^(4-8, 23).

Lucas e Roberts (2005)⁽⁹⁾ estudaram 50 crianças transplantadas renais e compararam com IRC. Os resultados mostraram que as alterações bucais encontradas nos pacientes TR foram diferentes do grupo de pacientes com IRC. As alterações como o aumento gengival (em 6 dos 50 - 12%) e as infecções por

cândida em (2 dos 50 - 4%) foram encontradas apenas nos pacientes TR. Nos pacientes com IRC os autores observaram alteração de esmalte (26/50, 52%) e diminuição do fluxo salivar em 22 dos 50 (44%).

Segundo Guggenheimer e colaboradores⁽²⁴⁾ estudando 159 pacientes TR, foi possível observar que estes desenvolveram de 2 a 3 vezes mais lesões orais do que os paciente normorreativos, sendo a lesão mais freqüente as HGM, em 30% dos pacientes. Esses pacientes, em sua maioria, faziam uso de ciclosporina como medicamento imunomodulador.

Estudo realizado no México por de la Rosa-Garcia em 2005⁽⁶⁾, avaliando 90 pacientes TR com idade até 16 anos, apontam que 60% deles desenvolvem algum tipo de lesão oral como a HGM (49%) distribuídas em grau 1 (12,2%), grau 2 (28,9%) e grau 3 (7,8%). A candidíase oral acometeu 18,7%, leucoplasia acometeu 13% e lesão herpética estava presente em 7,8%. A regressão logística demonstrou que a HGM teve relação com a pobre higiene oral ($p < 0,001$) apresentada por esses pacientes. Segundo os autores, conclui-se que a 60% dos pacientes examinados apresentavam pelo menos uma lesão bucal e que a supervisão da higiene é necessária nestes pacientes para minimizar o aumento gengival provocada pelo medicamento.

No Brasil, estudo avaliando 32 pacientes pediátricos TR confirmam que 72% (23) dos casos apresentaram algum tipo de manifestação estomatológica, sendo as mais freqüentes as infecções herpéticas (46,87%), seguidas por infecções fúngicas (40,2%), papiloma (9,3%), HGM (6,2%) e tuberculose (3,1%). Os autores salientam que a responsabilidade de diagnosticar e tratar estas lesões é do cirurgião dentista e que o tratamento vai possibilitar uma melhor qualidade de vida para os pacientes⁽²⁵⁾.

2.3 Herpes vírus (HSV-1)

O herpes vírus tipo 1 (HSV-1) é um vírus da família do herpes, herpesviridae, cujas partículas são transmitidas por contato direto entre os indivíduos, por partilha de objetos contaminados e por auto-inoculação^(15, 26).

Após a primo-infecção o vírus persiste nos nervos da região facial em estado de latência^(1, 26, 27). Uma vez latente, existe o risco de reativação do vírus, levando ao estabelecimento de lesões vesico bolhosas, ou até infecções de órgãos e encefalites. Inúmeros fatores de risco para a reativação viral têm sido identificados, entre eles os traumas psicológicos, manipulações cirúrgicas do nervo ou área do nervo trigeminal, período longo de intubação e imunossupressão^(15, 26).

Estudos apontam que a incidência de reativação da infecção pelo HSV 1 nos pacientes transplantados renais é de 75% nos primeiros 6 meses pós-transplante. Nos transplantados de fígado que não receberam profilaxia antiviral 40% apresentaram reativação do HSV-1. Esses dados são similares com as taxas de reativação de 40% a 50% de uma análise combinada de receptores de rim, fígado e coração^(15, 26).

As formas mais severas desta reativação são as hepatites, a pneumonia e a disseminação visceral da doença. Normalmente essas lesões são fatais e de difícil diagnóstico^(15, 26).

Pacientes transplantados renais que fazem uso de micofenolato mofetil (MMF) ou sirolimus podem apresentar um risco maior de reativação dos herpesvírus quando comparados aos pacientes que fazem uso de outras medicações^(15, 26, 28).

O resultado do estudo prospectivo randomizado de Eisen e colaboradores em 2005⁽²⁹⁾, demonstrou que os pacientes transplantados cardíacos usuários de MMF apresentaram, 22,8% de infecções por HSV-1, quando comparados com os pacientes que eram usuários de azatioprina que apresentaram 15,9%.

Em estudo realizado por Carmen Mora-Fernandez e colaboradores, em 1997⁽³⁰⁾, e Lippmann e colaboradores em 1995⁽³¹⁾, evidencia-se que doenças causadas pelo HSV-1 podem ser marcadores para identificar os pacientes com grande possibilidade de desenvolver lesões pelo CMV, em virtude de terem observado a soroconversão para CMV poucos dias após a detecção de lesões de HSV-1.

Além desta possível associação do HSV com o CMV, vários autores afirmam que é muito freqüente a associação do HSV com o EBV e com o vírus varicela zoster, provocando um aumento na incidência de lesões nestes pacientes^(12, 15, 28).

O monitoramento destes vírus em pacientes pré e pós-transplante pode ser feito através da sorologia, entretanto esse método demonstra um evento

retrospectivo em virtude da soroconversão não ocorrer nos estágios iniciais da infecção aguda e sua sensibilidade ser baixa⁽³²⁻³⁴⁾.

Nos últimos anos tem sido realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) para auxiliar no diagnóstico das lesões bucais de pacientes pediátricos imunossuprimidos em virtude desta técnica ter como vantagem a utilização de pouco material biológico, ser mais específica, mais sensível e ter a possibilidade de detecção da presença viral em estágios iniciais das infecções^(1, 12, 27, 34, 35).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentração diminutas^(36, 37). O procedimento consiste de repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois “primers” ou oligonucleotídeos iniciadores, com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos com seqüências complementares as duas extremidades do fragmento-alvo e levadas a efeito por uma reação enzimática mediada pela polimerase de atividade em temperaturas elevadas (Taq polimerase)^(36, 37).

Cada ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas^(36, 37) que podem ser vistas na figura 2.1:

- a) Desnaturação: separação da dupla fita de DNA a ser amplificada
- b) Anelamento: ligação complementar entre os iniciadores (primers) e o DNA
- c) Extensão: síntese do DNA pela enzima Taq-polimerase, que é utilizada para replicar as fitas de DNA.

Figura 2.1: Seqüência de reação de PCR

Fonte: <http://www.infobiogen.fr/services/chromocancer/Introltems/HardySp.html>

Reações de PCR foram realizadas no sangue de pacientes adultos com hepatite pós-transplante renal e em pacientes sem transplantes e observou-se que 90% dos pacientes transplantados apresentavam positividade para HSV-1⁽³⁸⁾.

Nos trabalhos de Miller e colaboradores, em 2006⁽¹⁵⁾, dos 58 pacientes imunossuprimidos analisados 16% apresentaram HSV-1 na saliva, detectados por PCR, quando comparados com o grupo normorreativo que apresentou apenas 2% dos pacientes exibindo o HSV-1 na saliva.

Em outro estudo a detecção do HSV-1 na saliva dos 40 pacientes imunossuprimidos foi de 24%⁽¹⁴⁾. E no estudo de Grando e colaboradores de 2002⁽³⁹⁾ foi identificado HSV-1 em 63,29% dos 50 pacientes transplantados brasileiros pediátricos e 16,22% dos 37 pacientes transplantados pediátricos norte-americanos.

Eisen e colaboradores em 2005⁽²⁹⁾, avaliando 60 pacientes relataram incidência de reativação do HSV-1 com média de 90% em pacientes transplantados. Em outro estudo, utilizando 60 pacientes imunossuprimidos observou-se uma

reativação do HSV-1 em 85% dos pacientes⁽¹⁾.

Entretanto nos estudos de Guimarães e colaboradores, em 2009⁽²⁷⁾, no qual foram avaliados 38 pacientes imunossuprimidos transplantados e 36 pacientes normorreativos, não se encontrou diferença estatisticamente significantes entre os grupos quando avaliada a presença do HSV-1 no sangue pela técnica de PCR.

2.4 Epstein-Barr vírus (EBV)

O EBV é um vírus da família do herpes, que infecta linfócitos B. Aproximadamente 90% dos indivíduos na idade adulta e 40% nas crianças normorreativas já foi infectado pelo vírus⁽¹⁶⁾.

Quando a infecção primária ocorre na infância, pode se apresentar, geralmente, assintomática ou com sintomas brandos indistinguíveis de viroses comuns. Entretanto, quando a infecção pelo EBV ocorre na adolescência e idade adulta pode ocorrer a mononucleose (em 30 a 50% dos casos) caracterizada por febre alta, calafrios, linfonodomegalia principalmente cervical, placas acinzentadas no orofaringe e amígdalas, prostração e mialgia⁽⁴⁰⁾.

A transmissão pelo EBV ocorre principalmente pela saliva, embora hemoderivados e órgãos transplantados também possam ser fontes de infecção^(41, 42). Transmissões pelo sangue e ar, no entanto, não podem ser descartadas⁽⁴³⁾.

Após a infecção primária, pode estabelecer-se uma infecção persistente⁽⁴⁴⁾. O vírus adquire o estado de latência nas células epiteliais do anel de Waldeyer e da língua^(1, 27, 35). O EBV, inicialmente, se replica nas células epiteliais do orofaringe do hospedeiro e, subseqüentemente, infecta e se replica em linfócitos B presentes nos tecidos linfóides adjacentes^(40, 41), como observa-se na figura 2.2.

Figura 2.4: Representação esquemática da infecção pelo EBV

Fonte: Kimura e colaboradores, 2008³⁵

Tradicionalmente, investigações sorológicas para o EBV procuram por IgG e IgM que agem contra o antígeno capsídeo do vírus (VCA), antígeno primário (EBV-EA) e antígeno nuclear de Epstein-Barr (EBNA)^(13, 16, 45, 46).

A infecção crônica é observada quando existe um aumento do anti-VCA (antígeno capsídeo do vírus) IgG e pela ausência de anticorpos de EBNA (antígeno nuclear de Epstein-Barr); os pacientes que apresentarem essas características devem ser monitorados atenciosamente, em decorrência de apresentarem alto risco de desenvolver desordens linfoproliferativas^(13, 16, 45, 46).

Aproximadamente em 1990, a PCR para o vírus EBV substituiu os testes sorológicos, em razão da imunossupressão e da infecção aguda durar longos períodos. Nos indivíduos que entraram em contato com o vírus pós transplante apresentam baixo grau de virulência com o EBV-DNA circulante, sendo detectado no sangue e saliva em todos os períodos. A identificação do EBV-DNA no plasma e na

saliva implica em alta carga viral, sendo mais sugestivo de replicação viral^(13, 16, 35, 45, 47).

A maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados pelo EBV apresentam pequenas alterações sistêmicas, entretanto os pacientes transplantados imunossuprimidos apresentam uma fragilidade entre a replicação viral e a imunidade específica contra o EBV, podendo observar-se um aumento significativo da replicação viral, e uma infecção aparentemente inofensiva pode progredir para um estado de hiperplasias ou neoplasias com um alto grau de morbidade e perda do enxerto^(13, 45, 46, 48, 49).

Em pacientes imunossuprimidos pode ocorrer uma reativação do vírus, causando doenças mais graves. Ammatuna e colaboradores, em 2001⁽⁵⁰⁾, compararam a presença de EBV na mucosa bucal de pacientes transplantados, HIV+ e normorreativos e encontraram que a maior incidência foi no grupo de transplantados com 65% dos casos quando comparado aos normorreativos que apresentaram apenas 16,6%. Braz-Silva e colaboradores, em 2006⁽⁵¹⁾, também verificaram a presença do EBV em diferentes sítios da mucosa bucal de transplantados, demonstrando ainda que a gengiva foi o sítio com maior prevalência de infecção pelo EBV.

Kullberg-Lindh e colaboradores, em 2006⁽¹³⁾, avaliaram a presença de EBV em 60 pacientes pediátricos transplantados de fígado e encontrando 71% dos casos positivos. Em outros trabalhos, avaliando pacientes em idade pediátricos transplantados renais e de fígado, a incidência encontrada variou de 25% a 75% de positividade para EBV no soro destes pacientes^(11, 16).

No aspecto intra-oral, as alterações mais freqüentemente observadas são as úlceras de grande porte, amigdalites associadas à mononucleose infecciosa e a leucoplasia pilosa^(15, 28, 52).

Alguns autores afirmam que a ocorrência das co-infecções pelos vírus da família do herpes, especialmente a associação do HSV-1, EBV, CMV e VZH, conduz a lesões mais graves, tanto na mucosa, quanto na pele dos pacientes imunossuprimidos. Nos casos de co-infecções por HSV e EBV na mucosa bucal, as lesões tornam-se exuberantes e, na maioria dos casos confluentes, o que determina altas doses e maior tempo de tratamento antiviral^(15, 28, 30, 31, 52).

A leucoplasia pilosa foi descrita inicialmente em pacientes HIV positivos e depois também relacionada a pacientes imunossuprimidos de um modo geral como

os transplantados de órgãos⁽¹⁰⁾.

King e colaboradores, em 2004⁽⁵³⁾, avaliaram a presença de leucoplasia pilosa em pacientes pediátrico imunossuprimidos e observaram uma incidência de 19% dos 120 pacientes analisados, demonstrando que os resultados pediátricos são semelhantes aos dados encontrados nos adultos.

As desordens linfoproliferativas se caracterizam por uma proliferação não controlada de células B em pacientes imunossuprimidos. Na apresentação destas desordens, pode haver predominância de células T e células B com padrão monomórfico ou polimórfico. Esta proliferação parece ser resultado de uma infecção primária ou reativação do EBV, em decorrência da imunossupressão⁽⁵⁴⁾.

Nos últimos anos, a identificação e quantificação dos vírus da família *Herpesviridae* tem sido realizada para auxiliar nos diagnósticos das lesões e na identificação dos pacientes imunossuprimidos apresentarem risco de desenvolver lesões mais graves^(15, 28, 55, 56).

Alguns trabalhos realizam a quantificação das partículas virais do EBV para auxiliar no diagnóstico, entretanto não existe ainda uma padronização a fim de definir a carga viral específica de EBV que poderia servir como fator predisponente às desordens linfoproliferativas⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾.

Kirk e colaboradores, em 2006⁽⁵⁹⁾, analisaram a presença de EBV, através de PCR, em 121 pacientes transplantados e 46 pacientes com IRC. Destes, 48% apresentavam o EBV e 81% dos transplantados eram portadores de EBV.

Nos trabalhos de Miller e colaboradores, em 2006⁽¹⁵⁾, dos 58 pacientes imunossuprimidos analisados, 90% apresentaram EBV na saliva quando comparados com o grupo normorreativo que apresentou apenas 48% dos pacientes portadores de EBV. Em outros estudos, foi encontrada uma incidência variando de 70 a 93% dos pacientes imunossuprimidos portadores de EBV^{13,53}.

Avaliando 81 pacientes do grupo pediátrico, Ellis e colaboradores, em 1999⁽¹¹⁾, observaram que 57% (46) dos pacientes eram negativos para EBV antes do transplante. Após o transplante renal, notou-se, que destes 46 pacientes, 19 (23%) desenvolveram manifestações clínicas relacionadas ao EBV e todos apresentaram positividade para o EBV quando o sangue foi avaliado através da técnica de PCR.

Em outros estudo de pacientes pediátrico, observou-se que 46% (11/60) dos pacientes transplantados renais desenvolveram infecção pelo EBV e que 25% apresentaram reativação deste vírus. Analisando, ainda, a carga viral, notou-se que

esta foi maior no grupo com infecção primária e que não houve diferença entre o grupo que apresentou lesão linfoproliferativa e os que apresentaram apenas reativação do vírus⁽¹³⁾.

Em estudo comparativo entre crianças imunossuprimidas brasileiras (140) e norte-americanas (37), a presença do vírus EBV foi mais freqüente nas brasileiras (56%) do que na norte-americana (27%)⁽³⁹⁾.

Através destes trabalhos, demonstrou-se que a detecção de vírus nos tecidos pode ser feita através de diversas técnicas como a PCR, hibridização *in situ*, imunohistoquímica, imunocitoquímica e microscopia eletrônica^(33, 60). A realização de exames menos invasivos em boca, mas que permitam o uso de técnicas consagradas para identificação viral tem sido proposta por alguns autores; além de serem mais facilmente tolerados pelos pacientes, são mais rápidos e de fácil realização por parte do dentista. Desta forma, esse tipo de exame poderia fazer parte da rotina de exames pré e pós transplantes e representaria mais uma ferramenta para auxiliar o clínico na monitoração das doenças oportunistas bucais^(2, 33, 39, 46).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar as manifestações bucais e identificar a presença de HSV-1 e EBV na saliva de crianças com insuficiência renal crônica, crianças transplantadas renais, e crianças saudáveis.

4 CASUÍSTICA-MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo no qual participaram como objeto de estudo 100 pacientes pediátricos divididos em 3 grupos. O grupo 1 e o grupo 2 foram compostos respectivamente por 25 crianças com insuficiência renal crônica (IRC) e transplantadas renais (TR), de 0 a 16 anos de idade, que procuraram o Ambulatório de Nefrologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O grupo 3 foi composto por 50 crianças, de 0 a 16 anos de idade, não nefropatas, saudáveis, atendidas na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da USP. Modelo representativo na figura 4.1.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo A). Os responsáveis legais concederam a autorização para a realização do estudo, após terem lido e concordado com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, previamente elaborado pela pesquisadora (Apêndice A).

Figura 4.1 –Modelo representativo do delineamento da pesquisa

Foram avaliadas as características demográficas e clínicas dos pacientes, através de entrevista e do exame físico. A saúde bucal foi caracterizada através da aplicação do índice gengival modificado (IGM), índice de placa visível (IPV), índice de hiperplasia gengival medicamentosa (HGM) e índice de dentes cariados perdidos e obturados (CPO-d). Esses aspectos foram avaliados sempre pelo mesmo pesquisador, previamente treinado e calibrado e os dados registrados na ficha de anamnese (apêndice B).

Para os pacientes do grupo 1 e 2, foram avaliados os exames de função renal (uréia, creatinina, sódio, potássio, cálcio e fósforo), hepática (TGO, TGP, γ -GT, e fosfatase alcalina), hemograma (série vermelha, branca e plaquetas) e glicemia em jejum.

O exame para detecção do EBV e do Herpes vírus foi feito em saliva, através da técnica da *Polimerase Chain Reaction* (PCR) (apêndice C).

4.1. Análise demográfica e clínica

Anamnese

Informações como idade, gênero e cor da pele de todos os sujeitos da pesquisa foram obtidas através de perguntas diretas a todos os pais ou responsáveis dos pacientes.

Em relação à história médica pregressa e atual dos sujeitos estudados perguntou-se:

- 1) Doença de base que levou ao transplante;
- 2) Se transplantado, qual a data do transplante;
- 3) Presença de outras doenças sistêmicas;
- 4) Medicamentos imunomoduladores em uso;
- 5) Outras medicações em uso;

Para o grupo controle, em relação à história médica, questionou-se:

- 1) Presença de algum tipo de doença sistêmica;
- 2) Medicamentos em uso;

Em relação à história odontológica pregressa e atual, para os três grupos analisados, questionou-se:

- 1) Se o paciente ou seu cuidador notaram lesões na mucosa bucal como manchas, nódulos, pápulas, descamação, vesículas ou bolhas, ulcerações ou sensação de boca seca;
- 2) Se o paciente teve ou tem gengivite e periodontite;
- 3) Se o paciente teve ou tem hiperplasia gengival medicamentosa;
- 4) Se sim, como foi tratada;
- 5) Queixa odontológica atual do paciente

Exame físico extra e intra-bucal

No grupo 1 e 2, o exame foi realizado no ambulatório de nefrologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, sob luz artificial, com o auxílio de espelho clínico, gaze e espátula de madeira. No grupo 3 o exame foi realizado em cadeira odontológica com auxílio de refletor, espelho clínico, gaze e espátula de madeira.

Durante o exame clínico extra-bucal, foi avaliada a presença de qualquer lesão e alteração de coloração na pele na região peri-labial e nos lábio superior e inferior.

A mucosa bucal foi avaliada mediante a inspeção visual e palpação digital obedecendo a seguinte seqüência: vermelhão e mucosa do lábio superior e inferior, mucosa jugal, assoalho de boca, língua, gengivas, palato duro e palato mole. Nestes sítios, foi pesquisada a presença de alterações da normalidade tais como: lesões brancas, lesões vermelhas, nódulos, pápulas, descamação, vesículas ou bolhas, ulcerações, outras alterações de cor da mucosa, aspecto de boca seca e palidez da mucosa.

Foram estipulados parâmetros clínicos para determinar algumas destas alterações como:

- 1) O diagnóstico de palidez da mucosa foi dado mediante a comparação da área de mucosa examinada com os padrões de normalidade descritos por Summers e colaboradores, em 2007⁽⁸⁾.

- 2) O diagnóstico de candidíase foi dado pelo aspecto clínico das lesões e pela resposta ao tratamento com antifúngico tópico.
- 3) O diagnóstico de boca seca foi estabelecido subjetivamente pelo relato do paciente e pelo aspecto de secura da mucosa oral.

Para avaliar os tecidos de suporte do dente foram aplicados os seguintes índices:

- *Índice gengival modificado (IGM)*^(61, 62)

Este índice, que avalia a presença de gengivite, leva em consideração a cor da gengiva, a textura e ocorrência de sangramento espontâneo ou estimulado pelo toque com espátula de madeira, em relação a todos os dentes da boca. A esses itens foram atribuídos escores 0 (sem alteração) e 1 (com alteração). Os valores foram somados e o resultado foi dividido pelo número de superfícies dentárias avaliadas, exceto a superfície incisal. O resultado final gerou o IGM, que demonstra a severidade da inflamação gengival, sendo que: valores entre 0 – a 0,1 significa ausência de inflamação; 0,1 a 1,0 – inflamação leve; 1,1 a 2,0 – inflamação moderada; e 2,1 a 3,0 inflamação intensa.

- *Índice de placa visível (IPV)*⁽⁶³⁾

IPV mede a condição de higiene oral através da detecção do biofilme no momento do exame clínico. Este índice pode ser alto, médio ou baixo, o que corresponde à pobre ou boa higiene oral.

Segundo os critérios do IPV às superfícies dentárias foram atribuídas um escore positivo (0=sem placa, 1=com placa clinicamente visível, 2=com placa abundante). Os valores foram somados e o resultado foi dividido pelo número de superfícies dentárias avaliadas, sendo finalmente o resultado multiplicado por 100 e dividido pelo número de dentes para expressar o IPV em porcentagem.

- *Grau de Hiperplasia Gengival*⁽⁶⁴⁾

A hiperplasia gengival medicamentosa apresentada pelos pacientes foi registrada conforme o seguinte escore:

Grau 0 – gengiva normal, sem hiperplasia.

Grau 1 – hiperplasia gengival cobrindo o terço cervical ou menos dos dentes anteriores.

Grau 2 – hiperplasia gengival cobrindo o terço médio dos dentes anteriores.

Grau 3 – hiperplasia gengival cobrindo mais de dois terços dos dentes anteriores.

- *Presença de Cálculo dental*^(61, 62)

A presença ou não de cálculo dental, em qualquer quantidade ou localização, foi registrada conforme o seguinte escore: 0=sem cálculo e 1=com cálculo, para cada superfície de dente.

- *Índice CPO-d*

Este índice representa a média do número total de dentes permanentes ou decíduos cariados (C), perdidos (P) – extraídos ou com extração indicada e obturados (O) – que apresentam algum tipo de restauração. A letra “d” adicionada no final, significa a unidade de medida que está sendo utilizada, que é o dente.

Este índice foi avaliado seguindo as normas da Organização Mundial de Saúde, na qual se registra todos os dentes que se apresentam cariados, restaurados (obturado) e perdidos por cárie ou outro motivo. Esses valores são estabelecidos para cada dente e, depois, somados e divididos pelo número de dentes na boca, para obter-se o valor de CPO-d individual. Em seguida todos esses valores foram somados e divididos pelo número de pacientes de cada grupo, tendo desta forma o CPO-d coletivo de cada grupo.

Adotaram-se os seguintes critérios para a avaliação neste índice:

- 1- Foi considerado denteariado aquele dente que apresentava uma cavitação com descoloração ou opacidade ao longo das margens, em quaisquer faces (vestibular, lingual, palatina, mesial, distal e oclusal).
- 2- Manchas brancas não cavitadas e cicatrículas / fissuras pigmentadas não foram consideradas como cárie.
- 3- Dentes que se apresentavam restaurados, mas com algum tipo de infiltração ou com fratura da restauração, foram considerados cariados.
- 4- Foi considerado dente obturado/restaurado aqueles que apresentaram um material restaurador em quaisquer faces, sem infiltrações ou fraturas que pudessem indicar presença de cárie.
- 5- Dentes perdidos foram dentes que caíram naturalmente ou que foram extraídos. Também são contados como perdidos aqueles dentes que ainda estão na boca, mas que têm a indicação de exodontia, tais como: dentes com extensa destruição coronária com

comprometimento pulpar, com doença periodontal avançada e dentes com indicação de extração para ortodontia.

Coleta de saliva

Foram coletadas amostras de saliva de todos os pacientes. Cada criança permaneceu, pelo menos 20 minutos, sem comer ou beber qualquer líquido antes da coleta salivar. Cada paciente recebeu um coletor, representado por espuma absorvente com capacidade de coletar até 1 ml de saliva (Salivette – Kit de testes orais da Sarstedt/ LTDA). O paciente foi orientado a ficar com esse coletor na boca por aproximadamente 2 minutos. Após esse período, os coletores foram colocados em tubo próprio, acondicionados no gelo e transportados para o laboratório, onde foram armazenadas entre 2°C a 8°C, por no máximo 4 dias.

4.2 Análise laboratorial

As reações de PCR para a identificação dos vírus HSV-1 (Herpes Simples) e EBV (Epstein-Barr) na saliva dos pacientes foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

Extração do DNA e Reação de PCR

A extração de DNA das amostras de saliva foi realizada tomando-se como base as técnicas especificadas no kit da Qiagen denominado de “QIAamp DNA Blood Mini Kit”, seguindo o seguinte protocolo:

I. Preparação da amostra de saliva:

- Adicionou-se 1 ml de “phosphate buffer saline” (PBS) no recipiente de armazenamento;
- Centrifugou-se a 2000 RPM por 10 minutos;

- Removeu-se o Salivette e retirou-se o equivalente a 250 μ L de saliva que foram colocados em tubos para microcentrifugação.

II. Extração do DNA:

- As amostras de 250 μ L de saliva foram centrifugadas as 14000 rotações por minuto, por 30 minutos, até ocorrer a formação de um “pellet” de células no fundo do tubo;
- Retirou-se 200 μ L de saliva incluindo o “pellet” de células e colocando-os num tubo de microcentrifuga; em seguida, adicionou-se 20 μ L de proteinase K (20 mg/ml em 50 mM Tris-HCL, pH 8,5 mM CaCl₂ e 50% de glicerol – Qiagen, código: 19133);
- Adicionou-se 200 μ L de tampão AL (tampão de lise - Qiagen, código: 19075);
- Misturaram-nos no vórtex por 20 segundos;
- Levaram-se ao banho-maria por 40 minutos;
- Após esse período, os tubos foram centrifugados rapidamente para remoção das gotas da tampa;
- Adicionou-se 200 μ L de etanol a 96% e misturaram-se no vórtex por 20 segundos;
- Realizou-se nova centrifugação rápida;
- Esta mistura foi então aplicada em tubo específico com filtro em coluna (Qiagen, QIAamp Spin Columns);
- Centrifugou-se a 8000 rotações por minuto (RPM) por 3 minutos;
- O filtro em coluna foi transportado para um tubo de microcentrifuga limpo;
- Adicionaram-se 500 μ L de tampão AW1 (tampão de lavagem - Qiagen, código: 19081);
- Centrifugou-se a 8000 rotações por minuto (RPM) por 3 minutos;
- O filtro em coluna foi transportado para um tubo de microcentrifuga limpo;
- Adicionaram-se 500 μ L de tampão AW2 (tampão de lavagem - Qiagen, código: 19072);
- Centrifugou-se a 14000 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos;

- O filtro em coluna foi transportado para um tubo de microcentrifuga limpo;
- Centrifugou-se a 14000 rotações por minuto (RPM) por 3 minutos;
- O filtro em coluna foi transportado para um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 ml;
- Adicionaram-se 50 μ L de tampão AE (tampão de eluição - Qiagen, código: 19077);
- Incubou-se a temperatura ambiente por 5 minutos;
- Centrifugou-se a 8000 rotações por minuto (RPM) por 3 minutos;
- A solução final no tubo foi utilizada para a realização das reações de PCR.

III. Quantificação das amostras:

Todas as amostras extraídas foram quantificadas utilizando o aparelho “NanoDrop 1000 Spectrophotometre V3.6” da Thermo Fisher scientific com leitura em 260/280 nm. Foram utilizados 2 μ L da amostra extraída para a quantificação. O negativo utilizado foi 2 μ L da solução de eluição.

A pureza dos extratos de DNA foi obtida pela razão de absorvência 260/280 nm. O valor considerado ideal foi de 1,8 a 2,0 nm.

As amostras consideradas não puras foram descartadas e a saliva coletada novamente a fim de se obter uma amostra de DNA pura.

IV. Reações de PCR:

O DNA obtido foi amplificado pela técnica da PCR utilizando-se iniciadores específicos para os gene HSV-1 e EBV, com seqüências obtidas da literatura como demonstrados na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Iniciadores para a identificação dos vírus

Vírus Acessado do BLAST	Iniciadores	Tamanho do Amplicon (pares de base)
HSV-1 (X03101)	1° round 5'- TACATCGGCGTCATCTACGGGG-3'	331
	5'-GGGCCAGGCGCTTGTGTTGGTGTA-3'	
	2° round 5'-GCGTTTATCAACCGCACCTCC-3'	150
	5'-CAGTTCGGCGGTGAGGACAAA-3'	
EBV (S71027)	1° round 5'- AGGGATGCCTGGACACAAGA-3'	602
	5'-TGTGCTGGTGCTGCTGGTGG-3'	
	2° round 5'-AACTTCAACCCACACCATCA-3'	116
	5'-TTCTGGACTATCTGGATCAT-3'	

Todas as reações foram feitas em tubos de 0,5 mL para PCR adicionando-se: tampão de PCR 1X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4; KCl 500mM) (Invitrogen, código – 11615-036), dNTP 0,3 mM (2'- deoxinucleotídeos 5'- triosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen, código – 11615-036), MgCl₂ (Invitrogen, código – 11615-036), iniciadores senso e antisenso (Invitrogen, código – 11615-036), Taq DNA 2U (Invitrogen, código – 11615-036), 10µL de DNA genômico e água estéril para um volume final de 25µL.

Todas as reações de PCR apresentavam controle negativo e positivo. O negativo foi representado pela mistura de todos os reagentes menos a amostra e o positivo foi, tanto para o HSV -1 quanto para o EBV, o DNA viral disponibilizado pelo grupo Demorellis, São Paulo – Brasil.

As condições de ciclagem para as reações do HSV-1 foram as seguintes: para primeira reação de PCR: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 1 ciclo de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 64°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto, 1 ciclo de desnaturação a 94°C/ 1 minuto, associação a 62°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto, 1 ciclo de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 59°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C durante 7 minutos. Para a reação nested-PCR, as condições ideais foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 30

ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 58°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C durante 7 minutos.

As condições de ciclagem para as reações do EBV foram as seguintes para primeira reação de PCR: desnaturação inicial a 95°C/3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 65°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C/7 minutos. Para a reação nested-PCR, as condições ideais foram: desnaturação inicial a 95°C/3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C/1 minuto, associação a 55°C/1 minuto, extensão a 72°C/1 minuto e extensão final a 72°C/7 minutos.

O resultado das PCRs foi visualizado através da eletroforese do DNA amplificado (78 Volts por 30 minutos) em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio (0,5 g/mL) e utilizando-se uma cuba horizontal com tampão de corrida TAE (Tris-acetato) 1x, pH 8,1. Para a visualização e documentação do gel de amplificação do DNA, foi utilizado um transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Fotodyne, Inc) e uma câmara fotográfica digital modelo Nikon 2000. Em todos os géis foi colocado, juntamente com as amostras a serem analisadas, um marcador de pares de base (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen), que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2000 a 100 pb.

Após a análise dos géis, as imagens foram processadas para preto e branco e adicionados textos explicativos, através do programa Adobe Photoshop CS, sem alteração da intensidade dos tons das bandas.

4.3- Análise estatística

Os testes estatísticos realizados com o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 17.0 foram: Kuskal-Wallis para idade, IPV, IGM e CPO-d/ceo-d. O teste qui-quadrado foi realizado para as demais variáveis com exceção dos exames laboratoriais, no qual realizou-se o teste de Mann-Whitney. O teste Qui-quadrado foi aplicado para comparar a detecção dos vírus em cada grupo e foi reaplicado o teste Qui-quadrado ajustado pela Correção

de Bonferroni para comparação entre os grupos. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi aplicado para todos os testes estatísticos.

5 RESULTADOS

5.1 Dados demográficos

Os pacientes do grupo 1, portadores de insuficiência renal crônica, eram na maioria do gênero masculino (14/25, 56%), negros (10/25, 40%) e com idade variando de 1 a 15 anos, sendo que a média de idade era de 9,6 anos e a mediana de 13 anos de idade.

O grupo 2, constituído por pacientes transplantados renais, era composto na maioria por pacientes do gênero masculino (14/25, 56%), brancos (12/25, 48%) e com idade variando de 2 a 14 anos, com média de idade de 9,1 anos e tendo a mediana de 10 anos.

O grupo 3, composto por pacientes normorreativos, que serviu de grupo controle, era composto pela maioria dos pacientes do gênero masculino (28/50, 56%), brancos (26/50, 52%) e com idade variando de 4 a 14 anos, com média de idade de 9,5 anos e mediana de 11 anos.

Para verificar possíveis diferenças demográficas entre os grupos estudados foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis, para idade. O p-valor foi de 0,38, o que nos permitiu afirmar que as amostras foram semelhantes em relação à idade. Em relação as demais variáveis demográficas não-paramétricas, gênero e cor da pele, foi realizado o Teste de Qui-quadrado. A variável gênero foram as variáveis demograficamente iguais nos três grupos avaliados ($p=0,618$) e a variável cor da pele apresentou-se estatisticamente significativa com $p=0.026$.

5.2 Doença de base e medicamentos utilizados

No grupo 1 a maioria dos pacientes tinha síndrome nefrótica (15/25, 60%), seguida de hipoplasia renal bilateral (3/25, 12%), glomerulopatias (3/25, 12%), bexiga neurogênica e não neurogênica (2/25, 8%), rins policísticos (1/25, 4%), glomeroesclerose segmentar focal (2/25, 8%), síndrome nefrótica cortico-resistente

(2/25, 8%), refluxo vésico-uretral (2/25, 8%) e síndrome urêmica hemolítica (1/25, 4%).

Do total da amostra estudada, 12 pacientes realizavam hemodiálise, 3 diálise peritoneal e 10 deles ainda apresentavam alguma função renal, e, por essa razão, não realizavam diálise e eram controlados clinicamente com medicamentos. Em relação à medicação utilizada por esses pacientes a maioria fazia uso de suplementos vitamínicos e de cálcio (4/10, 40%), seguido de anti-hipertensivos e suplementos vitamínicos (4/10, 40%), apenas anti-hipertensivos 2 dos 10 (20%) e dois pacientes (20%) faziam uso concomitantemente de anti-hipertensivo, suplementos, diuréticos e anti-histamínicos.

As doenças de base, que levaram ao transplante dos pacientes do grupo 2, incluíam: síndrome nefrótica (12/25, 48%), seguida de hipoplasia renal bilateral (3/25, 12%), glomerulopatias (4/25, 16%), rins policísticos (1/25, 4%), glomeroesclerose segmentar focal (3/25, 12%) e refluxo vésico-uretral (3/25, 12%). Três pacientes apresentavam 2 condições concomitantes, 2 pacientes apresentavam 3 condições concomitantes e 1 apresentava 4 condições concomitantes. Dos 25 pacientes 7 deles haviam sido transplantado há menos de 6 meses e 18 há mais de 6 meses.

Em relação à medicação utilizada por esses pacientes, todos faziam uso de corticosteróides (25/25, 100%), sendo que destes 15 pacientes faziam uso concomitante de corticosteróides e imunomoduladores (60%) e 10 utilizavam além do corticosteróides e do imunomodulador, um anti-hipertensivo (40%). Dentre os imunossupressores o mais utilizado foi o tacrolimos (14/25, 56%), seguido pela azatioprina (5/25, 20%), mifortin (5/25, 20%), ciclosporina (3/25, 12%) e micofenolato (2/25, 8%). Essas drogas eram usadas isolada ou associadamente.

Nenhum dos pacientes do grupo 3 apresentava qualquer tipo de doença sistêmica e não tomavam nenhum tipo de medicação.

5.3 Comorbidades

Em relação às comorbidades apresentadas pelos pacientes do grupo 1, a hipertensão arterial associada à doença de base foi frequente afetando 48% (12/25)

dos pacientes. Um (4%) paciente teve um acidente vascular cerebral após diagnóstico da doença de base, que levou à paralisia parcial do membro superior direito. No grupo 2 a hipertensão arterial afetava 40% (10/25) dos pacientes.

5.4 Exames complementares

Foram avaliadas, através de exames de sangue realizados no grupo 1 e 2, a função renal (uréia, creatinina, sódio, potássio, cálcio e fósforo), hepática (TGO, TGP, γ -GT e fosfatase alcalina), hematológica (série vermelha, branca e plaquetas) e glicemia em jejum.

De modo geral, os pacientes do grupo 1 apresentaram freqüentemente anemia com valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito abaixo da normal. Em relação à função renal, notou-se alteração nas taxas de fosfatase alcalina, uréia e creatinina; as demais taxas avaliadas apresentaram-se dentro da normalidade na maioria dos pacientes deste grupo. No grupo 2, notou-se alteração nos valores da série vermelha (eritrócitos, hemoglobina e hematócrito) e fosfatase alcalina aumentada.

Dentre os exames laboratoriais de análise clínica, através do *Teste de Mann-Whitney*, foram identificados 7 exames com resultados diferentes estatisticamente entre os grupos (Tabela 5.1): O grupo 1 apresentou maior alteração do que o grupo 2 nas taxas de creatinina com média de 3,63 e 1,40 mg/dL respectivamente ($p<0,001$) e uréia com média de 93,32 e 51,80 mg/dL ($p<0,001$). E o inverso ocorreu nas taxas de leucócitos com média de 7,40mil/mm³ para o grupo 1 e 9,42 mil/mm³ para o grupo 2 ($p=0,010$), TGP com média de 17,56 e 25,64 u/ml ($p=0,018$), γ -GT com média de 13,44 e 45,12 U/L ($p<0,001$), uréia com média de 93,32 e 51,80 mg/dL ($p<0,001$), cálcio com média de 8,20 e 9,43 mg/dL ($p=0,001$) e glicose com média de 83,80 e 88,52 mg/dL respectivamente ($p=0,002$).

É válido salientar que a maioria dos pacientes IRC (18/25, 72%) e TR (22/25, 88%) apresentavam quadro de anemia, levando a palidez da mucosa. Os valores de todos os exames avaliados podem ser observados na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Valores dos exames laboratoriais avaliados nos grupos 1 e 2

(Continua...)

Tipos de Exames (Valor de referência)	Grupo 1 N=25/100%	Grupo 2 N=25/100%	p-valor
Leucócitos (mil/ul) 4,6 a 10,2 - Normal < 4,5 - Alterado	22/88% 3/12%	13/52% 12/48%	p=0,005*
Neutrófilos 37 a 80% - Normal < 37% - Alterado	23/92% 2/8%	20/80% 5/20%	p=0,221
Eritrócitos (M/ul) 4,04 a 5,48 – Normal < 4 - Alterado	9/36% 16/64%	5/20% 20/80%	p=0,208
Hemoglobina (g/dL) 14,4 a 18,1 – Normal < 14 – Alterado	8/32% 17/68%	3/12% 22/88%	p=0,088
Hematócrito 37,7 a 47,9% - Normal < 37% - Alterado	7/28% 18/72%	3/12% 22/88%	p=0,157
Plaquetas (mil/uL) 142 a 424 – Normal <142 – Alterado	24/96% 1/4%	24/96% 1/4%	p>0,999
TGO (U/L) 8 a 33 – Normal > 33 Alterado	20/80% 5/20%	16/64% 9/36%	p=0,208
TGP (U/L) 7 a 35 – Normal > 35 Alterado	17/68% 8/32%	21/84% 4/16%	p=0,018*
Gama-GT (U/L) 1 a 24 – Normal > 24 Alterado	25/100% 0/0%	14/56% 11/44%	p<0,001*
Fosfatase alcalina (U/L) 70 a 290 – Normal > 290 – Alterado	10/40% 15/60%	6/24% 19/76%	p=0,225
Uréia (MG/100mL) 13 a 43 – Normal > 43 – Alterado (alto) < 13 – Alterado (baixo)	2/8% 23/92% 3/12%	19/76% 6/24% 0/0%	p<0,001*
Creatinina (mg/dL) 0,6 a 1,3 – Normal > 1,3 – Alterado (alto) < 0,6 – Alterado (baixo)	4/16% 15/60% 6/24%	16/64% 9/36% 0/0%	p<0,001*
Sódio (mEq/L) 136 a 145 – Normal > 145 – Alterado	25/100% 0/0%	25/100% 0/0%	p>0,999

Conclusão

Tipos de Exames (Valor de referência)	Grupo 1 N=25/100%	Grupo 2 N=25/100%	p-valor
Potássio (mEq/L) 3,5 a 5,1 – Normal > 5,1 – Alterado	19/76% 6/24%	21/84% 4/16%	p=0,480
Cálcio (mg/100ml) 8,6 a 10 – Normal > 10 – Alterado	18/72% 7/28%	22/88% 3/12%	p=0,001*
Fósforo (mg/ dL) 4,5 a 5,5 – Normal > 5,5 Alterado	13/52% 12/48%	19/76% 6/24%	p=0,077
Glicose (mg/dL) 70 a 99 – Normal > 99 Alterado	25/100% 0/0%	17/68% 8/16%	p=0,002*

*= valores estatisticamente significante

5.4 Manifestações bucais

As manifestações bucais observadas no grupo 1 foram: gengivite (13/25, 52%), sendo a maioria dos casos (5/25, 20%) com inflamação gengival leve (IGM 0,3). Neste grupo, a maioria das crianças (13/25, 52%) exibiu pobre higiene oral, com Índice de Placa Visível (IPV) médio de 5,7%. A presença de cálculo dental foi mais freqüente na região de incisivos inferiores e estava presente em 36% (9/25) dos pacientes.

As demais manifestações observadas neste grupo foram palidez da mucosa bucal (8/25, 32%), alteração de esmalte (5/25, 20%), manchas brancas (4/25, 16%), lesões de cárie (10/25, 40%) e (3/25, 12%) sensação de boca seca.

Todos os pacientes transplantados (grupo 2) que foram examinados apresentavam uma ou mais manifestações orais. A mais freqüentemente observada foi a gengivite (9/25, 36%) com IGM médio de 1,2, apresentando a maioria dos pacientes afetados (5/25, 20%), uma inflamação gengival intensa. O IPV médio foi de 6,9% das superfícies analisadas com placa abundante. A presença de cálculo dental foi mais freqüente na região de incisivos inferiores e vestibular de molares

inferiores e acometeu 6 dos 25 casos (24%), demonstrando que o índice de higiene oral destes pacientes era baixo em 9 dos 25 casos (36%).

Outras manifestações encontradas foram a candidíase (1/25, 4%), a queilite angular (1/25, 4%), e dentes conóides (1/25, 4%). A hiperplasia gengival medicamentosa esteve presente em 4 dos 25 (16%) dos pacientes desse grupo estudado, sendo em todos os casos grau 1.

No grupo 3, as manifestações bucais observadas foram a gengivite, em 28% do total de pacientes (14/50), com IGM médio de 0,8 e com a maioria dos pacientes acometidos (5/25, 20%) apresentando uma inflamação gengival moderada. O IPV apresentou média de 3,9% das superfícies analisadas com placa abundante. Neste grupo, o cálculo dental apresentou incidência de 6%, sendo a região mais afetada os incisivos inferiores, demonstrando que o índice de higiene oral destes pacientes era baixo em 14 dos 50 casos (28%).

As demais manifestações observadas foram alteração de esmalte (6/50, 12%), manchas brancas (8/50, 16%), lesão de cárie (16/50, 32%) e fratura dental (1/50, 2%).

Os achados bucais dos 3 grupos estão resumidos na tabela 5.2.

Tabela 5.2 Manifestações bucais observadas nos grupos estudados

Manifestações Bucais	Grupos estudados N/%			
	Grupo 01 N=25/100%	Grupo 02 N=25/100%	Grupo 03 N=50/100%	p Valor
Gengivite	13/ 52%	9/36%	14/28%	p=0,176
<i>IGM</i>	0,3	2,1	1,8	p=0,233
Leve (0,1 a 1,0)	5/20%	4/16%	5/20%	
Moderada (1,1 a 2,0)	4/16%	0/0%	5/20%	
Intensa (2,1 a 3,0)	4/16%	5/20%	4/16%	
IPV	5,7%	6,9%	3,9%	p=0,117
Indicador de higiene oral	Baixo	Baixo	Baixo	p=0,125
Baixo	13/52%	16/64%	36/72%	
Alto	12/48%	9/36%	14/28%	
Hiperplasia Gingival medicamentosa	0%	4/16%	0%	p=0,002*
Grau 1		4/100%		
Grau 2		0/100%		
Grau 3		0/100%		
CPO-d/ceo-d	1,04	1,76	2,12	p=0,511
Cálculo dental (presença)	9/36%	6/24%	3/6%	p=0,004*
Alteração de esmalte	5/20%	5/20%	6/12%	p=0,010*
Palidez da mucosa	8/32%	0%	0%	p<0,001*
Mancha branca	4/16%	2/8%	8/16%	p=0,608
Lesões de cárie	10/40%	2/8%	16/32%	p=0,006*
Sensação de boca seca	3/12%	0%	0%	p=0,044*
Lesões vesiculares	0%	2/8%	0%	p=0,047*
Candidíase	0%	1/4%	0%	p=0,047*
Queilite Angular	0%	1/4%	0%	p=0,047*
Dentes conóides	0%	1/4%	0%	p=0,047*
Fratura dental	0%	0%	1/2%	p=0,047*

*= valores diferentes entre os grupos significante estatisticamente

Com o intuito de obter uma relação entre os grupos com as manifestações bucais encontradas, foi realizado o Teste de Qui-quadrado seguido do teste binominal para as variáveis estatisticamente significantes.

Das 17 manifestações bucais avaliadas, 8 incidiram os grupos de forma diferente significativa estatisticamente: presença de lesões de cárie, cálculo dental, candidíase, queilite angular, alteração de esmalte, hiperplasia gengival medicamentosa, lesões vesiculares, sensação de boca seca e palidez da mucosa.

No grupo 1, as alterações que apresentaram maior incidência foram as lesões de cárie (p=0,006), os cálculos dentais (p=0,004) e a palidez da mucosa (p<0,001).

As lesões de candidíase ($p=0,047$), queilite angular ($p=0,047$), as hiperplasias gengivais medicamentosas ($p=0,002$), as lesões vesiculares ($p=0,047$) e a sensação de boca seca ($p=0,044$) apresentam maior incidência no grupo 2.

E a única alteração com maior incidência no grupo 3 foi a fratura dental ($p=0,047$). Sendo mais significativa para este grupo pela proporcionalidade de ocorrência quando comparado com os demais grupos.

5.5 Presença do HSV-1 e EBV

Quando comparados os três grupos, o grupo 2 foi o que apresentou mais casos positivos para os dois vírus analisados.

No grupo 2, o HSV-1 acometeu 28% (7/25) dos pacientes. Quando a comparação foi realizada par a par dos grupos estudados (grupo 1 x grupo 2; grupo 1 x grupo 3 e grupo 2 x grupo 3) notou-se ocorrência estatisticamente significativa ($p=0,021$) para o grupo 2 quando comparado apenas com o grupo 1.

A presença do EBV também foi mais prevalente no grupo 2 ($p=0,036$), sendo detectado em 60% (15/25) desses pacientes, seguido pelo grupo 3, detectado em 44% (22/50). O grupo 1 foi o que apresentou a menor taxa de detecção, ocorrendo em 24% (6/25) dos pacientes, conforme observado no gráfico abaixo. Quando a comparação foi realizada par a par entre os grupos estudados (grupo 1 x grupo 2; grupo 1 x grupo 3 e grupo 2 x grupo 3) notou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,010$) sendo os pacientes do grupo 2 os mais acometidos pela presença do EBV (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 – Taxas do HSV-1 e EBV nos três grupos estudados

Buscando associar a presença concomitante dos dois vírus, notou-se que o grupo 1 apresentou 1 caso (4%, 1/25) com a presença de HSV-1 e EBV; o grupo 2 apresentou 7 casos (28%, 7/25) e o grupo 3 apresentou 6 (12%, 6/50).

Buscou-se também uma associação da presença dos vírus com as manifestações bucais, isso em razão de dois pacientes do grupo 2, apresentarem lesões vesiculares intra-orais que poderiam estar associadas a presença dos vírus estudados. Esta associação foi pesquisada através da construção de modelos de regressão logística. O resultado encontrado mostrou que não houve associação das lesões com a presença dos dois vírus.

6 DISCUSSÃO

A idéia em estudar 3 grupos distintos de crianças foi entender melhor como a doença renal interfere na saúde bucal em suas 2 principais diferentes fases. A primeira, quando a criança apresenta a insuficiência renal crônica, e a segunda, depois que recebe o órgão transplantado. Esses dois momentos comparados a crianças saudáveis fornece uma noção muito clara dos aspectos com os quais o dentista deve se preocupar, do ponto de vista de prevenção e também de tratamento de doenças bucais, bem como de manejo clínico frente às alterações da saúde geral.

A saúde bucal dos 3 grupos apresentaram pontos em comum e algumas diferenças peculiares ao estado de saúde geral do paciente. Independentemente do grupo, a maioria das crianças exibia pobre higiene oral, gengivite e moderada incidência de cárie. Por ser a cárie uma doença multifatorial, acredita-se que esses resultados refletem muito dos problemas relacionados com nosso sistema de saúde e com os aspectos sócio culturais da população estudada. Todos eram usuários do sistema SUS, e não estavam ainda em tratamento odontológico, apesar de exibirem cáries e gengivite.

Embora os índices de cárie tenham sido expressivos em todos os grupos, os pacientes do grupo 1 exibiram o maior índice ($p=0,006$). Alguns autores afirmam que esses pacientes são submetidos à dieta com baixa quantidade de proteínas e altas quantidades de carboidratos. Esse tipo de dieta associado a pobre higiene oral justificaria o maior índice de cárie nesses pacientes^(25, 65).

A palidez da mucosa bucal (8/25, 32%) e sensação de boca seca (3/25, 12%), encontradas neste grupo, estão diretamente relacionadas com o estado de saúde dos pacientes, já que a maioria tem consumo restrito de líquido e usam medicações na diálise, como os anticoagulantes, que levam a anemia⁽⁴⁻⁷⁾.

Outra alteração bucal mais prevalente nos pacientes IRC foi a presença do cálculo dental ($p=0,004$). Trabalhos científicos indicam que o aumento na quantidade de cálculo dental pode ocorrer devido a elevados níveis de uréia plasmática e salivar. É descrito que pacientes com IRC exibem níveis salivares e plasmáticos aumentados de uréia⁽⁶⁾. Os resultados deste trabalho demonstraram que pacientes do grupo 1 (com IRC) apresentavam aumento dos níveis de uréia séricos.

As crianças do grupo 2, transplantadas renais, exibiam índice de CPO-d/ceo-d, graus de gengivite e qualidade de higiene oral semelhantes a dos demais grupos estudados.

As crianças desse grupo foram as únicas que exibiram quadros de hiperplasia gengival medicamentosa. Das 4 crianças acometidas todas tinham mais de seis meses de transplante, sendo que 2 usavam ciclosporina (2/50%) associada a corticosteróide e anti-hipertensivo e 2 usavam tacrolimus. O grau de hiperplasia encontrado foi grau 1. A HGM foi a queixa principal de 1 desses pacientes apenas. Acreditamos que por serem de grau 1, esses outros 3 pacientes não se incomodavam muito com o prejuízo estético que a HGM pode trazer. Alguns trabalhos da literatura trazem informações sobre o impacto da HGM na qualidade de vida dos pacientes pediátricos que se sentem envergonhados com a condição. Preconiza-se, como tratamento nesses casos, procedimentos cosméticos para a resolução da lesão ou tratamento alternativo como o uso de antibióticos (especialmente azatioprina), ou laserterapia e a troca do medicamento, quando possível⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾.

Em relação a lesões de tecido mole, apenas o grupo 2 exibiu alterações, como candidíase e lesões vesiculares. A detecção de candidíase explica-se em virtude da imunossupressão medicamentosa a qual os pacientes são submetidos para permitir a “pega” do transplante. Estudos anteriores confirmam esse achado^(5-8, 23). Quando consideramos o tempo de transplante, observamos que, com menos de seis meses, os pacientes transplantados apresentam maior acometimento por infecções oportunistas como a candidíase; fato este que foi observado neste estudo em que os dois pacientes acometidos por lesões de candidíase apresentavam 2 e 4 meses pós-transplante^(6, 8, 23, 24).

Ainda, no grupo 2, notou-se aumento na taxa de glicemia (8/25, 16%). Nossa metodologia não permitiu estabelecer o diagnóstico de diabetes mellitus com esses resultados, entretanto a presença desta alteração sistêmica nos TR é uma complicação metabólica comum acometendo aproximadamente 30% até 2 anos após transplante⁽⁶⁸⁾.

Em relação ao manejo odontológico destes pacientes é importante ressaltar que a avaliação bucal deve buscar as alterações mais frequentes que são o aumento das doenças periodontais, redução do fluxo salivar, modificação nos componentes salivares, sensação de ardência, aumento das possíveis infecções

bucais, diminuição dos processos cicatriciais e halitose⁽⁶⁹⁾.

O grupo 3 (pacientes normorreativos) apresentou basicamente as mesmas alterações bucais encontradas nos IRC e nos TR como os índices de CPO-d/ceo-d, graus de gengivite, cálculo dental e qualidade de higiene oral.

Em virtude dessas alterações terem se apresentado semelhantes, nota-se que não há necessidade dos pacientes do grupo 1 e 2 passarem por avaliações mais frequentes e mais detalhadas que os pacientes normorreativos.

Com relação a investigação da presença de HSV-1 e EBV na saliva total de pacientes pediátricos observa-se que esses vírus podem ser encontrados no interior das células epiteliais da mucosa bucal bem como soltos na saliva. Por essa razão, a saliva é um veículo para a transmissão horizontal e também uma fonte de material adequado para sua detecção^(1, 35, 47, 70).

O monitoramento destes vírus em pacientes pré e pós-transplante é feito rotineiramente através da sorologia, entretanto esse método demonstra menor sensibilidade em virtude da identificação dos anticorpos contra esses vírus não ocorrer nos estágios iniciais da infecção aguda⁽³²⁻³⁴⁾, quando comprado as técnicas de biologia molecular como a PCR, que se apresenta mais sensível e capaz de detectar partículas virais antes da formação de anticorpos pelos pacientes^(1, 27, 34, 35), justificando, desta forma a técnica utilizada neste estudo.

As partículas virais livres encontradas na saliva seriam provenientes de células infectadas, sejam na infecção primária sejam na reativação; com isso, os autores sugerem que a infecção dos órgãos e tecidos internos ocorre possivelmente por pequenas dilacerações na mucosa bucal e região de orofaringe, causando um contínuo desafio para o sistema imune do hospedeiro^(70, 71).

A reativação desses vírus pode causar, nos órgãos internos, hepatite, encefalite, pneumonia e desordens linfoproliferativas, o que leva ao aumento da mortalidade e morbidade^(16, 48, 49, 72).

Na boca, pode-se verificar a presença de úlceras, causadas pelo EBV, de grande porte, confluentes, provocando sintomatologia dolorosa, diminuindo a qualidade de vida dessas crianças. O tratamento dessas lesões é feito com drogas antivirais^(28, 30, 52).

Neste presente estudo a comparação entre os três grupos demonstrou maior frequência de HSV-1 e do EBV nos pacientes transplantados renais (grupo 2), comparados com os insuficientes renais crônicos (grupo 1) e com os pacientes

normorreativos (grupo 3). Esse resultado era esperado, uma vez que os pacientes transplantados são pacientes imunossuprimidos. Além disso, outros autores já haviam demonstrado essa maior incidência de HSV e EBV nesse tipo de paciente^(1, 26, 27, 33, 73). Mas quando analisamos a probabilidade dos diferentes grupos estudados em ter o vírus na saliva, percebemos que ela é muito parecida: em relação a presença do EBV quando comparado entre os IRC e os TR, nota-se que os TR tem 2,5 vezes mais probabilidade de ter o EBV do que os IRC. E quando comparamos os TR e os normorreativos nota-se que os TR tem aproximadamente 1,36 vezes mais probabilidade de ter o EBV.

Esses valores estão de acordo com a literatura, na qual se observou que, quando comparada, a incidência de EBV entre os grupos é sempre maior. As taxas variam de 16 a 48% em normorreativos, 23 a 30% nos IRC e de 19 a 93% nos TR^(12, 14, 15, 26, 39, 50-52, 74).

Buscando associar a presença concomitante dos dois vírus, notou-se que o grupo 1 apresentou 1 caso dos 25 (4%) com a presença de HSV-1 e EBV; o grupo 2, com 7 dos 25 casos (28%); e o grupo 3 com 6 dos 50 casos (12%).

Essa associação torna-se importante em virtude de alguns autores indicarem que a presença de HSV-1 pode facilitar a posterior infecção pelo EBV, provocando lesões bucais mais graves e que podem levar a alterações oncogênicas e aumento da proliferação de linfócitos infectados. Com isso, no presente estudo, observamos que o grupo TR tem maior probabilidade de ter esse tipo de associação^(30, 31).

Buscou-se também uma associação da presença dos vírus e as manifestações bucais. E as únicas correlações estatisticamente significantes foram o IPV e o IGM, nos quais se notou que quanto maior o IPV, maior é a probabilidade do paciente apresentar o HSV-1 e quanto maior a severidade de IGM menor a probabilidade do paciente apresentar infecção pelo vírus EBV.

Desta forma, sugere-se que uma maior quantidade de placa pode facilitar a infecção pelo HSV-1, o que não ocorre com o EBV. E quanto maior o IGM menor a presença de EBV que pode ser explicado pela presença de células de defesa estarem presentes no local e que talvez estas consigam combater a infecção pelo EBV.

Frente a todas essas alterações nota-se que o transplante de órgão oferece as crianças em estágio terminal da doença uma oportunidade de maior

expectativa e qualidade de vida. Esses benefícios são semelhantes ao que ocorre com os pacientes adultos, entretanto, para as crianças, o significado é ainda mais profundo, incluindo o potencial de uma trajetória de crescimento e desenvolvimento cognitivo e realização das mudanças para a idade adulta^(75, 76).

O acompanhamento destes pacientes torna-se necessário para um melhor entendimento das alterações que ocorrem pós-transplante que poderiam dificultar a qualidade de vida e o órgão transplantado, entre elas as manifestações bucais que esses pacientes podem apresentar, sendo, em alguns casos, os primeiros sintomas que o paciente com uma intensa imunossupressão apresenta^(75, 76).

Mesmo existindo centros que realizam atendimento odontológico a pacientes pré e pós-transplante, sejam eles no próprio hospital que o paciente faz acompanhamento ou em outros locais, os responsáveis, na maioria dos casos, não procuram esse tipo de atendimento para seus filhos, por falta do conhecimento de que estes pacientes precisam de acompanhamento odontológico pré, trans e pós-transplante.

Por fim, torna-se importante o esclarecimento aos pais e responsáveis sobre as alterações bucais de seus filhos para que estes possam procurar cirurgiões dentistas que realizarão um tratamento adequado. É, também, de grande importância a presença de cirurgiões dentistas nas equipes transplantadoras para que o diagnóstico e tratamento corretos sejam bem executados nestas crianças, possibilitando uma melhor qualidade de vida.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- 1- As manifestações bucais mais freqüentemente encontradas comparadas entre os grupos foram:

No grupo 1 as gengivites, as lesões de cárie, os cálculos dentais, sensação de boca seca e a palidez da mucosa.

No grupo 2 as gengivites, lesões de candidíase, as hiperplasias gengivais medicamentosas e as lesões vesiculares.

No grupo 3 as gengivites, alterações de esmalte e lesão de cárie.

- 2- Frente a estes dados, o presente estudo demonstrou que a imunossupressão dos pacientes pediátricos transplantados renais aumenta a presença dos vírus HSV-1 e EBV na saliva total, possibilitando uma maior ocorrência de reativação ou reinfecção nos pacientes transplantados renais.

REFERÊNCIAS¹

1. Djuric M, Jankovic L, Jovanovic T, Pavlica D, Brkic S, Knezevic A, et al. Prevalence of oral herpes simplex virus reactivation in cancer patients: a comparison of different techniques of viral detection. *J Oral Pathol Med*. 2009 Feb;38(2):167-73.
2. Rubin RH, Schaffner A, Speich R. Introduction to the Immunocompromised Host Society consensus conference on epidemiology, prevention, diagnosis, and management of infections in solid-organ transplant patients. *Clin Infect Dis*. 2001 Jul 1;33 Suppl 1:S1-4.
3. Órgãos ABdTd. 2009 [updated 29/08/2010]; Available from: <http://www.abto.com.br>.
4. Andres A, Toso C, Morel P, Demuylder-Mischler S, Bosco D, Baertschiger R, et al. Impact of a sirolimus/tacrolimus-based immunosuppressive regimen on kidney function after islet transplantation. *Transplant Proc*. 2005 Mar;37(2):1326-7.
5. Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A, et al. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007 Jan;12(1):E19-25.
6. de la Rosa-Garcia E, Mondragon-Padilla A, Irigoyen-Camacho ME, Bustamante-Ramirez MA. Oral lesions in a group of kidney transplant patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 May-Jul;10(3):196-204.
7. Seymour RA, Thomason JM, Nolan A. Oral lesions in organ transplant patients. *J Oral Pathol Med*. 1997 Aug;26(7):297-304.
8. Summers SA, Tilakaratne WM, Fortune F, Ashman N. Renal disease and the mouth. *Am J Med*. 2007 Jul;120(7):568-73.
9. Lucas VS, Roberts GJ. Oro-dental health in children with chronic renal failure and after renal transplantation: a clinical review. *Pediatr Nephrol*. 2005 Oct;20(10):1388-94.
10. Dias EP, Israel MS, Silva Junior A, Maciel VA, Gagliardi JP, Oliveira RH. Prevalence of oral hairy leukoplakia in 120 pediatric patients infected with HIV-1. *Braz Oral Res*. 2006 Apr-Jun;20(2):103-7.
11. Ellis D, Jaffe R, Green M, Janosky JJ, Lombardozzi-Lane S, Shapiro R, et al. Epstein-Barr virus-related disorders in children undergoing renal transplantation with tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation*. 1999 Oct 15;68(7):997-1003.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

12. Grando LJ, Machado DC, Spitzer S, Nachman S, Ferguson F, Berentsen B, et al. Viral coinfection in the oral cavity of HIV-infected children: relation among HIV viral load, CD4+ T lymphocyte count and detection of EBV, CMV and HSV. *Braz Oral Res.* 2005 Jul-Sep;19(3):228-34.
13. Kullberg-Lindh C, Ascher H, Saalman R, Olausson M, Lindh M. Epstein-Barr viremia levels after pediatric liver transplantation as measured by real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Transplant.* 2006 Feb;10(1):83-9.
14. Lucht E, Brytting M, Bjerregaard L, Julander I, Linde A. Shedding of cytomegalovirus and herpesviruses 6, 7, and 8 in saliva of human immunodeficiency virus type 1-infected patients and healthy controls. *Clin Infect Dis.* 1998 Jul;27(1):137-41.
15. Miller CS, Berger JR, Mootoor Y, Avdiushko SA, Zhu H, Kryscio RJ. High prevalence of multiple human herpesviruses in saliva from human immunodeficiency virus-infected persons in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2006 Jul;44(7):2409-15.
16. Rogers BB, Sommerauer J, Quan A, Timmons CF, Dawson DB, Scheuermann RH, et al. Epstein-Barr virus polymerase chain reaction and serology in pediatric post-transplant lymphoproliferative disorder: three-year experience. *Pediatr Dev Pathol.* 1998 Nov-Dec;1(6):480-6.
17. Riyuzo M, Macedo C, Assao A, Fekete S, Trindade A, Bastos H. Insuficiência renal crônica na criança: aspectos clínicos, achados laboratoriais e evolução. *J. Bras Nefrol.* 2003;25(4):200-8.
18. Nefrologia SBd. 2007 [cited 2010 29/08/2010]; Available from: www.abcdt.org.br.
19. Castro M. Atualização em diálise: complicações agudas em hemodiálise. *J Bras Nefrol.* 2001;23(2):108-13.
20. Bots CP, Poorterman JH, Brand HS, Kalsbeek H, van Amerongen BM, Veerman EC, et al. The oral health status of dentate patients with chronic renal failure undergoing dialysis therapy. *Oral Dis.* 2006 Mar;12(2):176-80.
21. Proctor R, Kumar N, Stein A, Moles D, Porter S. Oral and dental aspects of chronic renal failure. *J Dent Res.* 2005 Mar;84(3):199-208.
22. Noronha I, Ferraz A, Silva Filho A, Saitovich D, Carvalho D, Paula F, et al. Diretrizes para conduta médica. *J Bras Nefrol.* 2002;50(4):120-30.
23. Sozen H, Dalgic A, Karakayali H, Baskin E, Saatci U, Arslan G, et al. Renal transplantation in children. *Transplant Proc.* 2006 Mar;38(2):426-9.
24. Guggenheimer J, Egtesad B, Stock DJ. Dental management of the (solid) organ transplant patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Apr;95(4):383-9.

25. Ferguson CA, Whyman RA. Dental management of people with renal disease and renal transplants. *N Z Dent J*. 1998 Sep;94(417):125-30.
26. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med*. 2008 Feb;37(2):107-21.
27. Guimaraes AL, Gomes CC, da Silva LM, Correia-Silva Jde F, Victoria JM, Gomez RS, et al. Association between oral HSV-1 and survival in allogeneic hematopoietic stem cell transplanted patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Feb;14(2):E62-8.
28. Miller CS, Avdiushko SA, Kryscio RJ, Danaher RJ, Jacob RJ. Effect of prophylactic valacyclovir on the presence of human herpesvirus DNA in saliva of healthy individuals after dental treatment. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2173-80.
29. Eisen HJ, Kobashigawa J, Keogh A, Bourge R, Renlund D, Mentzer R, et al. Three-year results of a randomized, double-blind, controlled trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in cardiac transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2005 May;24(5):517-25.
30. Mora-Fernandez C, Navarro JF, Garcia-Perez J. Herpes simplex virus as a sentinel lesion for cytomegalovirus infection. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Apr;12(4):853.
31. Lippmann BJ, Brennan DC, Wong J, Lowell JA, Singer GG, Howard TK. Are varicella zoster and herpes simplex sentinel lesions for cytomegalovirus in renal transplant recipients? *Lancet*. 1995 Sep 30;346(8979):914-5.
32. Barzon L, Murer L, Pacenti M, Biasolo MA, Vella MD, Ghirardo G, et al. Detection of viral DNA in kidney graft preservation and washing solutions is predictive of posttransplant infections in pediatric recipients. *J Infect Dis*. 2009 Nov 1;200(9):1425-33.
33. Komatsu H, Kogawa K, Nonoyama S, Inui A, Sogo T, Fujisawa T, et al. Bone marrow transplantation from a pediatric donor with a high frequency of cytomegalovirus-specific T-cells. *J Med Virol*. 2006 Dec;78(12):1616-23.
34. Marques-Silva L, Castro WH, Gomez EL, Guimaraes AL, Silva MS, Gomez RS. The impact of dental surgery on HSV-1 reactivation in the oral mucosa of seropositive patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Nov;65(11):2269-72.
35. Kimura H, Ito Y, Suzuki R, Nishiyama Y. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease. *Rev Med Virol*. 2008 Sep-Oct;18(5):305-19.
36. Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, Murray PG. The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*. 1999 Dec;52(6):307-22.

37. Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ.* 2004 Dec;28(1-4):44-50.
38. Flohr T, Bonatti H, Frierson H, Harmon RC, Berg C, Sifri CD, et al. Herpes simplex virus hepatitis after renal transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2008 Oct;10(5):377-8.
39. Grando LJY, Machado LS; Silva DC, Menezes CL, Picolli M. Manifestações estomatológicas de crianças brasileiras e norte-americanas transplantedas renais. *Pequi Odontol Bras.* 2002 Jan-mar;16(1):18-25.
40. Niederman J, A. E. Viral infections of humans: Epidemiology and control. In: Evans A S KRA, editor. *Epstein-Barr Vírus.* New York: Plenum; 1997. p. 253-83.
41. Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000 Aug 17;343(7):481-92.
42. Evans AS. Clinical syndromes associated with EB virus infection. *Adv Intern Med.* 1972;18:77-93.
43. Lennette ET, Winberg G, Yadav M, Enblad G, Klein G. Antibodies to LMP2A/2B in EBV-carrying malignancies. *Eur J Cancer.* 1995 Oct;31A(11):1875-8.
44. Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH. The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol.* 2000 Apr;8(4):185-9.
45. Shroff R, Rees L. The post-transplant lymphoproliferative disorder-a literature review. *Pediatr Nephrol.* 2004 Apr;19(4):369-77.
46. Vyse AJ, Cohen BJ, Ramsay ME. A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children. *Public Health.* 2001 May;115(3):201-7.
47. Maurmann S, Fricke L, Wagner HJ, Schlenke P, Hennig H, Steinhoff J, et al. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5419-28.
48. Al-Otaibi LM, Al-Sulaiman MH, Teo CG, Porter SR. Extensive oral shedding of human herpesvirus 8 in a renal allograft recipient. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Apr;24(2):109-15.
49. Sato T, Fujieda M, Maeda A, Tanaka E, Miyamura M, Chikamoto H, et al. Monitoring of Epstein-Barr virus load and killer T cells in pediatric renal transplant recipients. *Clin Nephrol.* 2008 Nov;70(5):393-403.
50. Ammatuna P, Campisi G, Giovannelli L, Giambelluca D, Alaimo C, Mancuso S, et al. Presence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients. *Oral Dis.* 2001 Jan;7(1):34-40.

51. Braz-Silva PH OK, Rezende NP, Nunes FD, Magalhães MHCG. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in the oral mucosa of renal transplant patients. *Diagn Cytopathol.* 2006;33(1):24-8.
52. Miller GE, Freedland KE, Duntley S, Carney RM. Relation of depressive symptoms to C-reactive protein and pathogen burden (cytomegalovirus, herpes simplex virus, Epstein-Barr virus) in patients with earlier acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 2005 Feb 1;95(3):317-21.
53. King GN, Healy CM, Glover MT, Kwan JT, Williams DM, Leigh IM, et al. Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis, and gingival hyperplasia in renal transplant recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994 Dec;78(6):718-26.
54. Imashuku S, Kuriyama K, Sakai R, Nakao Y, Masuda S, Yasuda N, et al. Treatment of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH) in young adults: a report from the HLH study center. *Med Pediatr Oncol.* 2003 Aug;41(2):103-9.
55. Komatsu TL, Rivero ER, Gallottini de Magalhaes MH, Nunes FD. Epstein-Barr virus in oral hairy leukoplakia scrapes: identification by PCR. *Braz Oral Res.* 2005 Oct-Dec;19(4):317-21.
56. Lankester AC, van Tol MJ, Vossen JM, Kroes AC, Claas E. Epstein-Barr virus (EBV)-DNA quantification in pediatric allogeneic stem cell recipients: prediction of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Blood.* 2002 Apr 1;99(7):2630-1.
57. Flanagan KH, Brennan DC. EBV-associated recurrent Hodgkin's disease after renal transplantation. *Transpl Int.* 2006 Apr;19(4):338-41.
58. Kopf S, Tonshoff B. Surveillance of Epstein-Barr virus infection as a risk factor for post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol.* 2004 Apr;19(4):365-8.
59. Kirk ADF, Elizabeth; Fischer, Steven; Hale, Douglas A; Cohen, Jeffery; Mannon, Roslyn B. Epstein Barr Virus (Ebv) As A Biological Indicator of Immunosuppression in Human Renal Transplantation. *Transplantation.* 2006;82(1):148-9.
60. Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, et al. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med.* 1985 Dec 19;313(25):1564-71.
61. Lindh J. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 3, editor. Nova York: Guanabara Koogan; 2003.
62. Newman HN, Takei JA, Carranza FA. Periodontia Clínica. 3° edi: Guanabara Koogan; 2004.
63. Opperman M. Medicina Periodontal. 3, edi: Guanabara Koogan; 2003.

64. Angelopoulos AP, Goaz PW. Incidence of diphenylhydantoin gingival hyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972 Dec;34(6):898-906.
65. Davidovich E, Schwarz Z, Davidovitch M, Eidelman E, Bimstein E. Oral findings and periodontal status in children, adolescents and young adults suffering from renal failure. *J Clin Periodontol.* 2005 Oct;32(10):1076-82.
66. Horning GM, Cohen ME. Necrotizing ulcerative gingivitis, periodontitis, and stomatitis: clinical staging and predisposing factors. *J Periodontol.* 1995 Nov;66(11):990-8.
67. Lima RB, Benini V, Sens YA. Gingival overgrowth in renal transplant recipients: a study concerning prevalence, severity, periodontal, and predisposing factors. *Transplant Proc.* 2008 Jun;40(5):1425-8.
68. Mannon RB. Therapeutic management of posttransplant diabetes mellitus. *Transplant Rev (Orlando).* 2008 Apr;22(2):116-24.
69. Negrato CA, Tarzia O. Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2:3.
70. Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LP, Oliveira FE, Costa FO, et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Dis.* 2007 Mar;16(2):210-6.
71. Kloover JS, van den Bogaard AE, van Dam JG, Grauls GE, Vink C, Bruggeman CA. Persistent rat cytomegalovirus (RCMV) infection of the salivary glands contributes to the anti-RCMV humoral immune response. *Virus Res.* 2002 May 10;85(2):163-72.
72. Ammatuna P, Giovannelli L, Giambelluca D, Mancuso S, Rubino E, Colletti P, et al. Presence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in the cervix of women infected with the human immunodeficiency virus. *J Med Virol.* 2000 Dec;62(4):410-5.
73. Imbronito AV, Okuda OS, Maria de Freitas N, Moreira Lotufo RF, Nunes FD. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J Periodontol.* 2008 Dec;79(12):2313-21.
74. Hille JJ, Webster-Cyriaque J, Palefski JM, Raab-Traub N. Mechanisms of expression of HHV8, EBV and HPV in selected HIV-associated oral lesions. *Oral Dis.* 2002;8 Suppl 2:161-8.
75. Abdel-Kader K, Myaskovsky L, Karpov I, Shah J, Hess R, Dew MA, et al. Individual quality of life in chronic kidney disease: influence of age and dialysis modality. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009 Apr;4(4):711-8.
76. Allain-Launay E, Roussey-Kesler G, Ranchin B, Guest G, Maisin A, Novo R, et al. Mortality in pediatric renal transplantation: a study of the French pediatric kidney database. *Pediatr Transplant.* 2009 Sep;13(6):725-30.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº de registro no CEP:174/2007

“Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de pacientes pediátricos pré e pós-transplante renal”

Seu filho(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar que ele(a) faça parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa seu filho(a) não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar a Erika Martins Pereira (pesquisadora) ou para a Profª Drª Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães (orientadora) no telefone 3091-7902.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A ocorrência de infecções no período pós-transplante é função do estado de imunodepressão do paciente e das condições que o paciente está exposto. Os vírus da família *Herpesviridae* entra no organismo pela cavidade bucal, infectando as células epiteliais da cavidade bucal e glândulas salivares. Em seguida penetram na corrente sanguínea infectando os linfócitos B e T e se multiplicam. Dificultando com isso a função de defesa do organismo e causando lesões graves.

Primeiramente você irá responder a um questionário sobre a saúde geral e bucal da criança. Depois a criança terá a boca examinada por uma dentista para avaliar sua saúde bucal. Em seguida, será feita a coleta de saliva com uso de uma haste com esponja absorvente pequena. Este procedimento é indolor e não causa ferimentos. A coleta do sangue será realizada através de um pequeno furo no dedo indicador e em seguida duas gotas de sangue serão coletadas em um papel absorvente. Este procedimento não causa ferimentos.

A participação não trará gastos a você e as informações obtidas poderão beneficiar você e outras pessoas, pois poderá fornecer informações sobre a presença, quantificação e localização dos vírus da família *Herpesviridae*. Se encontrarmos uma lesão em sua boca e suspeitarmos que ela possa ser causada por algum desses vírus, você será encaminhado para o tratamento adequado na clínica odontológica do Centro de atendimento a pacientes especiais (CAPE) na FOUSP. Os procedimentos realizados durante o estudo serão inteiramente gratuitos.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____,
RG/ _____, abaixo assinado, concordo que meu filho(a) participe do estudo “Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de pacientes pediátricos pré e pós-transplante renal”, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Erika Martins Pereira sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência ou tratamento.

Local e data: _____

Nome do responsável: _____

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA E RESPONSÁVEL
LEGAL**

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL _____
NATUREZA (grau de parentesco) _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : _____ SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ____/____/_____
ENDEREÇO: _____
BAIRRO: _____ CIDADE: _____
CEP: _____ TELEFONE: DDD (_____) _____
ASSINATURA: _____

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza deste estudo, junto ao participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o participante e/ou seu representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em uma linguagem clara e compreensível e que ele(a) compreendeu essa explicação. Não haverá prejuízo no tratamento deste paciente caso ele queira se retirar da pesquisa a qualquer momento

Assinatura da Pesquisadora

Data: _____

PROJETO DE PESQUISA DE DOUTORADO

“Avaliação da saúde bucal e detecção dos vírus HSV-1 e EBV na saliva de pacientes pediátricos pré e pós-transplante renal”

Aluna: Erika Mont'Alverne Pereira Silva

Orientadora: Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães

FICHA CLÍNICA (GRUPO CONTROLE/GRUPO DE ESTUDO)

Paciente: _____

1. Identificação:

Paciente: _____

Gênero: _____ Idade: _____ Raça: _____

Numero de protocolo Santa Casa: _____

Nome do responsável: _____

Natureza (grau de parentesco): _____

Telefones para contato: _____

2. Anamnese:

- História médica:
- Apresenta algum tipo de doença sistêmica?

Apresentou algum tipo de doença renal?

- Medicação em uso:

Medicação	Apresentação	Posologia	Quanto tempo

- Histórico de alterações bucais:

Já teve ou tem:

- Ulceração: ☐ Sim ☐ Não _____
- Mancha branca: ☐ Sim ☐ Não _____
- Mancha Vermelha: ☐ Sim ☐ Não _____
- Nódulos: ☐ Sim ☐ Não _____
- Pápulas: ☐ Sim ☐ Não _____
- Descamação: ☐ Sim ☐ Não _____
- Diminuição da saliva: ☐ Sim ☐ Não _____
- Gengivite ☐ Sim ☐ Não _____
- Periodontite ☐ Sim ☐ Não _____
- Hiperplasia gengival medicamentosa ☐ Sim ☐ Não _____

Se teve,

Já removeu cirurgicamente? ☐ Sim ☐ Não

Recidivou? ☐ Sim ☐ Não

Regrediu com algum medicamento? ☐ Sim ☐ Não _____

Teve que mudar a medicação por causa da HGM? ☐ Sim ☐ Não

3. Exame Físico:

Data: __/__/__

GRAU DE HIPERPLASIA GENGIVAL: _____

Grau 0: gengiva normal, sem hiperplasia

Grau 1: hiperplasia gengival cobrindo o terço cervical ou menos dos dentes anteriores.

Grau 2: hiperplasia gengival cobrindo até o terço médio dos dentes anteriores

Grau 3: hiperplasia gengival cobrindo mais de dois terço dos dentes anteriores

Aspecto clínicos das lesões:

Lesão	Coloração	Consistência	Superfície	Forma	Brilho
Nódulo					
Pápula					
M. Branca					
M. Vermelha					
Ulceração					
Descamação					
Gengivite					
HGM					
Periodontite					

CPO-d/ ceo-d

Dentes Perdido: verde

Dentes cariados: vermelha

Dente obturado: azul

Dente não irrompido: lilás

Periograma

IG: vermelho e IP: Azul

REAÇÕES EBV
GRUPO 1 e 2 – Pacientes Pré e Pós-transplante renal

REAÇÕES EBV
GRUPO 1 e 2 – Pacientes Pré e Pós-transplante renal

REAÇÕES EBV
GRUPO 3 – Pacientes Normorreativos

REAÇÕES EBV
GRUPO 3 – Pacientes Normorreativos

REAÇÕES HSV-1
GRUPO 1 e 2 – Pacientes Pré e Pós-transplante renal

REAÇÕES HSV-1
GRUPO 1 e 2 – Pacientes Pré e Pós-transplante renal

REAÇÕES HSV-1
GRUPO 1 e 2 – Pacientes Pré e Pós-transplante renal

REAÇÕES HSV-1
GRUPO 3 – Pacientes Normorreativos

REAÇÕES HSV-1
GRUPO 3 – Pacientes Normorreativos

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

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 174/2007

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DOS VÍRUS DA FAMÍLIA HERPESVIRIDAE NA SALIVA E SANGUE DE PACIENTES PEDIÁTRICOS TRANSPLANTADOS RENAL PELA TÉCNICA DE PCR"**, de responsabilidade da Pesquisadora ERIKA MARTINS PEREIRA sob orientação do(a) Prof(a). Doutor(a). MARINA HELENA CURY GALLOTTINI DE MAGALHÃES.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 10 de junho de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP