



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

**IDENTIFICACIÓN DE CITOCINAS INFLAMATORIAS SALIVALES, FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL ALFA, Y LAS INTERLEUCINAS -1 α , -1 β , -2, -6, -10 y -17 EN
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA DURANTE LA QUIMIOTERAPIA DE
INDUCCIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE LESIONES
BUCALES**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL

P R E S E N T A

C.D. José Gabriel Zambrano

Comité tutorial:

Co-Directora: Dra. Velia Ramírez Amador
Co-Directora: Dra. Gabriela Anaya Saavedra
Asesor: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

México, D.F., julio 2015

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad
Xochimilco aprobó la ICR que presentó:

JOSE GABRIEL ZAMBRANO

Comité Tutorial:

Co-Directora: Dra. Velia Aydée Ramírez Amador

Co-Directora: Dra. Gabriela Anaya Saavedra

Asesor: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Jurado:

M. en C. Estela de la Rosa García (Presidenta)

M. en PMB. Jessica Maldonado Mendoza (Secretaria)

Dr. Miguel Ángel Álvarez Avitia (Vocal)

Resumen

Introducción: Son pocos los estudios que evalúan la asociación entre la expresión de citocinas y el desarrollo de lesiones bucales (LB) en individuos con leucemia aguda (LA) y quimioterapia (QT), a pesar del importante papel que juegan las interleucinas (IL) en la inmunidad antimicrobiana y en la patogénesis de la mucositis bucal (MB).

Objetivo: Determinar los cambios en la expresión de citocinas inflamatorias salivales (IL-1 α , -1 β , -2, -6, -10, -17 y TNF) en los pacientes con LA antes y durante la administración de QT de inducción y su posible asociación con el desarrollo de LB.

Material y método: Estudio de cohorte, observacional y analítico. Se incluyeron pacientes >15 años, con diagnóstico de LA, próximos a iniciar QT de inducción en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan), de diciembre de 2013 a septiembre de 2014. El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación de las instituciones participantes. Previo consentimiento informado, en cada paciente se registraron datos demográficos y se realizó un minucioso examen bucal. Se tomaron muestras de saliva en diferentes visitas (0, 4-12 días y 13-21 días post-quimioterapia). Las muestras fueron tratadas con un inhibidor de proteasa, centrifugadas y almacenadas a -70°C. Para determinar los niveles de citocinas se realizó el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (kit *Magpix Multiplex Human Cytokine Magnetic bead* y *Luminex Magpix System*). El análisis estadístico se realizó con el programa STATA V-12, con un nivel de significancia menor de 0.05.

Resultados: Se incluyeron 41 pacientes, de los cuales 17 (41.5%) desarrollaron alguna manifestación bucal durante la QT, siendo más frecuente la infección por el virus del herpes simple (IVHS) que se desarrolló en nueve (21.9%) individuos, seguida de candidiasis bucal (CB) en siete (17.1%) y mucositis bucal (MB) en cuatro (9.7%). Los pacientes que desarrollaron LB durante la QT presentaron mayores niveles basales en saliva de IL-1 α ($p=0.040$) y a los 4-12 días post-quimioterapia de IL-1 α ($p=0.033$), -1 β ($p=0.016$), -6 ($p=0.035$) y TNF ($p=0.019$), en comparación con el grupo sin LB. Los pacientes con niveles elevados de TNF presentaron mayor probabilidad de desarrollar LB en un momento dado del seguimiento (HR: 3.41, IC 95%: 1.20 - 9.66, $p=0.021$).

Discusión: El aumento en los niveles de IL encontrados en el presente estudio pudiera sugerir una respuesta frente al desarrollo de CB, IVHS y MB particularmente de TNF, citocina que favorece la migración y activación de macrófagos y neutrófilos, estimula la capacidad antimicrobiana del epitelio de la mucosa bucal y estimula la apoptosis de queratinocitos infectados.

Conclusión: La respuesta inmune innata en los pacientes con LA, particularmente la mediada por TNF, podría ser un potencial marcador del desarrollo de LB.

Introducción

En los pacientes con leucemia aguda (LA), el tratamiento de elección está constituido por altas dosis de agentes quimioterapéuticos y corticoesteroides, que en su primera fase, o de inducción, son administrados durante 21 días, con la consecuente inmunosupresión sistémica severa (Park *et al.*, 2013; Döhner *et al.*, 2010; Consejo de Salubridad General., 2010). Con ello, del 40 al 90% de los pacientes tratados desarrollan lesiones bucales (LB), principalmente infecciones (virales y micóticas) y mucositis bucal (MB) (Morais *et al.*, 2014; Wong., 2014; Ramírez-Amador *et al.*, 2010; Ponce-Torres *et al.*, 2010).

La disfunción de la respuesta inmune innata y adaptativa ocasionada por la LA y la quimioterapia (QT) condiciona el desarrollo de estas LB, como la candidiasis bucal (CB) y la infección por el virus del herpes simple (IVHS) (Correia *et al.*, 2015; Haverman *et al.*, 2014; Lalla *et al.*, 2010). La CB es la infección por hongo más frecuente en los pacientes con LA, es producida principalmente por *Candida sp.*, microorganismo comensal de la cavidad bucal y afecta aproximadamente del 28% (Ramírez-Amador *et al.*, 2010) al 40% (Lalla *et al.*, 2010) de los individuos con LA y QT. Por su parte, la IVHS es causada por los virus del herpes simple tipos I y II, patógenos que después de la primoinfección se mantienen latentes en los ganglios nerviosos sensoriales, reactivándose en condiciones de inmunosupresión y ocasionando lesiones en la mucosa bucal (Kollias *et al.*, 2015; Grinde., 2013); su incidencia en pacientes bajo QT varía del 14% (Ramírez-Amador *et al.*, 2010) al 50%. (Elad *et al.*, 2010).

Mención aparte merece la mucositis bucal (MB), un complejo proceso patológico que afecta del 21% al 41% de los adultos con LA bajo tratamiento antineoplásico (Ramírez-Amador *et al.*, 2010; Ponce Torres *et al.*, 2010). En la MB se produce una respuesta inflamatoria

exacerbada que destruye queratinocitos y matriz extracelular de la mucosa bucal, con la consiguiente ulceración e infección (Jensen *et al.*, 2014; Al- Dasooqui *et al.*, 2013; Sonis., 2013).

En la patogénesis de las manifestaciones clínicas mencionadas, el proceso inflamatorio juega un rol fundamental (Haverman *et al.*, 2014). La inflamación es una respuesta del sistema inmune al daño causado a células y tejidos por cualquier agresor ya sea de naturaleza biológica, química, física y mecánica (Barreno., 2008). La respuesta inflamatoria está coordinada por las interleucinas (IL), moléculas solubles que transmiten información a sus células dianas sobre las condiciones del microambiente, con el fin de generar una respuesta específica como parte de una compleja red reguladora (Kupsa *et al.*, 2014).

Son escasos los estudios que evalúan la expresión de citocinas inflamatorias (salivales o plasmáticas) y su asociación con el desarrollo de LB en individuos con neoplasia malignas y QT (Ye *et al.*, 2013; Morales-Rojas *et al.*, 2012; Rüping *et al.*, 2011; Meirovitz *et al.*, 2010). Se han identificado niveles plasmáticos de IL-6, -8, -10 y TNF más elevados en los pacientes con LA y su asociación con el desarrollo y severidad de la MB (Ye *et al.*, 2013; Morales-Rojas *et al.*, 2012; Meirovitz *et al.*, 2010). En contraste, otro estudio realizado en adultos con linfoma Hodgkin y no Hodgkin (Rüping *et al.*, 2011) no han encontrado relación entre IL inflamatorias salivales y las LB desarrolladas durante el tratamiento antineoplásico.

Para la medición de la expresión de citocinas, la saliva representa un fluido muy valioso, al ser fácil de recoger y almacenar, sin el uso de procedimientos invasivos. El empleo de la saliva para identificar y evaluar biomarcadores es de gran valor en el estudio de la inmunidad y la

respuesta inflamatoria bucal. Lo anterior resulta de gran relevancia en la futura creación de programas de intervención que incluyan medidas preventivas, de diagnóstico y tratamiento precoz, que lleven a mejorar la calidad de vida de los pacientes que reciben QT.

En consecuencia, el objetivo del presente estudio fue determinar los cambios en la expresión de citocinas inflamatorias salivales (IL-1 α , -1 β , -2, -6, -10, -17 y TNF) en los pacientes con LA antes y durante la administración de QT de inducción y su posible asociación con el desarrollo de LB para la identificación blancos terapéuticos.

Materiales y métodos

Estudio de cohorte, observacional y analítico, realizado en colaboración entre la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), el Departamento de Hemato-Oncología del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) y el Departamento de Proteómica del Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con sede en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ). Se incluyeron pacientes mayores de 15 años, de ambos sexos, con diagnóstico reciente de LA, próximos a iniciar QT de inducción, sin tratamiento antineoplásico previo, que se encontraban hospitalizados en el INCan durante el período de diciembre de 2013 a septiembre de 2014. Se excluyó a los pacientes que antes del inicio de la QT presentaban infección por CB o IVHS, y a los pacientes candidatos a trasplante de células hematopoyéticas progenitoras, debido a que dicho tratamiento no es comparable en intensidad a los empleados habitualmente para la LA. El protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación de las instituciones participantes (número de proyecto 010/007/HEI) y cada individuo leyó y firmó un consentimiento informado de participación en el estudio.

Procedimientos clínicos. Una vez incluidos los pacientes y utilizando el expediente clínico, se registraron datos demográficos (edad y sexo), clínicos (tipo de LA, esquema de QT) y se preguntó a los pacientes sobre el consumo previo de tabaco, alcohol o toxicomanías de acuerdo a los criterios propuestos por la Secretaría de Salud. (Instituto Nacional de Salud Pública., 2008). Se realizó un breve examen bucal y se registró el índice de higiene oral simplificado (IHOS) (Greene y Vermillion., 1964).

Con base en estudios previos realizados en pacientes con LA (De Mendonca *et al.*, 2012; Ramírez-Amador *et al.*, 2010; Ramírez-Amador *et al.*, 1996; Lam *et al.*, 1981) que reportan el desarrollo de IVHS, CB y MB entre los 6 a 10 días luego del inicio del tratamiento antineoplásico, se establecieron tres períodos de observación, uno el día anterior al inicio de la QT de inducción, otro en el periodo comprendido entre los días 4 y 12 después del inicio de la QT y una tercera observación entre los días 13 y 21 después del inicio del tratamiento. En cada visita (0, 4-12 días y 13-21 días), se realizó un minucioso examen clínico de la mucosa bucal por tres especialistas previamente calibrados (VRA, GAS y JGZ) (Kappa= 0.87).

Para fines de la investigación y por la relevancia para el estudio de las citocinas, se registró la presencia de focos sépticos intrabucales, los cuales fueron definidos como un proceso inflamatorio con origen infeccioso (pericoronitis, absceso periodontal o absceso dental). La identificación de los focos sépticos se llevó a cabo mediante la inspección visual, reconociendo la presencia de eritema, edema, dolor y secreción purulenta.

Para el diagnóstico de CB, se tomó un frotis citológico que fue teñido con ácido peryódico de Schiff (PAS), estableciéndose como criterio diagnóstico la presencia de pseudohifas en fase de gemación y la respuesta favorable al tratamiento antimicótico (sistémico o tópico). Asimismo, el diagnóstico definitivo de IVHS se confirmó después de la observación de cambios citopáticos en los frotis citológicos teñidos con la tinción de Papanicolaou, más la respuesta al tratamiento.

La severidad de la MB fue determinada por medio de la escala de valoración de la mucositis bucal (OMAS) (Sonis *et al.*, 1999) y del sistema establecido por la Organización Mundial de

la Salud (OMS) para este fin (WHO., 1979). Estas lesiones recibieron un manejo tópico y sintomático de acuerdo al protocolo del INCAN (colutorios de una solución con caolín-pectina, difenhidramina, bencidamina y lidocaína al 2%, mezclados a volúmenes iguales, 3-4 veces por día) y se indicaron medidas de soporte nutricional como la ingesta de alimentos blandos; adicionalmente se reforzó la técnica de higiene bucal con un cepillo de cerdas suaves.

Para la evaluación de los síntomas (dolor bucal y al deglutir) asociados con el desarrollo de las LB, se pidió al paciente utilizar una escala análoga visual, que consistió en una línea horizontal que iba del 0 (cero) al diez (10). Asimismo, se le interrogó sobre su capacidad para ingerir alimentos sólidos y líquidos, por medio de una escala categórica. Las LB identificadas fueron registradas y fotografiadas.

En cada periodo de observación se tomaron muestras de saliva no estimulada, en el horario comprendido entre las 8:00 y las 9:00 am. Previo enjuague con agua, se indicó al paciente no tragar saliva, sentarse con la cabeza dirigida hacia delante y depositar la saliva producida (5 min.) en un frasco estéril de boca ancha, que fue almacenado a 4°C (Pramanik *et al.*, 2012).

Procedimientos de laboratorio. Las muestras de saliva fueron tratadas, en la Unidad de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", a temperatura ambiente, con 40 µl de una combinación de inhibidores de proteasa comercial, *Complete EDTA-free* (Roche Diagnostics. Indianápolis, United States). Las muestras fueron centrifugadas a 7'000 RCF durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se alicuotó y se congeló a -70°C para su posterior análisis. (Pramanik *et al.*, 2012).

Determinación de las citocinas inflamatorias en saliva. Para el estudio de la expresión de las citocinas seleccionadas (IL-1 α , -1 β , -2, -6, -10, -17 y TNF) se realizó el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), utilizando el kit *Magpix Multiplex Human Cytokine Magnetic bead*. (Millipore, Estados Unidos), en el laboratorio de la Unidad de Vinculación de la Facultad de Medicina de la UNAM en el Instituto Nacional de Medicina Genómica, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó el diagrama, se colocaron 200 μ l de buffer de lavado a 1x en la placa, sellando y agitando por 10 min, se decantó el residuo. En cada reacción y como control del experimento (pocillos A₁ al B₁), se utilizó un control negativo (25 μ l de solución amortiguadora sin citocinas) y dos positivos (concentración mínima y máxima de las IL seleccionadas), así como seis estándares con concentraciones seriadas de las citocinas, calculados de acuerdo a una curva de titulación (3.2 pg/dL, 16 pg/dL, 80 pg/dL, 400 pg/dL, 2,000 pg/dL y 10,000 pg/dL). Se añadió 25 μ l de assay buffer en los pocillos para las muestras, se colocaron 25 μ l de solución de matriz cultura de control a todos los pocillos con los estándares y controles, y se añadieron 25 μ l de cada muestra de saliva, en el resto de los pocillos, tomando al azar 33 muestras para realizar duplicados. Se llevaron al vórtex las perlas magnéticas a 1x por 1 segundo y se colocaron 25 μ l en cada pocillo, se selló la placa se cubrió con papel de aluminio y se incubó con agitación por 12 horas a 4°C. Posteriormente se repitió el lavado, se añadió 25 μ l del anticuerpo de detección, a 1x, en cada pocillo, se selló la placa, se cubrió con papel de aluminio y se incubó con agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se colocaron 25 μ l de Streptavidin-Phycoerythin a 10x en cada pocillo, se selló y cubrió con papel de aluminio y se incubó con agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se repitió el lavado y se colocaron 150 μ l de drive fluid. Los resultados fueron analizados con el *Luminex Magpix System* (Luminex

Co., Estados Unidos), un sistema que permite, analizar hasta 50 analitos, en un mismo momento, con poca cantidad de muestras y gran reproducibilidad.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se identificó la frecuencia de aparición de cada LB durante el seguimiento y se calculó la incidencia acumulada de IVHS, CB y MB. Se efectuó el análisis univariado entre la presencia de LB y las variables categóricas consideradas (edad, sexo, tipo de LA, IHOS, presencia de foco séptico en boca y hábitos de tabaquismo y alcohol) empleando la prueba de X^2 o la prueba exacta de Fisher, según fuera apropiado. Los niveles de IL durante el seguimiento y su asociación con la presencia de LB se analizaron por medio de la prueba de suma de rangos de Wilcoxon y la prueba de Kruskal-Wallis.

El análisis de sobrevida se efectuó a través de la construcción de curvas de Kaplan Meier y pruebas Log-rank, incluyendo 20 días de seguimiento. Asimismo, se realizó un análisis multivariado a través del modelo ajustado de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el riesgo entre los niveles altos ($\geq Q_3$) y bajos ($< Q_3$) de IL inflamatorias en saliva y el desarrollo de LB controlando por la edad, el sexo, el tipo de LA y la presencia de focos sépticos intrabucales. Se cumplieron con los supuestos del modelo y se buscaron interacciones, pero estas no fueron identificadas. Se empleó el paquete STATA V.12 (*Stata Corp LP, College Station TX, USA*); el nivel de significancia se estableció como $p < 0.05$.

Resultados.

En el presente estudio se incluyeron 41 pacientes, cuyas características clínicas y demográficas se muestran en el Cuadro 1. La mediana de edad fue de 29 (Q₁-Q₃: 21-42) años, 28 (68.3%) eran hombres. El tipo de LA más frecuente fue la leucemia linfoblástica aguda (LLA) afectando a 27 (65.9%) pacientes, el esquema Hiper-CVAD fue indicado en 17 (41.5%) individuos. La mayor parte de los pacientes negaron historia de consumo de tabaco (78.1%) o alcohol (63.4%), el 56.1% presentaban un índice de higiene bucal menor a 1, que representa una buena higiene bucal.

La mediana de días de seguimiento para el grupo de estudio fue de 21 (Q₁-Q₃:19-23.5) días. Durante el seguimiento 17 (41.5%) pacientes desarrollaron LB, siendo la lesión más frecuente la IVHS en nueve (21.9%) individuos, seguida de CB en siete (17.1%) y MB en cuatro (9.7%); en 14 pacientes las lesiones fueron únicas, en dos se presentó simultáneamente CB e IVHS y en uno la combinación de MB y CB. La Figura 1 muestra ejemplos representativos de las lesiones identificadas durante el seguimiento. La mediana de días transcurridos para el desarrollo de las LB fue de 13 (Q₁-Q₃: 7.5-16.5) días. Se observó una mayor frecuencia de manifestaciones bucales en pacientes del sexo femenino (9/13, 69.2%) que en el masculino (8/28, 28.6%) ($p= 0.019$). No se identificó asociación entre la presencia de LB y variables como edad, tipo de LA, IHOS, presencia de foco séptico en boca y hábitos de tabaquismo y alcohol.

La incidencia acumulada de IVHS fue de 21.9%, la mediana de días transcurridos para su desarrollo fue de 14 (Q₁-Q₃: 10.5-17.5) días, con una mediana de duración de 7 (Q₁-Q₃: 4.5-7)

días. La presentación más frecuente de IVHS fue la intrabucal, presentándose en cinco (12.2%) pacientes; en dos (4.9%) sujetos se presentó como herpes labial recurrente, y en dos (4.9%) ambos tipos.

Por otro lado, la incidencia acumulada de CB fue de 17.1%, la mediana de días para su desarrollo fue de 8 (Q₁-Q₃: 5.2-13.5) días y la mediana de duración fue de 3 (Q₁-Q₃: 2-3) días. La variedad de CB más común fue la pseudomembranosa, presentándose en cinco (12.2%) pacientes, dos sujetos (4.9%) desarrollaron la forma eritematosa.

Finalmente, la incidencia acumulada de MB fue de 9.7%, con un valor mediano para su desarrollo de 11 (Q₁-Q₃: 10-12) días, una mediana de duración de 6 (Q₁-Q₃: 5-8.5) días. Considerando el índice OMAS y la clasificación de la OMS, la severidad de la MB identificada fue moderada (OMAS: 2.1 ± 0.42 ; OMS: 2.5 ± 0.28). Los pacientes afectados presentaron eritema difuso y úlceras en la mucosa bucal, asociadas a dolor leve, los pacientes mantuvieron la capacidad para comer alimentos sólidos.

Catorce (34.1%) sujetos presentaron focos sépticos bucales, diez durante el seguimiento y cuatro antes del inicio de la QT. Durante el seguimiento, en el periodo entre los días 13 a 21 luego del inicio de la QT, dos personas fallecieron y cuatro fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos por complicaciones sistémicas, por lo que no fue posible realizar el examen clínico de la mucosa bucal y la toma de muestras de saliva. En consecuencia, en esta última visita, el grupo de estudio estuvo conformado por 35 individuos.

Como se describe en el Cuadro 2, en el análisis bivariado, todos los pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) presentaron mayores niveles basales en saliva de las citocinas

estudiadas que los pacientes con LLA, resultando estadísticamente significativa la diferencia en los valores de IL-1 β (p=0.023), IL-6 (p=0.026), IL-10 (p=0.027) e IL-17 (p=0.044).

En el Cuadro 3 se muestra la mediana de los niveles de IL salivales en los pacientes que desarrollaron LB y los que no las desarrollaron. Se observa que antes del inicio de la QT, los pacientes que desarrollaron IVHS, CB o MB tenían mayores concentración de IL-1 α (p=0.040) que quienes no desarrollaron lesiones. Asimismo, en los 4-12 días posteriores al inicio de la QT, los pacientes que desarrollaron manifestaciones bucales presentaron mayores niveles de IL-1 α (p=0.033), IL-1 β (p=0.016), IL-6 (p=0.035) y de TNF (p=0.019), en comparación de quienes no las desarrollaron. En los días 13-21 después del inicio del tratamiento, no se observó asociación estadísticamente significativa entre el desarrollo de LB y los niveles de IL-1 α , -1 β , -2, -6, -10, -17 y TNF.

El Cuadro 4 presenta los resultados del análisis multivariado en los 4 a 12 días posteriores al inicio la QT. En el modelo no ajustado se observó que los individuos del sexo masculino tienen menor probabilidad de desarrollar LB en un momento dado del seguimiento en comparación con el sexo femenino (HR no ajustado: 0.28, IC 95%: 0.10 - 0.73, p=0.009) y que los pacientes con niveles salivales altos de TNF, tienen mayor probabilidad de presentar IVHS, CB y MB en comparación con aquellos con valores bajos en un momento dado del seguimiento (HR no ajustado: 3.52, IC 95%: 1.35 - 9.14, p=0.010).

Posteriormente, al ajustar el modelo multivariado (riesgos proporcionales de Cox), controlando por edad, sexo, tipo de leucemia, y presencia de focos sépticos bucales, se mantuvo la asociación entre el desarrollo de LB y el sexo (HR: 0.24, IC 95%: 0.08 - 0.70,

$p=0.009$) y los niveles salivales altos de TNF (HR: 3.41, IC95%: 1.20 - 9.66, $p= 0.021$). Esto indica que los pacientes con altos niveles de TNF están teniendo tres veces más probabilidad de desarrollar LB que los pacientes con niveles bajos de TNF en un momento dado del seguimiento.

El análisis de sobrevida de Kaplan Meier (Figura 2), muestra una probabilidad de 52% de permanecer libre de LB a los 20 días de seguimiento. En el grupo con altos niveles de TNF, la probabilidad de permanecer libre de manifestaciones bucales fue de 10%, significativamente menor en comparación con el grupo con niveles más bajo de TNF (69%), ($p=0.010$) en el mismo tiempo de seguimiento.

Cuadro 1. Características demográficas y clínicas de los 41 pacientes con leucemia aguda

<i>Características</i>	<i>n (%)</i>
<i>Sexo</i>	
Masculino	28 (68.3)
Femenino	13 (31.7)
<i>Mediana de edad (Q₁-Q₃) años</i>	29 (21-42)
<i>Tipo de leucemia</i>	
Leucemia linfoblástica aguda	27 (65.9)
Leucemia mieloide aguda	13 (31.7)
Leucemia híbrida	1 (2.4)
<i>Esquema de quimioterapia</i>	
Hiper-CVAD ¹	17 (41.5)
7+3 ²	13 (31.7)
BMF-90 ³	9 (22.0)
EPOCH ⁴ & LARSON ⁵	2 (4.8)
<i>Consumo de tabaco</i>	
No	32 (78.1)
Si	9 (21.9)
<i>Consumo de alcohol</i>	
No	26 (63.4)
Si	15 (36.6)
<i>Índice de higiene oral*</i>	
<1	23 (56.1)
1 a 1.9	15 (36.6)
>2	3 (7.3)
<i>Foco séptico intrabucal</i>	
No	27 (65.9)
Si	14 (34.1)

¹Esquema Hiper-CVAD: Ciclofosfamida, Daunorubicina, Vincristina y Prednisona;

²Esquema7+3: Citarabina y Daunorubicina; ³BMF: Berlín- Frankfurt-Munste;

⁴EPOCH: Etoposido, Prednisona, Oncovin, Ciclofosfamida e Hidroxidaunomicina;

⁵LARSON: Ciclofosfamida, Daunorubicina, Vincristina, Prednisona y Asparaginasa.

*Greene y Vermillion, 1969.

Cuadro 2. Análisis bivariado de los niveles basales de interleucinas inflamatorias salivales en los 41 pacientes, de ac

	<i>Leucemia linfoblástica (n=27)</i>	<i>Leucemia mieloide^a (n=14)</i>	<i>P</i>
	<i>Mediana (Q₁-Q₃) pg/dL</i>	<i>Mediana (Q₁-Q₃) pg/dL</i>	
<i>Interleucina-1α</i>	1,195.5 (410-3,914)	1,321.2 (545-2,697)	0.9
<i>Interleucina-1β</i>	17.8 (7.6- 51.8)	52.3 (27.2-177)	0.0
<i>Interleucina-2</i>	1.9 (0.9- 9.1)	3.9 (0.9- 9.8)	0.5
<i>Interleucina-6</i>	3.8 (1.0- 10.5)	11.1 (3.9-71.2)	0.0
<i>Interleucina-10</i>	1.4 (1.1- 13.6)	7.5 (3.5- 45.3)	0.0
<i>Interleucina-17</i>	3.4 (1.4- 7.1)	5.8 (2.2-10.1)	0.0
<i>Factor de necrosis tumoral</i>	8.1 (2.9- 16.8)	15.9 (5.9-76.4)	0.0

^aPara el análisis, se incluyeron 13 pacientes con leucemia mieloide y un paciente con leucemia híbrida; ^bPrueba de suma de rangos de Wilcoxon y Kruskal- Wallis.

Cuadro 3. Niveles salivales de interleucinas inflamatorias durante el seguimiento y su asociación con el desarrollo (MB) en los 41 pacientes con leucemia aguda sometidos a quimioterapia de inducción.

	<i>Antes de la quimioterapia (n= 41)^a</i>		<i>4-12 días después de la quimioterapia (n=41)^a</i>		<i>13-21</i>
	<i>Mediana (Q₁-Q₃) pg/dL</i>	<i>P</i>	<i>Mediana (Q₁-Q₃) pg/dL</i>	<i>P</i>	<i>Mediana</i>
<i>Interleucina-1α</i>					
Con LB	1,746.1 (856-4,051)	0.040	2,389.9 (556-5,147)	0.033	835
Sin LB	600.7 (249-2,140)		750.0 (157-1,934)		1,614
<i>Interleucina-1β</i>					
Con LB	34.0 (19.5-180.9)	0.098	57.6 (20.3-258)	0.016	19
Sin LB	18.2 (5.7- 55.1)		10.1 (5.3-47.7)		12
<i>Interleucina-2</i>					
Con LB	4.0 (1.4- 12.5)	0.108	0.9 (0.8-11.6)	0.550	3
Sin LB	1.4 (0.9 - 7.1)		2.1 (0.9- 7.3)		3
<i>Interleucina-6</i>					
Con LB	8.8 (3.8- 20.9)	0.213	18.0 (4.0-153)	0.035	10
Sin LB	3.9 (1.1- 12.4)		5.8 (2.6-15.8)		11
<i>Interleucina-10</i>					
Con LB	4.6 (1.0- 15.8)	0.730	8.7 (3.0-23.2)	0.228	11
Sin LB	3.4 (1.0- 14.6)		5.1 (1.0-15.3)		8
<i>Interleucina-17</i>					
Con LB	5.5 (2.7 - 7.8)	0.181	3.7 (1.6- 8.9)	0.534	4
Sin LB	3.3 (1.0 - 7.3)		3.6 (1.4- 6.5)		4
<i>Factor de necrosis tumoral</i>					
Con LB	11.7 (6.9- 26.1)	0.118	36.1 (10.1-71.0)	0.019	13
Sin LB	7.7 (2.5- 18.0)		7.3 (3.4- 17.2)		10

^aDe los 41 pacientes, 17 desarrollaron LB y 24 no durante el seguimiento; ^bDe los 35 pacientes, 11 desarrollaron LB durante el seguimiento y 24 no (dos murieron y cuatro fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos). La prueba empleada fue la de suma de rangos de Wilcoxon y Kruskal-Wallis (K-W). LB: Leucemia bucal; CB: Candidiasis bucal, IVHS: Infección por el virus del herpes simple, MB: Mucositis bucal.

Cuadro 4. Análisis multivariado de los niveles salivales de interleucinas inflamatorias y el desarrollo de lesiones bucales (CB, IVHS y MB) durante el seguimiento (4-12días después de la quimioterapia)

		Lesiones bucales					
<i>Modelo</i>	<i>Variables</i>	No ajustado			Ajustado		
		<i>Hazard ratio</i>	<i>(IC 95%)</i>	<i>P¹</i>	<i>Hazard ratio²</i>	<i>(IC 95%)</i>	<i>P¹</i>
1	Edad	1.01	(0.97-1.04)	0.522	-----	-----	-----
	Sexo	0.28	(0.10-0.73)	0.009	0.29	(0.11-0.78)	0.015
	Tipo de leucemia aguda	0.65	(0.23-1.86)	0.429	-----	-----	-----
	Foco séptico	1.38	(0.53-3.58)	0.506	-----	-----	-----
	Interleucina-1 α	1.98	(0.75-5.21)	0.165	1.42	(0.49-4.11)	0.517
2	Sexo	-----	-----	-----	0.26	(0.09-0.70)	0.008
	Interleucina-1 β	1.02	(0.35-2.90)	0.967	0.64	(0.20-2.08)	0.466
3	Sexo	-----	-----	-----	0.25	(0.95-0.69)	0.008
	Interleucina-2	1.15	(0.40-3.28)	0.782	1.54	(0.46-5.17)	0.479
4	Sexo	-----	-----	-----	0.22	(0.78-0.63)	0.005
	Interleucina-6	1.78	(0.66-4.83)	0.253	2.35	(0.71-7.82)	0.161
5	Sexo	-----	-----	-----	0.29	(0.11-0.77)	0.013
	Interleucina-10	2.09	(0.77-5.66)	0.146	1.99	(0.65-6.08)	0.222
6	Sexo	-----	-----	-----	0.27	(0.10-0.72)	0.009
	Interleucina-17	1.51	(0.56-4.10)	0.412	1.54	(0.49-4.80)	0.455
7	Sexo	-----	-----	-----	0.24	(0.08- 0.70)	0.009
	Factor de necrosis tumoral	3.52	(1.35-9.14)	0.010	3.41	(1.20-9.66)	0.021

IC 95%: Intervalo de confianza al 95%. ¹La P fue calculada con el modelo ajustado de riesgos proporcionales de Cox; ²Todos los modelos fueron ajustados por la edad, el tipo de leucemia aguda y la presencia de focos sépticos. CB: Candidiasis bucal, IVHS: Infección por el virus del herpes simple, MB: mucositis bucal.

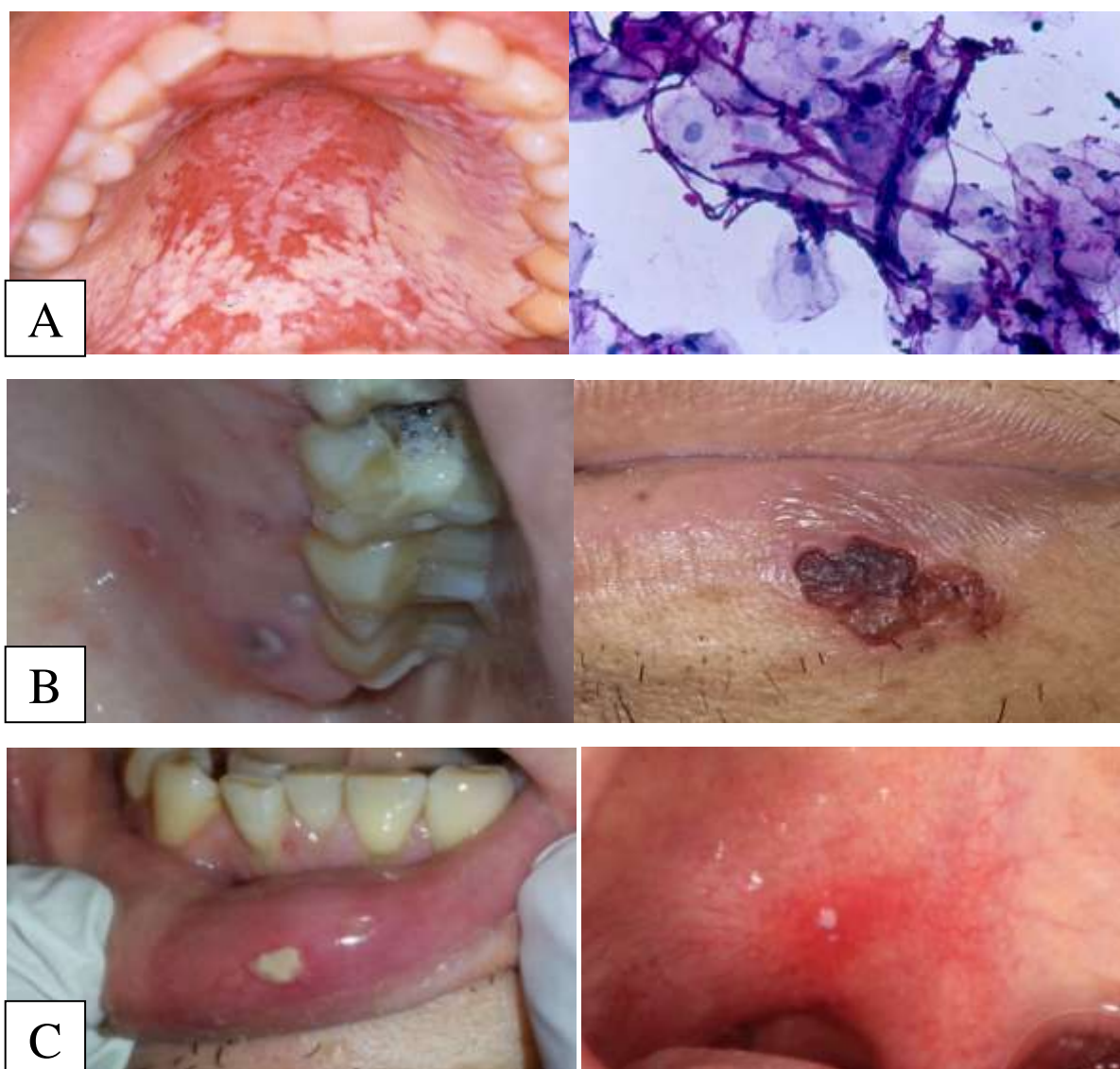


Figura1. Lesiones bucales desarrolladas durante la QT en los 41 pacientes con LA. A) Paciente femenina de 18 años de edad, con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, tratada con Hiper-CVAD. Desarrolló candidiasis pseudomembranosa en paladar duro, se indicó fluconazol 100 mg. diarios, vía oral. Confirmación del diagnóstico de infección por *Candida sp.* con coloración de PAS B) Paciente masculino de 49 años de edad, con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, tratado con Hiper-CVAD. Desarrolló herpes intrabucal en paladar duro y labial recurrente, se indicó Aciclovir 100 mg. Intravenoso C) Paciente masculino de 46 años de edad, con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda, tratado con Hiper-CVAD. Desarrolló mucositis bucal en labio inferior y paladar blando. Índice OMAS de 3 y OMS de 2. Se indicó enjuagues, 3 a 4 veces al día de una solución con caolín-pectina, difenhidramina, bencidamina y lidocaína al 2%, mezclados a volúmenes iguales.

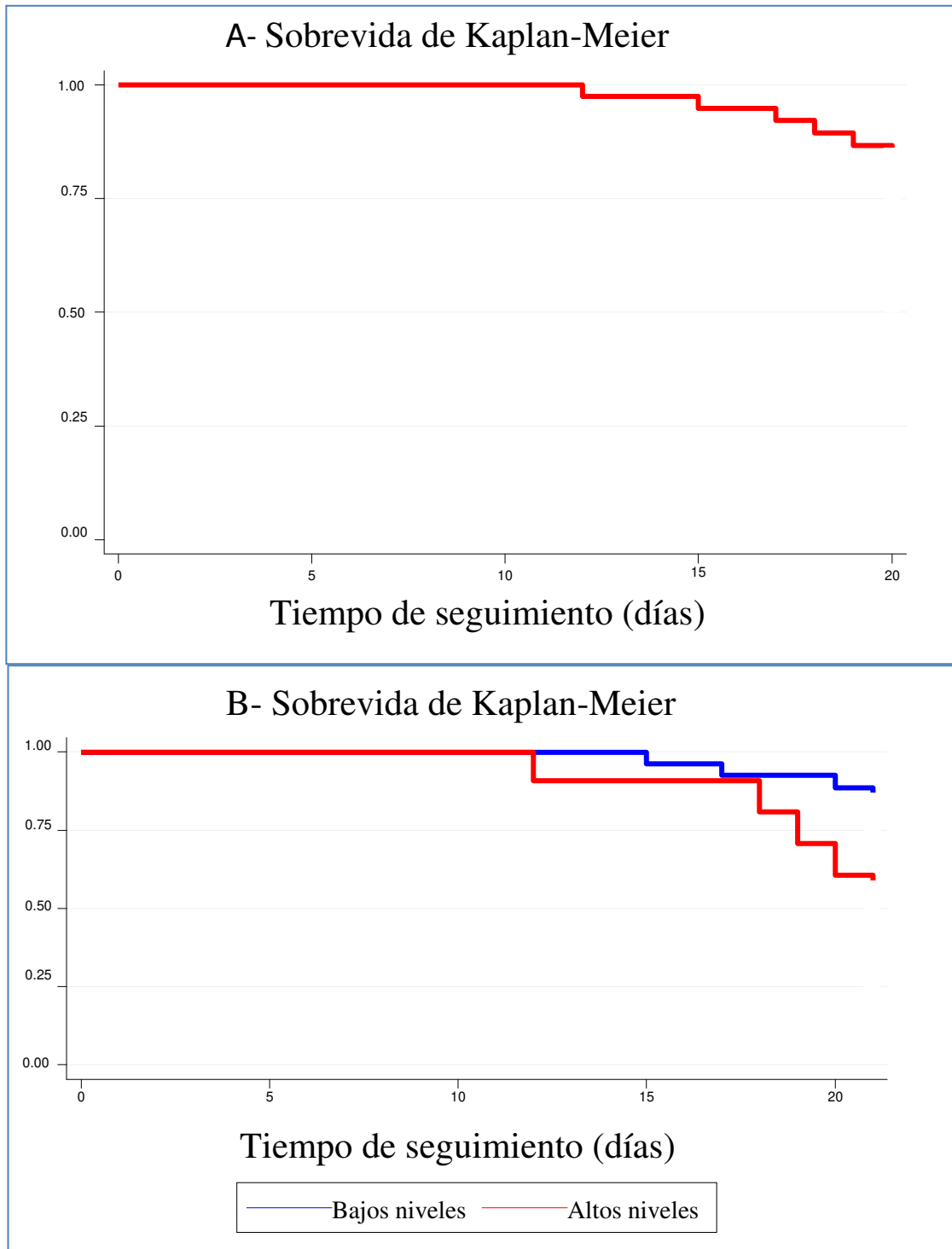


Figura 2. Análisis de sobrevida de Kaplan Meier para el desarrollo de lesiones bucales en los 41 pacientes con leucemia aguda. A) La probabilidad de permanecer libre de lesión bucal fue de 52%, a los 20 días de seguimiento B) La probabilidad de permanecer libre de lesión bucal en los pacientes con altos niveles salivales de TNF fue de 10%, a los 20 días de seguimiento.

Discusión

El presente trabajo representa uno de los pocos estudios en los que se utiliza la saliva para medir niveles de IL en pacientes con LA y QT. Los pacientes que desarrollaron LB presentaron mayores niveles basales de IL-1 α salival y altas concentraciones en saliva de IL-1 α , -1 β , -6 y TNF a los 4-12 días post-quimioterapia, en comparación con el grupo sin LB. Adicionalmente, los pacientes con niveles elevados de TNF presentaron un riesgo tres veces mayor de desarrollar LB que quienes presentaron niveles bajos.

El tipo de leucemia que se presentó con mayor frecuencia fue la LLA; comparable con los datos reportados en México (LLA: 1.3/100,000 hab., LMA: 0.7/100,000 hab.) (Solis., 2010). El Hiper-CVAD fue el tratamiento de elección en casi la mitad de los pacientes y 22% fueron tratados con un esquema de QT, el BMF-90, tratamiento reducido con menor toxicidad y efectos adversos que el convencional (Schrappe *et al.*, 2000).

De los pacientes con LA incluidos, más de la mitad eran hombres, con una mediana de edad de 29 años. Lo anterior coincide con la incidencia reportada por sexo a nivel mundial de la leucemia (3.2/100,000 hab. en hombres y 2.5/100,000 hab. en mujeres) (GLOBOCAN., 2012); en comparación con nuestro país, donde la incidencia reportada de LA es similar en hombres y mujeres (2.3/100,000 hab. en hombres y 2.2/100,000 hab. en mujeres) (GLOBOCAN., 2012). Con relación a la edad, la mediana de los pacientes con LMA y LLA fue de 44 y 27 años respectivamente, resultados similares a estudios realizados en población adulta mexicana donde la mediana de edad de los individuos con leucemia mieloide fue de 44 años (Buitron-Santiago *et al.*, 2010) y de la linfocítica de 27 años (Arteaga-Ortiz *et al.*, 2008). A nivel mundial, la leucemia linfoblástica es más frecuente en adultos después de los 50 años, mientras que la

incidencia de la leucemia mieloide es mayor después de los 65 años de edad (Ferlay *et al.*, 2015; Consejo de Salubridad General., 2010).

Si bien en nuestro país la prevalencia de tabaquismo y etilismo en el grupo de edad estudiado es relativamente alta (29% y 51.4% respectivamente) (ENSANUT., 2012; CONADIC., 2011), la mayor parte de los participantes en este estudio negaron consumo de tabaco y alcohol (78 y 63%). Asimismo, casi el total de los pacientes (92.7%) presentaron buena o adecuada higiene bucal, debido probablemente a que se encontraban en un servicio hospitalario de tercer nivel, que procura la atención dental de los pacientes próximos a iniciar tratamiento antineoplásico.

La prevalencia puntual de LB en el presente estudio fue del 41.5%, similar al 46.9% reportado por Dreizen *et al* (Dreizen *et al.*, 1986) en una población adulta con LA y QT. Sin embargo, otros estudios muestran frecuencias más elevadas, como el 74% (Ramírez-Amador *et al.*, 1996) encontrado en pacientes con linfoma no-Hodgkin, LA y crónica, que iniciaron QT y el 89% observado en pacientes con LA y QT (Barret *et al.*, 1987).

En nuestro estudio, el análisis estadístico mostró que las mujeres tienen mayor probabilidad de desarrollar LB que los hombres, hallazgos similares a otros trabajos (Hespanhol *et al.*, 2010; Vokurka *et al.*, 2006; Chansky *et al.*, 2005) que han encontrado mayor frecuencia de MB y CB en el sexo femenino. En contraste, en general no se ha encontrado asociación entre el sexo y la presencia de LB (Ramírez-Amador *et al.*, 2010; Ramírez-Amador *et al.*, 1996; MacCarthy *et al.*, 1998; Epstein *et al.*, 1992)

La lesión bucal más común fue la IVHS (21.9%), comparable al 28% informado en un estudio previo (Ramírez-Amador *et al.*, 1996) y mayor a lo observado en otras investigaciones en

donde las cifras varían del 8% (Dreizen *et al.*, 1986) al 14% (Ramírez-Amador *et al.*, 2010). Otros estudios han reportado reactivación del virus del herpes simple en 39% (Barrett *et al.*, 1987) y 50% (Rüping *et al.*, 2011) de los pacientes con LA durante la QT. En pacientes con LA, se han encontrado hasta 82% de seroprevalencia de VHS-1 antes del inicio de QT (Mahyoun *et al.*, 2010), lo que pudiera explicar las altas frecuencias de reactivación encontradas en este estudio.

La CB se presentó en el 17% de los pacientes, cifra similar a las encontradas en estudios previos 19.9% (Dreizen *et al.*, 1986) y 22% (Ramírez-Amador *et al.*, 1996); en un trabajo realizado en individuos con LA y QT se ha encontrado una frecuencia ligeramente más alta, 27% (Ramírez-Amador *et al.*, 2010), mientras que otro estudio en población adulta con neoplasias hematológicas malignas mostró una frecuencia de 50% (Hespanhol *et al.*, 2010).

En comparación con trabajos previos que reportan incidencias de MB del 19.4% (Dreizen *et al.*, 1986) al 41.4% (Ramírez-Amador *et al.*, 2010), la frecuencia de MB observada en nuestro estudio fue del 9.7%. La menor frecuencia de aparición de esta entidad pudiera explicarse parcialmente por la disminución en años recientes, en el uso y dosis de medicamentos citotóxicos como la antraciclina, citarabina y metotrexato en el esquema de QT BMF-90 (Al-Dassoqui *et al.*, 2013 Otami *et al.*, 2011; Schrappe *et al.*, 2000), que se utilizó en el 22% de los participantes del estudio.

Un resultado interesante del presente estudio fue que los pacientes con LMA presentaron niveles salivales de citocinas mayores que los pacientes con LLA. Si bien estudios previos no encontraron diferencias en los niveles plasmáticos de IL-17 de pacientes con LLA y LMA

(Abousamra *et al.*, 2013), o entre IL-1 β , -2, -6 y TNF entre pacientes con LA y controles sanos (Horacek *et al.*, 2013), un estudio reciente informa concentraciones más elevadas de IL-6 en pacientes con LMA que en individuos sanos (Horacek *et al.*, 2013). Se ha sugerido que los mieloblastos tienen mayor capacidad de producir citocinas inflamatorias, particularmente IL-1 β , -2, -6 y TNF (Kupsa *et al.*, 2014), lo que podría explicar su mayor expresión en los pacientes con LMA; sin embargo el aumento de IL-17 y -10 se relaciona a una mayor actividad inmune antitumoral (Winkler *et al.*, 2015; Abousamra *et al.*, 2013). El aumento encontrado en los niveles salivales de citocinas en los sujetos con LMA amerita estudios futuros.

Los individuos que desarrollaron LB, tenían niveles salivales basales de IL-1 α significativamente más altos que el grupo sin LB. Es interesante comentar que en un estudio en población infantil con leucemia linfoblástica (Morales-Rojas *et al.*, 2012), se han reportado valores basales elevados de IL-6, -10 y TNF en los pacientes que desarrollaron MB comparados con controles sin LA; cabe mencionar que el trabajo citado mostró que la expresión de las IL en saliva y plasma sanguíneo tienen un comportamiento comparable (Morales-Rojas *et al.*, 2012). Un estudio reciente (Ye *et al.*, 2013) en niños con LA, identificó la alta concentración plasmática de citocinas inflamatorias (IL-6, -8, -10 y TNF) como factor de riesgo para el desarrollo de MB. En estudios futuros se podría investigar si la presencia de *Candida sp.* como microorganismo comensal es suficiente para estimular la secreción de IL-1 α , debido a que la producción de esta citocina por parte de los queratinocitos es directamente proporcional a la cantidad de esporas fúngicas en el epitelio de la mucosa bucal y a la mayor

colonización por *Candida sp.* reportada en los sujetos con LA (Naglik *et al.*, 2011; Alberth *et al.*, 2006; Blylevens *et al.*, 2002).

Un hallazgo importante fue el aumento de los niveles salivales de IL-1 α , -1 β , -6 y TNF, entre los 4 y los 12 días posteriores al inicio de la QT, fase en la que además, se desarrolló el mayor número de LB (IVHS, MB y CB, a los 14, 11 y 8 días, respectivamente). Son escasos los estudios que han asociado los niveles de IL con el desarrollo de LB en pacientes con LA y QT y la mayor parte se han dirigido al estudio de la MB. En una población pediátrica con LA y QT, se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración en saliva y plasma sanguíneo de IL-6 y TNF (12 y 96 horas después de QT) en los pacientes que desarrollaron MB (Morales-Rojas *et al.*, 2012). Adicionalmente, en pacientes con cáncer de cabeza y cuello sometidos a QT y radioterapia, los niveles plasmáticos de IL-6 altos se asociaron con la severidad de la MB ($p < 0.022$) (Meirovitz *et al.*, 2010).

La concordancia entre el incremento de los niveles salivales de citocinas con el periodo de desarrollo de la LB, pudiera deberse en parte a la capacidad que tienen los queratinocitos bucales de comportarse como células del linaje mieloide, ante la IVHS y la CB, secretando grandes cantidades de IL-1 α , citocina que tiene efecto autócrino sobre el epitelio, estimulando la secreción de IL-1 β , -6 y TNF (Milora *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Naglik *et al.*, 2011; Moyes *et al.*, 2011; Weindl *et al.*, 2010). La IL-1 α también permite el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos al sitio de la infección y la liberación por parte de estos leucocitos de mayores cantidades de estas IL (IL-1 β , -6 y TNF). (Milora *et al.*, 2015; Hung *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012; Naglik *et al.*, 2011; Moyes *et al.*, 2011; Villar *et al.*, 2005). Adicionalmente, en la IVHS se ha comprobado la formación de complejos inmunes con

grupos de neutrófilos y mastocitos que liberan grandes cantidades de TNF (Aoki *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2012). Durante el desarrollo de la MB, a los 2-3 días después de iniciada la QT (fase de transcripción) se producen IL-1 β , -6 y TNF, niveles que aumentan a los 3-5 días posteriores (fase de amplificación), debido a un proceso de retroalimentación positivo en donde estas IL estimulan la secreción de TNF y una mayor migración de neutrófilos y macrófagos (Jensen *et al.*, 2014; Al-Dasooqui *et al.*, 2013; Sonis., 2013).

Uno de los principales hallazgos del estudio fue la mayor probabilidad de desarrollar LB en pacientes con altos niveles de TNF salival, que pudiera ser el resultado de la respuesta inmune innata para controlar el desarrollo de infecciones bucales (IVHS y CB). El TNF tiene un papel importante en la migración y activación de neutrófilos y macrófagos, como medio de potencialización de la capacidad antifúngica de la mucosa bucal, en la inhibición de la replicación viral y en la apoptosis de células infectadas. (Aoki *et al.*, 2013; Egan *et al.*, 2013; Ohta *et al.*, 2007; Filler *et al.*, 2005; Netea *et al.*, 1999)

En conclusión, los resultados del presente estudio, pudieran sugerir que a pesar de la inmunosupresión presente en los pacientes con LA, existe cierta activación de la respuesta inmune innata, que en el caso particular del TNF, representa un potencial marcador del desarrollo de LB. Igualmente el grupo de estudio presento una alta incidencia de lesiones bucales infecciosas (IVHS y CB) y una baja frecuencia de MB durante el seguimiento.

Entre las limitaciones de este estudio se encuentra el reducido número de pacientes que presentaron MB durante el seguimiento, lo cual limitó el análisis del perfil de citocinas inflamatorias en estos sujetos; asimismo, dentro del panel de IL analizadas no se encontraba la

IL-8, citocina secretada tempranamente por los queratinocitos de la mucosa bucal ante la presencia de una infección bucal al igual que la IL-1 α y que pudiera tener algún papel predictor.

La metodología utilizada en este trabajo para la recolección de la saliva, su conservación y la determinación de citocinas mostró hallazgos confiables y adecuados, por lo que podrá ser un referente para la realización de estudios en este tema. Investigaciones futuras pudieran considerar la relación entre los niveles de IL-1 α y la colonización con *Candida sp.* como posible predictor del desarrollo de CB, así como la evaluación de la utilidad de los niveles de IL-1, -6 y TNF como posibles blancos terapéuticos en la MB.

Referencias bibliográficas.

- Abousamra NK, Salah El-Din M, Helal R (2013). Prognostic value of Th17 cells in acute leukemia. *Med Oncol* 30(4):732-738.
- Alberth M, Majoros L, Kovalecz G, *et al* (2006). Significance of oral Candida infections in children with cancer. *Pathol Oncol Res* 12(4):237-241.
- Al-Dasooqi N, Sonis ST, Bowen JM, *et al* (2013). Emerging evidence on the pathobiology of mucositis. *Support Care Cancer* 21(11):3233-3241.
- Aoki R, Kawamura T, Goshima F, *et al* (2013). Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF- α and IL-6 production. *J Invest Dermatol* 133(9):2170-2179.
- Arteaga-Ortiz L, Buitron-Santiago N, Rosas-López A, *et al* (2008). Experiencia del INCMNSZ en pacientes adultos con leucemia linfocítica aguda. Cohorte 2003-2007 con esquema de tratamiento Hiper-CVAD y Protocolo 0195. *Rev Invest Clin* 60(6):459-469.
- Barreno P (2008). Inflamación. *Rev R Acad Cien Exact Fis Nat* 102:91-159.
- Barrett AP (1987). A long-term prospective clinical study of oral complications during conventional chemotherapy for acute leukemia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 63(3):313-316.
- Blijlevens NM, Donnelly JP, de Pauw BE (2002). Impaired gut function as risk factor for invasive candidiasis in neutropenic patients. *Br J Haematol* 117(2):259-264.
- Buitron-Santiago N, Arteaga-Ortiz L; Rosas-López A, Aguayo A; López-Karpovitch X, Crespo-Solís E (2010). Experiencia del INCMNSZ en pacientes adultos con leucemia mieloide aguda. Cohorte 2003-2008. *Rev Invest Clin* 62(2):100-108.
- Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS (2005). Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer* 103(6):1165-1171.
- CONADIC. Encuesta Nacional de adicciones. Secretaria de Salud. Gobierno Federal. <http://www.conadic.salud.gob.mx>. Consultado 7 Julio 2015.
- Consejo de Salubridad General. Gobierno Federal de México. Diagnóstico y tratamiento de la leucemia mieloide aguda. Evidencias y recomendaciones. Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica. IMSS-276-10. <http://www.cenetec.salud.gob.mx>. Consultado 10 Enero 2015.
- Correia AV, Coêlho MR, de Oliveira Mendes Cahú GG, de Almeida Silva JL, da Mota Vasconcelos Brasil C, de Castro JF (2015). Seroprevalence of HSV-1/2 and correlation with aggravation of oral mucositis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region submitted to antineoplastic treatment. *Support Care Cancer* 23(7):2105-2111.
- De Mendonça RM, De Araújo M, Levy CE, *et al* (2012). Prospective evaluation of HSV, Candida spp., and oral bacteria on the severity of oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Support Care Cancer* 20(5):1101-1107.
- Döhner H, Estey EH, Amadori S, *et al* (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European. *Leukemia Net Blood* 115(3):453-474.
- Dreizen S, McCredie KB, Bodey GP, Keating MJ (1986). Quantitative analysis of the oral complications of antileukemia chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 62(6):650-653.

- Egan KP, Wu S, Wigdahl B, Jennings SR (2013). Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol* 19(4):328-345.
- Elad S, Zadik Y, Hewson I, *et al* (2010). A systematic review of viral infections associated with oral involvement in cancer patients: a spotlight on Herpesviridae. *Support Care Cancer* 18(8):993-1006.
- ENSANUT. Encuesta nacional de salud y Nutrición. Evidencia para la política pública en salud. <http://ensanut.nsp.mx>. Consultado 7 Julio 2015.
- Epstein JB, Vickars L, Spinelli J, Reece D (1992). Efficacy of chlorhexidine and nystatin rinses in prevention of oral complications in leukemia and bone marrow transplantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73(6):682-689.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al* (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*. 136 (5):359-386.
- Filler SG, Yeaman MR (2005). Sheppard DC. Tumor necrosis factor inhibition and invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 41(3):208-212.
- GLOBOCAN. International Agency for Research on Cancer (IARC). Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr/>. Consultado 7 Julio 2015.
- Greene JC, Vermillion JR (1964). The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* 68:244-248.
- Grinde B (2015). Herpesviruses: latency and reactivation-viral strategies and host response. *J Oral Microbiol* 5:2276-2280.
- Haverman TM, Raber-Durlacher JE, Rademacher WM, *et al* (2014). Oral complications in hematopoietic stem cell recipients: the role of inflammation. *Mediators Inflamm*. doi: 10.1155/2014/378281.
- Hespanhol FL, Tinoco EM, Teixeira HG, Falabella ME, Assis NM (2010). Buccal manifestations in patients submitted to chemotherapy. *Cien Saude Colet* 15(1):1085-1094.
- Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L, Zak P (2014). Biochip array technology and evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Exp Oncol* 36(1):50-51.
- Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L, Zak P (2013). Evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia using biochip array technology. *Exp Oncol* 35(3):229-230.
- Hung SL, Chiang HH, Wu CY, Hsu MJ, Chen YT (2012). Effects of herpes simplex virus type 1 infection on immune functions of human neutrophils. *J Periodontal Res* 47(5):635-644.
- Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. (2008). Encuesta Nacional de Adicciones. Primera Edición.
- Jensen SB, Peterson DE (2014). Oral mucosal injury caused by cancer therapies: current management and new frontiers in research. *J Oral Pathol Med* 43(2):81-90.
- Kollias CM, Huneke RB, Wigdahl B, Jennings SR (2015). Animal models of herpes simplex virus immunity and pathogenesis. *J Neurovirol* 21(1):8-23.
- Kupsa T, Vasatova M, Karesova I, Zak P, Horacek JM (2014). Baseline serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with acute myeloid leukemia: results of a pivotal trial. *Exp Oncol* 36(4):252-257.

- Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, *et al* (2010). A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer* 18(8):985-992.
- Lam MT, Pazin GJ, Armstrong JA, Ho M (1981). Herpes simplex infection in acute myelogenous leukemia and other hematologic malignancies: a prospective study. *Cancer* 48(10):2168-2171.
- McCarthy GM, Awde JD, Ghandi H, Vincent M, Kocha WI (1998). Risk factors associated with mucositis in cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Oral Oncol* 34(6):484-490.
- Mahjour SB, Ghaffarpasand F, Fattahi MJ, Ghaderi A, Fotouhi-Ghiam A, Karimi M (2010). Seroprevalence of human herpes simplex, hepatitis B and epstein-barr viruses in children with acute lymphoblastic leukemia in southern iran. *Pathol Oncol Res* 16(4):579-582.
- Meirovitz A, Kuten M, Billan S, *et al* (2010). Cytokines levels, severity of acute mucositis and the need of PEG tube installation during chemo-radiation for head and neck cancer--a prospective pilot study. *Radiat Oncol* 5:16-23.
- Milora KA, Miller SL, Sanmiguel JC, Jensen LE (2014). Interleukin-1 α released from HSV-1-infected keratinocytes acts as a functional alarmin in the skin. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms6230.
- Morais EF, Lira JA, Macedo RA, Santos KS, Elias CT, Morais Mde L (2014). Oral manifestations resulting from chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Braz J Otorhinolaryngol* 80(1):78-85.
- Morales-Rojas T, Viera N, Morón-Medina A, Alvarez CJ, Alvarez A (2012). Proinflammatory cytokines during the initial phase of oral mucositis in patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Int J Paediatr Dent* 22(3):191-196.
- Moyes DL, Naglik JR (2011). Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol.* doi:10.1155/2011/346307.
- Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* 13(12-13):963-976.
- Netea MG, van Tits LJ, Curfs JH, *et al* (1999). Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* 163(3):1498-1505.
- Ohta H, Tanimoto T, Taniai M, *et al* (2007). Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by tumor necrosis factor-alpha and potential for treatment of oral candidiasis. *In Vivo* 21(1):25-32.
- Otmani N, Alami R, Hessissen L, Mokhtari A, Soulaymani A, Khattab M (2011). Determinants of severe oral mucositis in paediatric cancer patients: a prospective study. *Int J Paediatr Dent* 21(3):210-216.
- Park SH, Chi HS, Cho YU, Jang S, Park CJ (2013). Evaluation of prognostic factors in patients with therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood Res* 48(3):185-192.
- Ponce-Torres E, Ruíz-Rodríguez Mdel S, Alejo-González F, Hernández-Sierra JF, Pozos-Guillén Ade J (2010). Oral manifestations in pediatric patients receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Pediatr Dent* 34(3):275-279.
- Pramanik R, Thompson H, Kistler JO, Wade WG, Galloway J, Peakman T (2012). Proctor GB. Effects of the UK Biobank collection protocol on potential biomarkers in saliva. *Int J Epidemiol* 41(6):1786-1797.

- Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Crespo-Solís E, Camacho EI, González-Ramírez I, Ponce-de-León S (2010). Prospective evaluation of oral mucositis in acute leukemia patients receiving chemotherapy. *Support Care Cancer* 18(5):639-646.
- Ramírez-Amador V, Esquivel-Pedraza L, Mohar A, *et al* (1996). Chemotherapy-associated oral mucosal lesions in patients with leukaemia or lymphoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32(5):322-327.
- Rüping MJ, Keulertz C, Vehreschild JJ, *et al* (2011). Association of HSV reactivation and pro-inflammatory cytokine levels with the severity of stomatitis after BEAM chemotherapy and autologous SCT. *Support Care Cancer* 19(8):1211-1216.
- Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, *et al* (2000). Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. *Leukemia* 14(12):2205-2222.
- Solis E (2010). Epidemiología de las leucemias agudas. *Rev Hematol Mex* 11(1):37-39.
- Sonis ST (2013). Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013. doi: 10.1200/EdBook_AM.2013.33.e236.
- Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, *et al* (1999). Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. Mucositis Study Group. *Cancer* 85(10):2103-2113.
- Villar CC, Kashleva H, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A (2005). Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection. *Infect Immun* 73(8):4588-4595.
- Vokurka S, Bystrická E, Koza V, *et al* (2006). Higher incidence of chemotherapy induced oral mucositis in females: a supplement of multivariate analysis to a randomized multicentre study. *Support Care Cancer* 14(9):974-976.
- Wang K, Ni L, Wang S, Zheng C (2014). Herpes simplex virus 1 protein kinase US3 hyperphosphorylates p65/RelA and dampens NF-κB activation. *J Virol* 88(14):7941-7951
- Weindl G, Schaller M (2010) Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res*. 89(7):666-675.
- Winkler B, Taschik J, Haubitz I, Eyrich M, Schlegel PG, Wiegering A (2015). VTGFβ and IL10 have an impact on risk group and prognosis in childhood ALL. *Pediatr Blood Cancer* 62(1):72-79.
- Wong HM (2014). Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. *ScientificWorld Journal*. doi: 10.1155/2014/581795.
- World Health Organization (1979). WHO Handbook for reporting results of cancer treatment. Geneva, Switzerland: World Health Organization. 1979; 15-22.
- Ye Y, Carlsson G, Agholme MB, *et al* (2013). Pretherapeutic plasma pro- and anti-inflammatory mediators are related to high risk of oral mucositis in pediatric patients with acute leukemia: a prospective cohort study. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0064918.
- Zheng M, Conrady CD, Ward JM, Bryant-Hudson KM, Carr DJ (2012). Comparison of the host immune response to herpes simplex virus 1 (HSV-1) and HSV-2 at two different mucosal sites. *J Virol* 86(13):7454-7458.