



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA

**RELAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA E INFECÇÕES
FÚNGICAS ORAIS**

2019

ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA

RELAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA E INFECÇÕES FÚNGICAS ORAIS

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Microbiologia/Imunologia. Linha de pesquisa: Doenças infecciosas de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Cunha, Eliana Tomomi Shimabukuro Da
Relação entre Esclerose Múltipla e infecções fúngicas orais / Eliana Tomomi Shimabukuro Da Cunha. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
47 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.
Orientador: Juliana Campos Junqueira.

1. Esclerose Múltipla. 2. Doença desmielinizante. 3. Candida spp. I. Junqueira, Juliana Campos, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Juliana Campos Junqueira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. João Manoel Theotônio dos Santos

Universidade Anhembi Morumbi

Faculdade de Medicina

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 21 de Novembro de 2019

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Harushige Shimabukuro (*in memorian*) e minha mãe Turue Shimabukuro, exemplos de garra e perseverança na busca dos sonhos, pela dedicação e por toda abdicação de suas vidas aos filhos.

À minha irmã Lilian e ao meu irmão Ricardo por estarem sempre presentes.

À família e queridos amigos pelo apoio e carinho.

À Silvia Márcia da Silva por toda sua dedicação e suporte em todos os momentos.

Ao Marcos Pimentel da Cunha e Rafael Shimabukuro da Cunha, pelo apoio diário, incentivo e amor, e por fazerem a minha vida perfeita.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Juliana Campos Junqueira pela amizade, oportunidade de grande aprendizado e conquista, minha eterna gratidão e admiração pelo seu belo trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Ciências e Tecnologia, Campus de São José dos Campos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira e a todos os colegas do curso.

Às colegas da pós-graduação, Lívia Mara Alves Figueiredo e Patrícia Pimentel de Barros pelo companheirismo e auxílio nesta conquista.

À Santa Casa de Misericórdia de São Paulo por permitir a realização deste estudo.

Ao Dr. Charles Peter Tilbery, com grande admiração por seu exemplo de vida e dedicação aos pacientes.

À toda equipe do CATEM, queridos amigos e colegas que durante todos estes anos contribuíram no meu aprendizado.

Aos pacientes e acompanhantes pela colaboração e seus ensinamentos de vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 PROPOSIÇÃO.....	15
2.1 Objetivos gerais.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Participantes do estudo.....	16
3.2 Critérios de seleção dos participantes.....	17
3.3 Coleta de dados clínicos dos pacientes.....	17
3.4 Coleta e processamento de amostras para pesquisa de <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal.....	17
3.5 Identificação das espécies de <i>Candida</i> isoladas.....	18
3.6 Análise dos resultados.....	20
4 RESULTADOS.....	21
4.1 Dados dos participantes.....	21
4.2 Prevalência de <i>Candida</i> spp. na cavidade bucal.....	22
4.3 Quantificação de Unidades Formadoras de colônias na cavidade bucal dos indivíduos portadores do gênero <i>Candida</i>	23
4.4 Identificação das espécies presentes na cavidade bucal dos indivíduos portadores do gênero <i>Candida</i>	24
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICE A - Aprovação do Comitê de Ética.....	42
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	45
APÊNDICE C - Autorização do Centro de Atendimento e Tratamento de Esclerose Múltipla (CATEM) da Irmandade de Santa Casa de São Paulo.....	46
APÊNDICE D - Escala Expandida do Estado de Incapacidade.....	47

Cunha ETS. Relação entre Esclerose Múltipla e infecções fúngicas orais [Dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciências e Tecnologia; 2019.

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória, autoimune, crônica e desmielinizante que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC). Sua etiologia ainda não é bem definida, mas vários fatores de risco podem estar associados à doença, incluindo fatores genéticos e ambientais. Recentemente, tem sido sugerido que a microbiota do indivíduo pode ter influência na EM. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi investigar a relação entre EM e infecções fúngicas orais. Foram selecionados 100 indivíduos, sendo 55 com diagnóstico de EM pelos Critérios de McDonald (2017) e 45 indivíduos saudáveis (grupo controle). Amostras de saliva foram coletadas e semeadas em meios de culturas seletivos para o gênero *Candida*, incluindo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e CHROMagar *Candida*. Após período de incubação de 48 horas, foi realizada a contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL), e as colônias isoladas foram submetidas à análise de PCR multiplex para identificação da espécie de *Candida*. Os resultados foram analisados pelos testes estatísticos de Qui-quadrado e Mann-Whitney, considerando-se nível de significância de 5%. Foi verificada presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de 50,09% dos pacientes do grupo EM e de 35,55% dos indivíduos do grupo controle. Nos indivíduos com crescimento positivo para *Candida* spp., a mediana do número de colônias de *Candida* observadas foi de 220 UFC/mL para o grupo EM e 120 UFC/mL para o grupo controle. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tanto para a prevalência como contagem de UFC/mL. Em relação a identificação das espécies de *Candida*, foi encontrado 73,91% de *C. albicans*, 21,73% de *C. glabrata*, 2,17% de *C. tropicalis* e 2,17% de *C. krusei*. Concluiu-se que a presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de indivíduos com EM foi mais elevada em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Doença desmielinizante. *Candida* spp.

Cunha ETS. *Relationship between Multiple Sclerosis and oral fungal infections. [Dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.*

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory, autoimmune, chronic and demyelinating disease that affects the Central Nervous System (CNS). Its etiology is not yet well defined, but several risk factors may be associated with the disease, including genetic and environmental factors. Recently, it has been suggested that the individual's microbiota may have influence on MS. Therefore, the objective of this study was to investigate the relationship between MS and oral fungal infections. A total of 100 individuals were selected, 55 of them diagnosed with MS by the McDonald Criteria (2017) and 45 healthy individuals (control group). Saliva samples were collected and seeded in culture medias selectives for the Candida genus, including Sabouraud Dextrose agar with chloramphenicol and CHROMagar Candida. After incubation period of 48 hours, the number of Colony Forming Units (CFU / mL) was counted and the colonies were isolated for identification of the Candida species by multiplex PCR. The results were analyzed by Chi-square and Mann-Whitney statistical tests considering a significant level of 5%. It was verified the presence of Candida spp. in the oral cavity of 50.09% of the patients in the MS group and 35.55% of the individuals in the control group. In individuals with positive growth for Candida spp., the median of Candida colonies observed was 220 CFU/mL for the MS group and 120 CFU/mL for the control group. However, no statistically significant differences were observed between the groups for both prevalence and CFU/mL count. In relation to the identifications of Candida species, it was found 73.91% of C. albicans, 21.73% of C. glabrata, 2.17% of C. tropicalis and 2.17% of C. krusei. It was concluded that the presence of Candida spp. in the oral cavity of individuals with MS was higher than the control group.

Key words: Multiple sclerosis. Demyelinating disease. Candida spp.

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória, crônica e desmielinizante, de etiologia autoimune que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) (Milo, Miller, 2014). A doença é uma das causas mais comuns de incapacidade neurológica em adultos jovens (Karussis, 2014; Kingwell et al., 2013). Cerca de 2 milhões de indivíduos no mundo são portadores dessa doença (Kingwell et al., 2013; Steinman, 2014). Estudos epidemiológicos mostram que a EM afeta principalmente indivíduos, com idade média inicial de 30 anos, variando principalmente entre os 20 e 50 anos, embora a doença possa desenvolver-se tanto na infância como após os 60 anos. A prevalência em mulheres é aproximadamente três vezes maior em relação aos homens (Milo, Miller, 2014).

A distribuição da EM pelo mundo vem sendo estudada em vários países, sendo observado uma maior prevalência em regiões de altas latitudes (Thompson, 2018). Historicamente, Kurtzke em 1975, dividiu a prevalência de EM no mundo em três zonas: alta, média e baixa. Foram considerados região de alta prevalência, uma média de 30-80 indivíduos por 100.000 habitantes, como Europa, sul do Canadá, norte dos Estados Unidos, Nova Zelândia e parte da Austrália. Em região de média prevalência, foram atribuídos entre 5-25 indivíduos por 100.000 habitantes, observados no sul da Europa, no sul dos Estados Unidos e parte da Austrália. E em região de baixa prevalência, uma taxa inferior a 5 indivíduos por 100.000 habitantes.

Após este período, crescentes taxas de prevalência tem sido observadas em algumas regiões do mundo, como no Canadá (Ebers, 2008), sendo proposto então uma nova escala de prevalência global da doença. Nessa escala seriam incluídas zonas de prevalência muito alta, para regiões com taxas entre 150 a 350 indivíduos com EM por 100.000 habitantes, dentre elas, Canadá, Noruega, Suécia, Escócia e Irlanda, zonas de prevalência alta, com taxas entre 70 a 170 indivíduos com EM por 100.000 habitantes, zonas de prevalência média, com taxas entre 38 a 70 indivíduos com EM por 100.000 habitantes, zonas de baixa prevalência, com taxas entre 13 a 38 indivíduos com EM por 100.000 habitantes e, por fim, zonas com áreas de prevalência muito baixa, onde as taxas de prevalência variam entre 13 a 0 de incidência por 100.000 habitantes, como Malásia, Tailândia e a maioria dos países

africanos (Wade, 2014). Ainda faltam dados em grandes populações como China e Índia (Thompson, 2018).

Em análises de estudos recentes, a Europa concentra uma maior prevalência nas regiões norte do Reino Unido e nos países nórdicos, onde a distribuição tem características de influência pelas altas latitudes. Existe uma escassez relativa de informações e estudos na Europa Central e Oriental. A taxa de incidência em mulheres foi observada em toda a Europa (Kingwell, 2013).

A doença é mais rara entre samis, turcomenos, uzbeques, cazaques, quirguizes, siberianos nativos, ameríndios do norte e sul, chineses, japoneses, negros africanos e maioria da Nova Zelândia (Pugliatti, 2002; Rosati, 2001).

Em algumas regiões no mundo, outros fatores parecem influenciar no desenvolvimento da EM, como regiões da Palestina, Sicília e Sardenha, regiões próximas a linha do Equador por apresentarem uma alta prevalência da doença (Pugliatti, 2002; Milo, 2010). Regiões com a mesma altitude como Norte do México apresentam uma menor prevalência da doença em contraste ao Sul do Texas, nos Estados Unidos, onde a incidência é alta, também evidenciam outros fatores determinantes para o risco de EM (Correale, 2017). Essa distribuição geográfica desigual da doença sugere susceptibilidade étnica dos grupos estudados (Rosati, 2001).

No Brasil, estudos mostram uma maior prevalência nas regiões Sul e Sudeste, onde ocorrem uma maior concentração de brancos, conforme padrão de ocupação étnica do país, observou-se uma taxa de 27,2 indivíduos com EM por 100.000 habitantes (Da Gama, 2015), sendo o perfil clínico e demográfico semelhantes ao de regiões de alta prevalência (Vasconcelos, 2016).

As manifestações clínicas da EM ocorrem devido as áreas de inflamação e desmielinização, podendo ocasionar comprometimento motor, visual, distúrbios sensoriais, autonômicos vesicais ou intestinais (Steinman, 2014; Reich et al., 2018). Os sintomas podem durar dias ou semanas, seguidos de remissão, e às vezes, com deficiência residual (Steinman, 2014) ou permanente, de acordo com a forma da doença (Lublin et al., 2014). O sinal de Lhermitte, descrito como sensação de perturbação precipitada por movimento da coluna vertebral e radiação para seu restante, devido ao surgimento de lesões medulares, também pode ocorrer (Khanchandani, Howe, 1982). Outra manifestação clínica que pode ser observada é

o Fenômeno de Uhthoff, caracterizado por uma piora dos sintomas sequelares a um determinado surto de forma transitória, desencadeada por aumento da temperatura corpórea (Compston, Coles, 2008). Cerca de 15% dos pacientes podem desenvolver, após cerca de 10 a 20 anos, um curso clínico progressivo (Reich et al., 2018).

A doença foi classificada em 1996, por especialistas da Sociedade de Esclerose Múltipla Norte-Americana, de acordo com sua característica clínica, em quatro formas: remitente-recorrente (EMRR), primariamente progressiva (EMPP), secundariamente progressiva (EMSP) e progressiva recidivante (EMPR) (Lublin, 1996). A forma EMRR é a mais comum, em que as manifestações clínicas surgem de forma subaguda, em surtos, decorrentes a desmielinização, seguidos por remissão completa ou incompleta dos sintomas. A EMPP é caracterizada por uma piora gradual e contínua desde o início da doença, sem manifestações de surtos definidos. Corresponde cerca de 15% dos casos. A forma EMSP se inicia como a forma remitente-recorrente e após alguns anos, ocorre uma mudança da evolução, apresentando uma piora progressiva dos sintomas. A forma EMPR caracteriza-se pelo sintomas progressivos combinados a sintomas de recaídas (Lublin, 1996).

Uma nova proposta surgiu em 2013, coordenada pelo Comitê Europeu em conjunto ao Comitê de Especialistas do *US National Multiple Sclerosis Society*, após revisão das formas de Lublin em 1996, considerando-se uma classificação dos pacientes de acordo com o curso clínico por fenótipos recidivantes (EMR) e progressivos (EMP) (Lublin et al., 2014). Os fenótipos recidivantes podem ser classificados como ativos, quando manifestam alterações radiológicas em Ressonância Magnética (RM) (novas lesões ou com impregnação por gadolínio) ou surtos clínicos. Os fenótipos progressivos, EMPP e EMSP podem ser classificados como: ativos e com progressão, ativos e sem progressão, não ativos e com progressão, não ativos e sem progressão (doença estável).

Além destas formas, há também a Síndrome Clínica Isolada (CIS), representada por uma condição em que o paciente tem apenas uma manifestação clínica isolada da doença, com características de desmielinização, em exame de imagem, mas que não preenche os critérios para a doença. A Síndrome Radiológica

Isolada (RIS) também foi descrita como achados incidentais em RM porém sem sinais e sintomas clínicos (Lublin et al., 2014).

Além do exame de imagem, o acompanhamento da atividade de doença e progressão é realizado por uma avaliação baseada na Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke (EDSS - *Kurtzke Expanded Disability Status Scale*) (Kurtzke, 1984), na qual são analisados e pontuados os sistemas funcionais como motor, sensitivo, cerebelar, visual, esfinteriano, tronco encefálico e cognitivo. Indivíduos que permanecem sem surtos, sem progressão em exame de RM, sem progressão na escala EDSS e sem sinais de atrofia cerebral, são considerados como Sem Evidência de Atividade de Doença (NEDA - *No Evidence Disease Activity*) (Kappos et al., 2016).

Para o diagnóstico da EM, diferentes critérios foram estabelecidos ao longo do tempo. Os primeiros critérios de diagnósticos foram organizados por Schumacher em 1965 (Schumacher et al., 1965), e somente em 1983, esses foram substituídos pelos critérios de Poser (Poser et al., 1983). Os critérios de Poser foram importantes, pois ratificaram o conceito de surto da doença, caracterizada por sintoma neurológico persistente por mais de 24 horas, necessidade de disseminação no tempo (DIT), com sintomas neurológicos evidentes em períodos distintos, e disseminação no espaço pela doença, com acometimento de diferentes topografias do SNC, sendo mantidos nos demais critérios subsequentes. Após o advento da RM, critérios para caracterização das lesões desmielinizantes foram formulados por Barkhof e em seguida modificados por Tintore, passando a ser denominados de Critérios de Barkhof-Tintoré em 2000 (Tintoré et al., 2000).

Em 2000, após reconhecimento da sensibilidade da RM para lesões desmielinizantes, foi criado o Painel Internacional sobre o diagnóstico da EM, liderados por Willian Ian McDonald e por especialistas da Federação das Sociedades Internacionais de Esclerose Múltipla e da Sociedade Nacional Americana de Esclerose Múltipla. Em 2001, a RM passou a ter importância para os critérios de diagnóstico, sendo incorporada aos critérios de McDonald (McDonald et al., 2001). As lesões na RM podem apresentar-se como lesões perivenulares, ovoides, justacorticais e infratentoriais, sendo em regiões medulares com extensão menor que três corpos vertebrais e localizados em regiões póstero-laterais (Thompson et al., 2018).

Atualmente, o diagnóstico da EM baseia-se nos Critérios de McDonald revisados em 2017 (Thompson et al., 2018; De Angelis et al., 2018), nos quais a disseminação no tempo e espaço, considerando-se os achados clínicos, imagens de RM e análise do líquido, são necessários para caracterizar a doença, bem como ausência de melhores explicações para a apresentação do paciente (Sand, 2015). Os indivíduos com EM apresentam uma variedade de sinais e sintomas de acordo com os locais de acometimento de SNC conforme descritos anteriormente. Sintomas como alterações de sensibilidade, déficits motores, ataxia, distúrbios visuais, como neurite óptica ou diplopias, disfunções esfinterianas, distúrbios da marcha e cognição, são os mais frequentes (Lublin et al., 2014). O surgimento de alguma nova manifestação clínica, com duração igual ou maior que 24 horas, assim como novas lesões em RM ou lesão com impregnação de agente paramagnético gadolínio, caracterizam atividade de doença (Maciel et al., 2016).

Sabe-se que na EM, fatores ambientais, infecções virais ou ainda superantígenos podem estar associados à ativação do sistema imunológico em indivíduos geneticamente susceptíveis, desencadeando assim a doença. Em estudos histopatológicos foram observados danos na mielina por infiltrados de fagócitos mononucleares, linfócitos T, linfócitos B, células plasmáticas e células dendríticas que expressam moléculas de MHC de classe II (Hemmer, et al, 2015). Existe uma interação entre as imunidade inata, fagócitos mononucleares, como micróglia e macrófagos e a imunidade adaptativa, que são os linfócitos B e T. O mecanismo inicia-se com uma reação imune celular mediada pelas células T ativadas fora do SNC, no sangue periférico e nos gânglios linfáticos, quando em contato com um antígeno externo (Maciel et al., 2016). A ativação dos linfócitos T leva a sua expansão clonal e produção de citocinas, selectinas, integrinas como VLA-4 e LFA-1 e moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1 na superfície do endotélio vascular (Maciel et al., 2016).

No sistema nervoso central (SNC), as células TCD4⁺ reconhecem os antígenos, pelo complexo MHC II, que são apresentados pelas células da micróglia e macrófagos, sendo então ativados. Ocorre liberação de citocinas, prostaglandinas, radicais livres e óxido nítrico que atuam no estresse oxidativo da célula. De acordo com a citocina, a célula T CD4⁺ pode assumir fenótipos: Th1, Th2, Th17 e T reguladores. As células Th1 e Th17 liberam produtos pró-inflamatórios, como IL-2,

TNF, IFN- γ , TGF- β , IL-12, IL-16, IL-17, IL-22, IL-23 e IL-27 (Maciel et al., 2016). As células TCD8⁺ reconhecem antígenos apresentados pelas moléculas do complexo MHC I, expressas em todas as células nucleadas, incluindo oligodendrócitos, astrócitos e neurônios. Ocorre também ativação de Linfócitos B pelas células CD4⁺, e destes, produção de anticorpos que em conjunto às citocinas, radicais livres, óxido nítrico, levam a ativação de macrófagos. Os linfócitos CD8⁺ destroem a bainha de mielina e axônios (Maciel et al., 2016). Os Th2 e linfócitos T reguladores são responsáveis pela produção de citocinas inibitórias da resposta imunológica.

A etiologia da EM tem sido muito discutida, sendo provável que esteja relacionada com a interação entre vários fatores genéticos e ambientais (Amato et al. 2017). Hemmer et al. (2015) descreveram vários genes que parecem contribuir para o risco de doença, incluindo alelos HLA de classe DRB1*1501, DRB1*0301 e DRB1*1303. Segundo Mielcarz e Kasper (2015), HLA DRB1*1501 e DQ6, parecem ser os genes mais comuns em pacientes com EM.

Embora os genes tenham um papel importante na EM, a taxa de concordância entre 15 a 25% em gêmeos monozigóticos, sugere que os fatores não genéticos influenciem no desenvolvimento da doença (Hemmer et al., 2015). Para Ramagopalan et al. (2010) entre os fatores não genéticos estão: o estilo de vida, deficiência de vitamina D3, tabagismo, obesidade no início da vida e infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), principalmente quando este ocorre na fase adulta. Todos esses aumentam cerca de três vezes a chance de desenvolvimento da EM (Thompson et al., 2018).

Atualmente, vem crescendo evidências no envolvimento da microbiota intestinal no desenvolvimento de um estado pró-inflamatório da EM (Adamczyk-Sowa et al., 2017). Alterações da microbiota podem levar a respostas imunológicas anormais. Existem diferenças entre a microbiota de indivíduos saudáveis e indivíduos com EM, nos quais foram observados uma redução de *Parabacterioides* e *Prevotella*, ambas do Phylum Bacteroidetes, e de *Adlercreutzia* e *Erysipelatrichaceae* (Budhram et al., 2017).

Além disso, trabalhos recentes na literatura têm demonstrado uma correlação da infecção fúngica por *Candida albicans* com a progressão da EM (Saroukolaei et al. 2016, Fraga-Silva et al. 2015). *C. albicans* é um patógeno oportunista que pode causar lesões de candidíases superficiais e recorrentes nas

mucosas, como também infecções sistêmicas potencialmente fatais (Mayer et al. 2013). *C. albicans* é a espécie mais isolada do gênero *Candida*, mas outras espécies também apresentam grande importância médica, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, entre outras (Junqueira et al. 2012). Essas espécies de *Candida* podem ser encontradas na cavidade bucal como microrganismos comensais, podendo tornar-se patogênicas na presença de fatores predisponentes, como imunossupressão, tratamento prolongado com antibióticos e uso de próteses parciais ou totais (Costa et al. 2012).

Tem sido sugerido que algumas toxinas liberadas por fungos, por meio da corrente sanguínea, podem atingir os astrócitos do SNC, que são células importantes para controle da integridade da barreira hematoencefálica e dos oligodendrócitos. Por consequência, ocorre degradação da mielina e ao mesmo tempo, a ativação da resposta imunológica levando a progressão da EM (Purzycki e Shain, 2010). Estes fungos podem colonizar tecidos não neurais, como mucosas, e secretarem gliotoxinas, ocasionando danos ao SNC (Pisa et al., 2011).

Até o momento, a correlação entre infecções por *Candida* e EM foi pouco estudada. Entretanto, as evidências da relação da EM com infecções microbianas, somadas aos dados encontrados nos estudos prévios de Saroukolaei et al. (2016) Fraga-Silva et al. (2015), instigam o desenvolvimento de pesquisas da influência de *Candida* spp. nessa doença. Assim, no presente projeto de pesquisa foi investigado uma possível correlação da colonização de *Candida* spp. na cavidade bucal com a EM.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo investigar uma possível relação entre EM e infecções fúngicas orais.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a colonização da cavidade bucal por *Candida* spp. de pacientes com EM, e comparar com um grupo controle de indivíduos saudáveis;
- b) identificar as espécies de *Candida* isoladas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Participantes do estudo

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Instituto de Ciência e Tecnologia/Unesp (Apêndice A). Após informação sobre a pesquisa, indivíduos com EM e indivíduos sem a doença que concordaram em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B).

Para realização desse trabalho foram realizadas coletas de amostras de saliva de indivíduos atendidos no Centro de Atendimento e Tratamento de Esclerose Múltipla (CATEM) da Irmandade da Santa Casa de São Paulo, com autorização prévia desta Instituição (Apêndice C).

Foram selecionados no total 100 indivíduos, com idades entre 18 e 68 anos, que aceitaram participar da pesquisa, sendo 55 deles com diagnóstico de EM conforme os Critérios de McDonald (2017) e 45 saudáveis. Os indivíduos selecionados com EM, foram pacientes em seguimento pelos médicos especializados no tratamento desta doença e os indivíduos saudáveis foram familiares e/ou acompanhantes dos pacientes do CATEM, abordados durante a consulta médica ambulatorial. As coletas de saliva foram realizadas no período de 15/03/2019 a 30/08/2019 (6 meses).

Esse trabalho não ofereceu riscos aos participantes, uma vez que foram coletadas amostras de saliva não estimulada, ou seja, sem necessidade de um estímulo externo. Pode ter gerado apenas um desconforto durante a coleta, uma vez que foi realizada em consultório clínico na presença do pesquisador. Não existem benefícios diretos para os pacientes, mas os resultados dessa pesquisa poderão trazer benefícios indiretos por estabelecer uma relação da EM e infecções fúngicas orais.

3.2 Critérios de seleção dos participantes

Os critérios de inclusão para o grupo experimental foram pacientes com diagnóstico de EM segundo Critérios de McDonald de 2017, e para o grupo controle, foram indivíduos sem EM com idades correspondentes aos pacientes do grupo controle. Os critérios de não inclusão para os grupos experimental e controle incluíram: uso de corticóides, antibióticos e/ou de antifúngicos nos últimos 3 meses, tabagismo, uso de prótese dentária e gestação.

O critério de exclusão de um participante do estudo, foi a impossibilidade de realização de todos os testes finais devido ao insucesso na reconvocação do mesmo.

3.3 Coleta de dados clínicos dos pacientes

Foram coletados dados como idade, sexo, tempo de doença, presença ou não de atividade de doença, presença ou não de progressão de doença, grau de incapacidade conforme a Escala Expandida do Estado de Incapacidade Funcional (EDSS) (Apêndice D), uso ou não de medicações para tratamento da EM e tempo de tratamento.

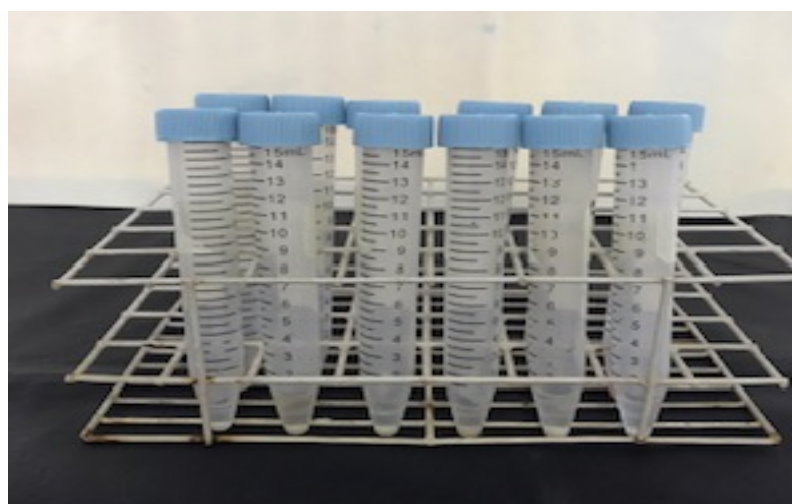
3.4 Coleta e processamento de amostras para pesquisa de *Candida* spp. na cavidade bucal

Para todos os participantes do estudo, foi realizada uma única coleta de saliva não estimulada entre 8 e 11 horas da manhã, seguindo metodologia proposta por Chouhan et al. (2019). Os participantes foram orientados a expelir a saliva acumulada na boca em pote coletor universal estéril por alguns minutos, até completar o volume de aproximadamente 2 mL de saliva. Após a coleta, o material foi acondicionado em uma bolsa térmica com gelo e transportado até o laboratório

de Microbiologia e Imunologia Bucal do ICT/UNESP, com um intervalo máximo de 3 horas para o transporte.

No laboratório, a saliva coletada de cada indivíduo foi transferida à tubos Falcon esterilizados e então centrifugada a 2300xg por 10 minutos (Figura 1). Após o descarte do sobrenadante, alíquotas de 10 μ L do pellet foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (Difco, Detroit, EUA) e CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, França) em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas e em seguida, realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Figura 1 - Tubos Falcon contendo as salivas coletadas após centrifugação



Fonte: Elaborada pelo autor

3.5 Identificação das espécies de *Candida* isoladas

Inicialmente, foram realizadas as triagens e identificações presuntivas baseada na cor das colônias em CHROMagar (Quadro 1). A seguir, algumas colônias isoladas das placas de Sabouraud e CHROMagar foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud Dextrose Inclinado (Difco, Detroit, EUA) para isolamento das cepas e obtenção da cultura pura. Esses tubos foram

incubados a 37°C durante 48 horas e depois armazenados a -80°C em estoques congelados em caldo Sabouraud acrescido de glicerol.

Quadro 1 - Identificação presuntiva das espécies de *Candida* em CHROMagar de acordo com o fabricante

Espécies	Características das colônias
<i>Candida albicans</i>	Colônias verde-claro a verde médio
<i>Candida tropicalis</i>	Colônias azul cobalto ou lilás
<i>Candida krusei</i>	Colônias rosadas
<i>Candida glabrata</i>	Colônias bege – creme

Fonte: Chouhan et al., 2019; Sahand et al. 2005

Os isolados foram então identificados por análise molecular, conforme metodologia descrita a seguir. Para extração do DNA, suspensões em caldo YPD (Difco, Detroit, EUA) foram preparadas e incubadas por 18h. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3,000 xg por 10 min e o sedimento lavado com PBS por 3 vezes. O sedimento obtido foi ressuspensão em 300 µL do tampão de lise contendo 50 mM EDTA e 75 unidades/µL de Lyticase (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em um microtubo de 1,5 mL, e posteriormente, incubado a 37°C por 1h. O DNA cromossômico foi extraído pelo Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™ Corporation, Madison, EUA) conforme recomendações do fabricante e sua quantificação realizada no espectrofotômetro Nanodrop (ND-800, Thermo Scientific, Waltham, EUA).

O método de PCR utilizado para a identificação das espécies de *Candida* foi baseado no protocolo descrito por Chen et al (2000). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 10 a 20 ng de DNA, 10mM Tris HCl pH 8,3/50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,8 mM de desoxirribonucleotídeo, 0,3 µL de cada iniciador (10 µM/µL) e 1U de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) no termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). As condições para a realização deste PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 5

min, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 s, anelamento de 62°C por 45 s, extensão de 72°C por 1 min e extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 1,5% em TBE, corados com 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA) e visualizados em um transiluminador UV (DyNA Light, LABNET, EUA).

Os iniciadores utilizados foram construídos por Chen et al. (2000) baseado na região ITS2 com primers universais complementares a região do RNA ribossomal da levedura. São eles: ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Os ensaios de PCR geraram produtos de amplificação de 340 pb para *C. albicans*, 414 pb para *C. glabrata*, 345 pb para *C. krusei* e de 328 pb para *C. tropicalis*. Em todos os ensaios foram utilizados DNA molde das cepas de *C. albicans* ATCC18804, *C. glabrata* ATCC90030, *C. krusei* ATCC6258 e *C. tropicalis* ATCC13803 como controles positivos e um controle negativo, sem adição de DNA molde.

3.6 Análise dos resultados

Após a coleta e preparo da saliva dos 100 indivíduos, os grupos EM e controle foram comparados pela presença (ou ausência) de *Candida spp.* na cavidade bucal pelo teste de Qui-quadrado. Para análise da contagem de UFC/mL de *Candida* os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. Em todos os testes foi considerado nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Dados dos participantes

Participaram desse estudo 100 voluntários, sendo 55 do grupo com EM e 45 do grupo controle. Entre os 55 pacientes com EM, a média de idade foi 39 anos, sendo 45 do sexo feminino e 10 do sexo masculino. Dos 45 participantes do grupo controle, a média de idade foi 42 anos, sendo que 23 eram do sexo feminino e 22 do sexo masculino (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição do sexo e idade dos participantes do estudo nos grupos Esclerose Múltipla e controle

Grupo	Sexo	Número de participantes (%)	Idade
Grupo Esclerose Múltipla (n=55)	Feminino	45 (82%)	18 a 62 anos
	Masculino	10 (18%)	20 a 42 anos
Grupo Controle (n=45)	Feminino	23 (51%)	18 a 66 anos
	Masculino	22 (49%)	18 a 68 anos

No grupo com EM, verificou-se entre os 55 participantes no momento da coleta de saliva, os seguintes dados de relevância clínica: presença de surto da doença em 6 pacientes (11%), doença progressiva em 10 pacientes (18%) e NEDA em 39 pacientes (71%).

Observou-se também que 46 pacientes (84%) estavam em tratamento com medicação para EM e 9 pacientes (16%) sem medicação. Além disso, o tempo de diagnóstico da doença nos pacientes com EM (n=55), foi de 0 a 9 anos para 37 pacientes (67%) e mais de 10 anos para 18 pacientes (33%).

4.2 Prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal

Em relação a prevalência de *Candida* spp., verificou-se que a taxa de indivíduos portadores de *Candida* spp. na cavidade bucal foi de 50,90% para o grupo EM e 35,55% para o grupo controle (Figura 2), entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 2).

Figura 2 - Percentual de participantes portadores de *Candida* spp. na cavidade bucal para os grupos Esclerose Múltipla (n=55) e controle (n=45)

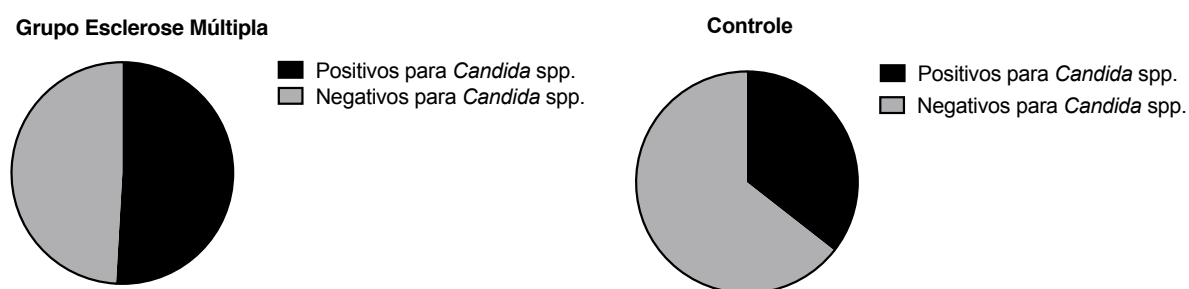


Tabela 2 - Número de participantes com culturas positivas e negativas para o gênero *Candida* na cavidade bucal nos grupos com Esclerose Múltipla (n=55) e controle (n=45)

Grupos de estudo	Portadores de <i>Candida</i> spp.	
	Positivos	Negativos
Esclerose Múltipla	28	27
Controle	16	29

Teste de Qui-quadrado, $p=0,118$. Não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se intervalo de confiança de 95%.

No grupo com EM, verificou-se que os pacientes positivos para *Candida* apresentavam os seguintes dados demonstrados na Tabela 3.

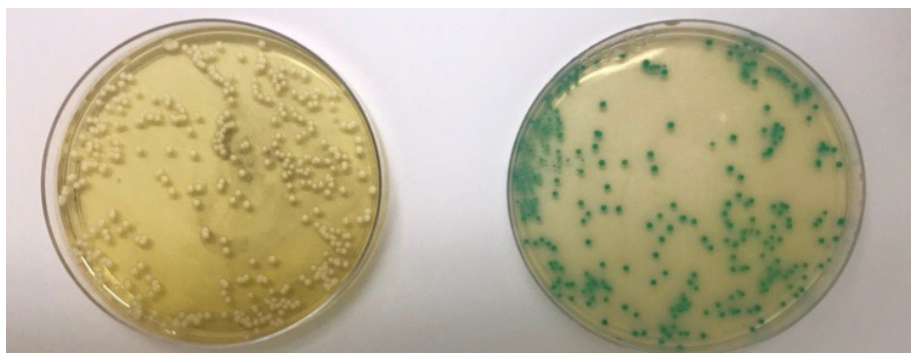
Tabela 3 - Número de participantes do grupo Esclerose Múltipla (n=55) com culturas positivas e negativas para o gênero *Candida* de acordo com os parâmetros clínicos: surto da doença, uso de medicamentos e tempo de diagnóstico

Dados clínicos dos pacientes com Esclerose Múltipla		Presença de <i>Candida</i> spp.		Total de indivíduos
		Positivos	Negativos	
Atividade da doença	Surtos	4	2	6
	Progressão	5	5	10
	NEDA	18	21	39
Uso de medicação	Natalizumabe	12	11	23
	Fingolimode	3	0	3
	Interferon	7	3	10
	A. Glatirâmer	0	6	6
	Alentuzumabe	1	0	1
	Ocrelizumabe	0	1	1
	Fumarato de dimetila	0	2	2
	Sem medicação	3	6	9
Tempo de diagnóstico	0 a 9 anos	19	18	37
	mais de 10 anos	9	9	18

4.3 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias na cavidade bucal dos indivíduos portadores do gênero *Candida*

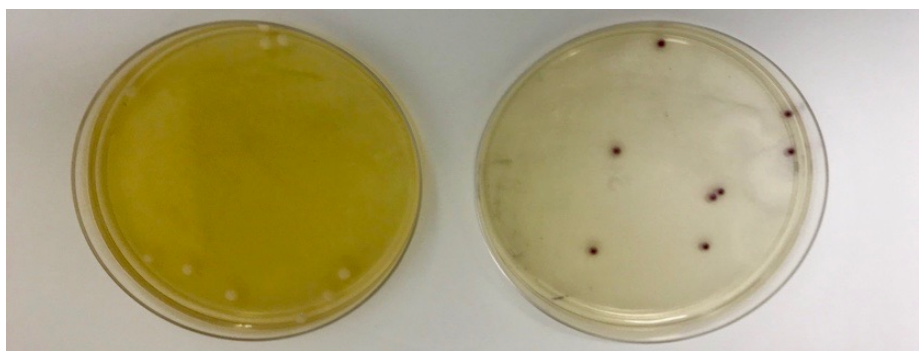
Nos indivíduos com crescimento positivo para *Candida* spp., foi realizada a UFC/mL nas placas de ágar Sabouraud. A mediana do número de colônias de *Candida* observadas foi de 220 UFC/mL para o grupo EM e 120 UFC/mL para o grupo controle, entretanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 3).

Figura 4 - Crescimento de colônias do gênero *Candida*



Legenda: Crescimento das colônias em ágar Sabouraud (esquerda) e CHROMagar (direita). Colônias verdes no CHROMagar sugestivas de *C. albicans*.
Fonte: Elaborada pelo autor

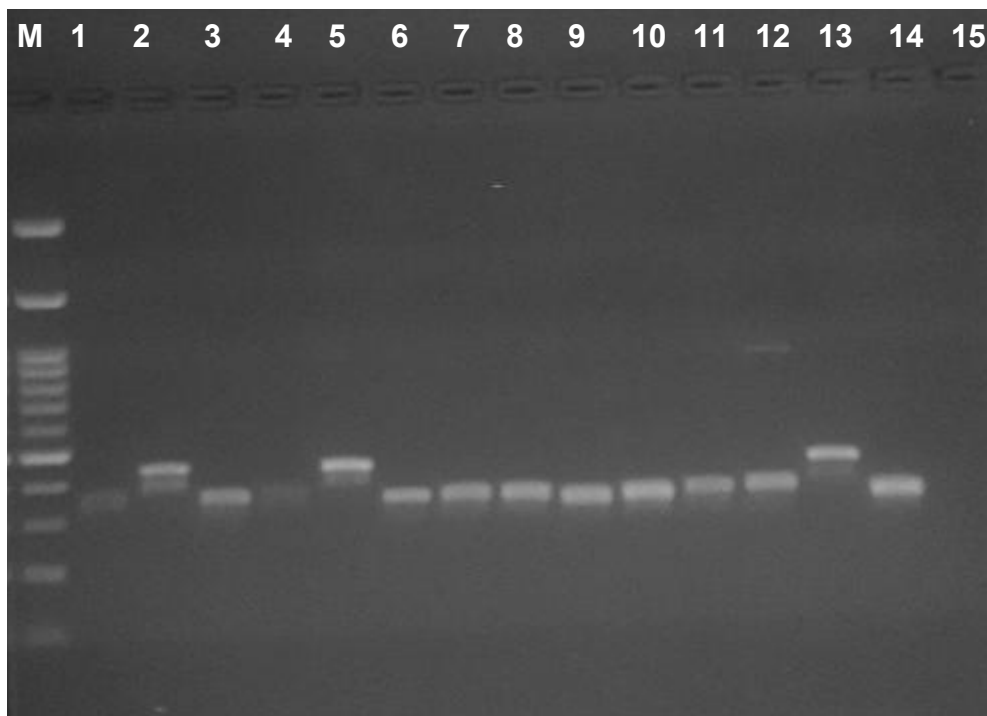
Figura 5 - Crescimento de colônias do gênero *Candida*



Legenda: Crescimento de colônias em ágar Sabouraud (esquerda) e CHROMagar (direita). Colônias rosas-avermelhadas no CHROMagar sugestivas de *C. krusei*.
Fonte: Elaborada pelo autor

A seguir, colônias com características diferentes de cada voluntário foram isoladas para identificação e confirmação das espécies por PCR multiplex (Figura 6). Desse modo, foram obtidos 46 isolados, dentre os quais 34 foram *C. albicans* (73,91%), 10 *C. glabrata* (21,73%), 1 *C. tropicalis* (2,17%) e 1 *C. krusei* (2,17%). As espécies *C. albicans* e *C. glabrata* foram encontradas nos grupos EM e controle, entretanto as espécies *C. tropicalis* e *C. krusei* foram verificadas apenas no grupo EM.

Figura 6 - Gel de agarose 1,5% em TBE, corado por brometo de etídio e visualizado em transluminador



Can. M-marcador de peso molecular (*Ladder* 100pb); Can. 1- P1 *C. albicans* (340pb); Can. 2- P2 *C. glabrata* (414pb); Can. 3- P3 *C. albicans* (340pb); Can. 4- P4 *C. albicans* (340pb); Can. 5- P5 *C. glabrata* (414pb); Can. 6- P6 *C. albicans* (340pb); Can. 7- P7 *C. albicans* (340pb); Can. 8- P8 *C. albicans* (340pb); Can. 9- P9 *C. tropicalis* (328pb); Can. 10- P10 *C. albicans* (340pb); Can. 11- *C. albicans* ATCC 18804 (340pb); Can.12- *C. krusei* ATCC 6258 (345pb); Can.13- *C. glabrata* ATCC 90030 (414pb); Can.14- *C. tropicalis* ATCC13803 (328pb); Can.15- Controle negativo.
Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foram selecionados 55 pacientes com EM, que atendiam os critérios de inclusão, atendidos no CATEM, em São Paulo, durante um período de 6 meses. Desses 55 pacientes, 82% eram do sexo feminino e 18% do sexo masculino. Portanto, houve um predomínio feminino de 4:1 o que está de acordo com a literatura. Em revisão sistemática, Vasconcelos et al. (2016) analisaram diversos estudos epidemiológicos, publicados no período de 1990 a 2012, de pacientes com esclerose múltipla de diferentes cidades brasileiras, encontrando proporções do sexo feminino para masculino de 2:1 até 4:1. A maior prevalência de EM em mulheres também foi encontrada por Luna et al. (2019), em estudo abrangente envolvendo 6421 pacientes na Suécia, onde 72% dos pacientes eram do sexo feminino e apenas 18% do sexo masculino. Além da proporção de gêneros, a idade média dos pacientes do presente estudo (39 anos) também correspondeu ao encontrado na literatura, que indicaram média de idade 32 anos (Vasconcelos et al., 2016), 33 anos (Milo, Miller, 2014) e 39 anos (Luna et al., 2019).

Entre os pacientes com EM, 9 estavam sem uso de medicação, sendo 3 destes, em atividade de doença (1 surto e 2 em progressão) e 6 pacientes em NEDA. Todos os demais pacientes (n=46) estavam fazendo uso de medicações, conforme o protocolo do Consenso da Academia Brasileira de Neurologia, do Comitê de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla (Marques et al., 2018) e do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde (PCDT). As medicações utilizadas incluíram: Interferons, Acetato de glatirâmer, Fingolimode, Fumarato de dimetila, Natalizumabe, Alentuzumabe e Ocrelizumabe.

No grupo dos interferons, estavam sendo utilizados nesse estudo: interferon beta-1a com administração intramuscular, interferon beta-1a com administração subcutânea e interferon-1b também com administração subcutânea. O interferon-1b foi a primeira medicação aprovada para o tratamento de EM em 1993, considerado como fármaco modificador de doença. Possuem como mecanismo de ação inibidores de passagem de células auto-reativas pela barreira hematoencefálica (BHE), redução de citocinas pró-inflamatórias e regulação negativa para apresentação de antígenos (Plosker, 2011). Os possíveis efeitos adversos ao uso de

interferons incluem: sintomas gripais, calafrios, mialgia, alterações de transaminases, linfopenia e sinais de depressão. O Acetato de glatirâmer, uma medicação também injetável, é constituída por um conjunto de polipeptídeos sintéticos que atuam na indução de desvio da resposta imune para os linfócitos Th2. Apresenta como efeitos adversos, sintomas nos locais da aplicação, além de taquicardia e alergias locais (Johnson, 2010).

O Fingolimode foi o primeiro fármaco aprovado para uso oral no tratamento de EM em 2010. É um análogo da esfingosina que se liga aos receptores dos linfócitos T na proteína G (S1P1-5), bloqueando a saída destes dos órgãos linfoides secundários, além de atuar na redução de citocinas pró-inflamatórias por meio da regulação dos receptores S1P presentes nos astrócitos e reduzir a produção de IL-17 pelas células Th (Mehling et al, 2011). Além do Fingolimode como terapia oral, temos o Fumarato de dimetila e a Teriflunomida. O Fumarato de dimetila age na redução de linfócitos circulantes e conversão da resposta de Th1 para Th2 por meio das IL-4, IL-5 e IL-10. Pode alcançar redução de linfócitos em até 32% no primeiro ano de uso, porém sem aumento de infecções oportunistas segundo Gold et al. (2012). Já a Teriflunomida possui um efeito inibidor da síntese de pirimidina de células em divisão, atuando apenas nos linfócitos em grande proliferação. Como a Teriflunomida foi aprovada pela ANVISA em 2012 e foi apenas recentemente disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, nenhum dos pacientes desse estudo estavam fazendo uso desse medicamento.

O Natalizumabe , Ocrelizumabe e Alentuzumabe constituem uma outra linha de medicamentos para EM constituídos por anticorpos monoclonais. O Natalizumabe é um inibidor de α 4-integrina, expressa na superfície dos linfócitos, impedindo a adesão celular aos receptores endoteliais VCAM e a entrada na barreira hematoencefálica. É uma medicação com boa eficácia, com redução na taxa anual de surtos em 68% (Polman et al., 2006). Entre os efeitos adversos, o seu maior risco é o desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva (Leukoencephalopathy multifocal progressive - LEMP), desencadeada pela reativação do vírus John Cunningham (JCV). Além deste, pode ocorrer reações infusionais, leucopenia, cefaleia e dores articulares (Kappos et al., 2011). O Alentuzumabe é um anticorpo monoclonal contra molécula CD52, expresso na superfície dos linfócitos T e B maduros. Entre os efeitos adversos, esse

medicamento pode ocasionar púrpura trombocitopênica autoimune, tireoidite e infecção por herpes vírus (Coles et al, 2012). O Ocrelizumabe é um anticorpo monoclonal que se liga ao CD20 dos linfócitos, sendo o único aprovado para os casos de EMPP. Seus efeitos adversos podem levar a reativação da hepatite B disseminada, sendo recomendado uma investigação prévia antes do uso (Montalban et al, 2017).

Portanto, os tratamentos para esclerose múltipla apresentam diferentes mecanismos de ação, mas todos interferem com o sistema imunológico do paciente e levantam questões sobre o risco para infecções. Além disso, independentemente do uso ou não de medicamentos, tem sido relatado que os pacientes com esclerose múltipla possuem maior risco de infecções comparados com a população em geral (Luna et al., 2019). Allizond et al. 2015 verificaram que as células polimorfonucleares de pacientes com esclerose múltipla, em tratamento ou não com medicações imunossupressoras ou imunomoduladoras, apresentavam atividade fagocitária *in vitro* reduzida contra patógenos, como *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*.

Desse modo, nesse estudo foi investigado a prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes com EM. As espécies de *Candida* são fungos oportunistas que podem estar presentes na cavidade bucal em condições de saúde, entretanto aumentam em número e tornam-se patogênicas na presença de alguns fatores predisponentes, como as alterações no sistema imunológico, podendo resultar no desenvolvimento de lesões de candidíase bucal (Junqueira et al., 2012; Pankhurst et al., 2013). Os resultados indicaram uma maior prevalência de portadores de *Candida* spp. na cavidade bucal entre pacientes com esclerose múltipla (50,09%), em relação aos indivíduos do grupo controle (35,55%). Até o momento, esse é o primeiro trabalho a investigar a presença de *Candida* na cavidade bucal de pacientes com EM, e, portanto, não é possível a comparação desses dados com outros estudos. Sabe-se que, em indivíduos saudáveis, a prevalência das espécies de *Candida* na cavidade bucal varia de 20 até 50%, dependendo da população em estudo (Kraft-Bodi et al., 2015). Entretanto em indivíduos com determinadas doenças sistêmicas a taxa de prevalência aumenta em relação aos pacientes saudáveis. Junqueira et al. (2012) encontraram a presença de *Candida* na cavidade bucal em 62% dos indivíduos HIV-positivos (n=60). Chouhan et

al. (2019) estudaram a associação da colonização oral por *Candida* com diabetes mellitus, verificando a presença de *Candida* em 90% dos indivíduos diabéticos não controlados (n=30), 63% dos pacientes diabéticos controlados (n=30) e 20% dos indivíduos saudáveis (n=30).

Em indivíduos com presença de *Candida* na cavidade bucal, a contagem de UFC/mL é um dado importante para distinguir portadores assintomáticos de indivíduos com infecção por *Candida*. O desenvolvimento de lesões clínicas de candidíase tem sido correlacionado com o aumento no número de leveduras na saliva acima de 400 UFC/mL (Chouhan et al. 2019). No presente trabalho, foi observada uma média de 220 UFC/mL para o grupo esclerose múltipla e 120 UFC/mL para o grupo controle, confirmando os achados clínicos de que todos os participantes desse estudo com culturas positivas para *Candida* eram portadores assintomáticos (Abaci et al. 2010).

Em relação as espécies isoladas, *C. albicans* foi a mais prevalente (73,91%), seguida por *C. glabrata* (21,73%), em ambos os grupos experimentais. Entretanto, apenas no grupo de pacientes com esclerose múltipla foram isoladas espécies de *C. tropicalis* (2,17%) e *C. krusei* (2,17%). Esses dados concordam com os estudos da literatura que mostram que *C. albicans* é a espécie mais isolada da cavidade bucal, tanto em pacientes com colonização assintomática, como pacientes com lesões de candidíase (Junqueira et al. 2012, Menezes et al. 2015). Em estudo realizado em pacientes HIV-positivos da cidade de São Paulo, Junqueira et al. (2012) também encontraram maior número de *C. albicans* (51,56%), seguido por *C. glabrata* (15,62%), entre os isolados da cavidade bucal. Espécies de *C. tropicalis* e *C. krusei* também foram detectadas em baixo número por esses autores. Por outro lado, no estudo de Chouhan et al. (2019) realizado na Índia, foi verificado maior prevalência de *C. glabrata*, seguida por *C. albicans*, tanto em pacientes diabéticos como indivíduos saudáveis.

Assim, os dados obtidos nesse trabalho indicaram que os pacientes com EM apresentaram maior quantidade de *Candida* spp. e maior diversidade de espécies na cavidade bucal em relação ao grupo controle, sugerindo que as alterações imunológicas da doença, assim como o uso de medicamentos, podem predispor os pacientes à colonização oral por leveduras do gênero *Candida*.

Entretanto, uma outra questão importante deve ser discutida na relação entre *Candida* e EM. Alguns estudos tem sugerido que a colonização por *Candida* podem estar associados com o desenvolvimento da EM devido à evidências de anticorpos e antígenos fúngicos de várias espécies de *Candida* em líquido cefalorraquidiano (Pisa et al, 2103) e no sangue de indivíduos com EM (Pisa et al., 2011; Benito-Leon et al., 2010). Benito-Leon et al. (2010) encontraram uma correlação positiva entre evidências sorológicas de infecção por *Candida* com a EM, detectando-se antígenos de *C. albicans* em 47% dos pacientes com EM contra 21% do grupo controle. Para outras espécies foram encontradas proporções de 46% versus 17% para *C. glabrata* e 37% versus 17% para *C. parapsilosis*.

Saroukolaei et al. (2016) avaliaram a expressão do gene *APR1* em isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com EM. Esse gene é responsável pela produção de proteinase, uma enzima importante para a virulência de *C. albicans*. Os resultados demonstraram correlação entre a expressão do gene *APR1* de *C. albicans* e a idade da doença, bem como com a Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS). Esses autores também acompanharam os pacientes por 9 meses e verificaram que os valores médios de EDSS após o tratamento antifúngico reduziram para $1,6074 \pm 0,1081$, comparado com os valores de EDSS antes do tratamento antifúngico ($2,2519 \pm 0,1323$), indicando que a progressão da EM diminuiu após o tratamento dos pacientes com antifúngicos.

Fraga-Silva et al. (2016) estudaram os efeitos da infecção por *C. albicans* na encefalite autoimune experimental (EAE) em camundongos, modelo tradicionalmente aceito para estudo da EM. Os animais foram infectados com *C. albicans*, e 3 dias depois foram submetidos à indução da EAE por meio da imunização com glicoproteína da mielina de oligodendrócitos. A infecção prévia por *C. albicans*, levou a um aumento dos sinais clínicos da doença e também a perda de peso corporal. A gravidade da doença foi associada com expansão periférica de células T CD4+ e produção de altos níveis de TNF- α , IFN- γ IL-6, e IL-17 pelo baço e células do SNC. Além disso, leveduras e hifas dos fungos específicas para células T foram encontradas no SNC. Esses dados sugeriram que a infecção prévia por *C. albicans* pode agravar a EAE, e possivelmente a EM.

Nesse estudo não foi encontrada correlação da colonização oral por *Candida* com a atividade da doença ou tempo de diagnóstico, mas nossos resultados indicam

que estudos longitudinais com um maior número de pacientes devem ser desenvolvidos para avaliar o papel da colonização e infecção por *Candida* no desenvolvimento da esclerose múltipla.

Em síntese, concluiu-se que os pacientes com esclerose múltipla apresentam níveis mais elevados de colonização por *Candida* na cavidade bucal, sugerindo que esses pacientes devem receber orientações de prevenção de candidíase bucal, visto que o surgimento de infecções por esse fungo podem contribuir para o agravamento da EM.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que:

- a) a presença de *Candida* spp. na cavidade bucal dos pacientes com EM foi mais elevada em relação ao grupo controle;
- b) entre os indivíduos portadores de *Candida* spp., verificou-se maior número de leveduras na cavidade bucal dos pacientes com EM em relação ao grupo controle;
- c) nos grupos EM e controle foram encontradas as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*. Entre os pacientes com EM, também foram observadas espécies de *C. tropicalis* e *C. kusei*.

REFERÊNCIAS*

Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining *Candida* spp. incidence in denture wearers. *Mycopathologia*. 2010 May;169(5):365-72. doi: 10.1007/s11046-010-9275-8.

Adamczyk-Sowa M, Medrek A, Madej P, Michlicka W, Dobrakowski P. Does the gut microbiota influence immunity and inflammation in Multiple Sclerosis Pathophysiology? *J Immunol Res*. 2017; 2017: 7904821. doi: 10.1155/2017/7904821.

Allizond V, Scutera S, Rossi S, Musso T, Crocilla C, Cavalla P, et al. Polymorphonuclear Cell Functional Impairment in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients: Preliminary Data. *PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6):e0131557. doi: 10.1371/journal.pone.01311557.

Amato MP, Derfuss T, Hemmer B, Liblau R, Montalban X, Soelberg Sørensen P, Miller DH. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016ECTRIMS focused workshop. *Mult Scler*. 2017 Jan 6; 352458516686847. doi: 10.1177/1352458516686847.

Benito-León J, Pisa D, Alonso R, Calleja P, Díaz- Sánchez M, Carrasco L. Association between multiple sclerosis and *Candida* especies: evidence a case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Sep; 29(9):1139-45. doi: 10.1007/s10096-010-0979-y.

Budhram A, Parvathy S, Kremenutzky M, Silverman M. Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017 Apr; 23(5):628–636. doi: 10.1177/1352458516682105.

Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol*. 2000 June;38(6);2302-10. PubMed PMID 10834993.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Chouhan S, Kallianpur S, Prabhu KT, Tijare M, Kasetty S, Gupta S. Candidal Prevalence in Diabetics and its Species Identification. *Int J Appl Basic Med Res*. 2019 Jan-Mar;9(1):49-54. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_259_18.

Cohen BA, Rivera VM. PRISMS: the story of a pivotal clinical trial series in multiple sclerosis. *Curr Med Res Opin*. 2010 Apr;26(4):827-38. doi: 10.1185/03007991003604018.

Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, et al. Alemtuzumab more effective than interferon β -1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology*. 2012 Apr 3;78(14):1069-78. doi: 10.1212/WNL.0b013e31824e8ee7.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008 Oct 25;372(9648):1502-17. doi: 10.1016/s0140-6736(08)61620-7.

Correale J, Farez MF, Gaitán MI. Environmental factors influencing multiple sclerosis in Latin America. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2017 Jun;3(2):20055217317715049. doi: 10.1177/2055217317715049.

Costa ACBP, Rasteiro VMC, Pereira CA, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. The effects of rose bengal- and erythrosine-mediated photodynamic therapy on *Candida albicans*. *Mycoses*. 2012 Jan;55(1):56-63. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02042.x.

Da Gama Pereira AB, Sampaio Lacativa MC, Da Costa Pereira FF, Alvarenga RM. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord*. 2015 Nov; 4(6):572-9. doi: 10.1016/j.msard.2015.08.004.

De Angelis F, Brownlee WJ, Chard DT, Trip SA. New MS diagnostic criteria in practice. *Pract Neurol*. 2019 Feb;19(1):64-67. doi: 10.1136/practneurol-2018-001945.

Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012 Mar 13;78(11):823-832. doi: 10.1212/WNL.0b013e318249f6f0.

Doty RL, Tourbier IA, Pham DL, Cuzzocreo JL, Udupa JK, Karacali B, et al. Taste dysfunction in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2016 Apr;263(4):677-688. doi: 10.1007/s00415-016-8030-6.

Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008 Mar;7(3):268-77. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70042-5.

Fraga-Silva TF, Mimura LA, Marchetti CM, Chiuso-Minicucci F, França TG, Zorzella-Pezavento SF, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis development is aggravated by *Candida albicans* infection. *J Immunol Res*. 2015;2015:635052. doi: 10.1155/2015/635052.

Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Münz C, Sriram S, et al. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2006 Oct;5(10):887-94. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70577-4.

Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012 Sep 20;367(12):1098-107.

Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015 Apr 14(4):406-19. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70305-9.

Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med*. 2000 Sep 28;343(13):898-904. doi: 10.1056/NEJM200009283431301.

Johnson KP. Risks vs benefits of glatiramer acetate: a changing perspective as new therapies emerge for multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag*. 2010 Apr 15;6:153-172.

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, et al. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012 Jan-Feb;54(1):17-24. doi: 10.1590/S0036-46652012000100004.

Kanchandani R, Howe JG. Lhermitte's sign in multiple sclerosis: a clinical survey and review of the literature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982 Apr; 45(4):308-12. doi: 10.1136/jnnp.45.4.308.

Katz Sand I. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2015 Jun 28(3):193-205. doi: 10.1097/WCO.0000000000000206.

Kappos L, Bates D, Edan G, Eraksoy M, Garcia-Merino A, Grigoriadis N, et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol*. 2011 Aug;10(8):745-58. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70149-1.

Kappos L, De Stefano N, Freedman MS, Cree BA, Radue EW, Sprenger T, et al. Inclusion of brain volume loss in a revised measure of 'no evidence of disease activity' (NEDA-4) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2016 Sep;22(10):1297-305. doi: 10.1177/1352458515616701.

Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: a critical review. *J Autoimmun*. 2014 Feb-Mar;48-49:134-42. doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.022.

Kingwell E., Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*, 2013 Sep 26;13:128. doi: 10.1186/1471-2377-13-128.

Kraft-Bodi E, Jørgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. *J Dent Res*. 2015 Sep;94(9 Suppl):181S-6S. doi: 10.1177/0022034515595950.

Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta Neurol Scand* 1975 Mar;51(2):110-36. doi: 10.1111/j.1600-0404.1975.tb01364.x.

Kurtzke J. Epidemiologic contribution to multiple sclerosis: an overview. *Neurology*. 1980 Jul; 30(7 Pt2):61-79. doi: 10.1212/WNL.30.7_Part_2.61.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444-52. doi: 10.1212/wnl.33.11.1444

Kurtzke JF. Disability rating scales in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1984;436:347-60. doi: 10.1111/j.1749-6632.1984.tb14805.x

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr; 46(4):907-11. doi: 10.1212/WNL.46.4.907.

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen SP, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis. the 2013 revisions. *Neurology*. 2014 Jul 15; 83(3):278-86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560.

Luna G, Alping P, Burman J, Fink K, Fogdell-Hahn A, Gunnarsson M, et al. Infection Risks Among Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod, Natalizumab, Rituximab, and Injectable Therapies. *JAMA Neurol.* 2019 Oct 7. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.3365.

Maciel DRK, Santos ALMA, Parolin MKF, Ribeiro TAGJ. Recomendações no tratamento da Esclerose Múltipla e Neuromielite óptica. *Academia Brasileira de Neurologia.* 2016; 13- 29.

Marques VD, Passos GR, Mendes MF, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Comini-Frota ER, et al. Consenso Brasileiro para Tratamento da Esclerose Múltipla: Academia Brasileira de Neurologia e Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla. *Arq Neuropsiquiatr* 2018;76(2)8:1-16. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20180078>.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013 Feb 15;4(2):119-128. doi: 10.416/viru.22913.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2001 Jul;50(1):121-27. PubMed PMID 11456302.

McGuigan C, Craner M, Guadagno J, Kapoor R, Mazibrada G, Molyneux P. Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: recommendations from an expert group. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2016 Feb;87(2):117-25. doi: 10.1136/jnnp-2015-311100.

Mehling M, Kappos L, Derfuss T. Fingolimod for multiple sclerosis: mechanism of action, clinical outcomes, and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011 Oct;11(5):492-7. doi: 10.1007/s11910-011-0216-9.

Menezes TO, Rodrigues MC, Nogueira BM, Menezes SA, Silva SH, Vallinoto AC. Oral and systemic manifestations in HIV-1 patients. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Jan-Feb;48(1):83-6. doi: 10.1590/0037-8682-0179-2014.

Mielcarz DW, Kasper LH. The gut microbiome in multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol.* 2015 Apr;17(4):344. doi: 10.1007/s11940-015-0344-7.

Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev.* 2010 Mar;9(5):A387-94. doi: 10.1016/j.autrev.2009.11.010.

- Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*. 2014 Apr-May;13(4-5): 518-24. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.012
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017 Jan 19;376(3):209–220. doi: 10.1056/NEJMoa1606468.
- Pankhurst CL. Candidiasis (oropharyngeal). *BMJ Clin Evid*. 2103 Nov 8;2013:1304. PubMed PMID: 24209593.
- Pisa D, Alonso R, Carrasco L. Fungal infection in a patient with multiple sclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Oct;30(10):1173-1180. doi: 10.1007/s10096-011-1206-1.
- Pisa D, Alonso R, Jiménez-Jiménez FJ, Carrasco L. Fungal infection in cerebrospinal fluid from some patients with multiple sclerosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Jun;32(6):795-801. doi: 10.1007/s10096-012-1810-8.
- Plosker GL. Interferon- β -1b: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011 Jan;25(1):67-68. doi: 10.2165/11206430-000000000-00000.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Mar 2;354(9):899-910. doi: 10.1056/NEJMoa044397.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983 Mar;13(3):227-31. doi: 10.1002/ana.410130302.
- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde. <http://conitec.gov.br>. [accessed 2019 October 13].
- Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2002 Jul;104(3):182-91. doi: 10.1016/s0303-8467(2)00036-7.
- Purzycki CB, Shain DH. Fungal toxins and multiple sclerosis: a compelling connection. *Brain Res Bull*. 2010 Apr 29;82(1-2):4-6. doi: 10.1016/j.brainresbull.2010.02.012.
- Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):727-39. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70094-6.
- Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):169-180. doi: 10.1056/NEJMra1401483.
- Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*. 2001 Apr;22(2):117-39. doi: 10.1007/s100720170011.

Santos RB. Identificação Molecular por reação em cadeia da polimerase multiplex para espécies do gênero *Candida* de importância médica 2014. Dissertação . Unesp. <https://repositório.unesp.br>. [accessed 2019 October13].

Sahand IH, Moragues MD, Eraso E, Villar-Vidal M, Quindós G, Pontón J. Supplementation of CHROMagar *Candida* Medium with Pal's Medium for Rapid identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2005 Nov;43(11):5768-5770. doi: 10.1128/JCM.43.11.5768-5770.2005.

Saroukolaei SA, Ghabae M, Shokri H, Khosravi A, Badiei A. Evaluation of APR1 gene expression in *Candida albicans* Strains Isolated From Patients With Multiple Sclerosis. Jundishapur J Microbiol. 2016 May;9(5):e33292. doi: 10.5812/jjm.33292.

Saroukolaei SA, Ghabae M, Shokri H, Badiei A, Ghourchian S. The role of *Candida albicans* in severity of multiple sclerosis. Mycoses, 2016 Nov;59(11):697-704. doi: 10.1111/myc.12489.

Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, Mcdowell F, et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. Ann N Y Acad Sci. 1965 Mar 31;122:552-68. doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb20235.x.

Steinman L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. Annu Rev Immunol. 2014;32:257-81. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120227.

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2018 Feb;17(2):162-173. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.

Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Río J, Díaz-Villoslada P, Brieva L, et al. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. AJNR Am J Neuroradiol. 2000 Apr;21(4):702-6. PubMed PMID: 10782781.

Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. Lancet. 2018 Apr 21;391(10130):1620-1636. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30481-1.

Uecker FC, Olze H, Kunte H, Gerz C, Göktas Ö, Harms L, Schmidt FA. Longitudinal Testing of Olfactory and Gustatory Function in Patients with Multiple Sclerosis. *PloS One*. 2017 Jan 20;12(1):e 0170492. doi: 10.1371/journal.pone.017049

Wade BJ. Spatial analysis of global prevalence of multiple sclerosis suggests need for an updated prevalence scale. *Mult. Scler.Int.* 2014;2014:124578. doi:10.1155/2014/124578.

Vasconcelos CC, Thuler LC, Rodrigues BC, Calmon AB, Alvarenga RM. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Clin Neurol Neurosurg.* 2016. Dec;151:24-30. doi: 10.1016/j.clineuro.2016.07.011.

APÊNDICE A - Aprovação do Comitê de Ética

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA E INFECÇÕES FÚNGICAS ORAIS

Pesquisador: ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 06066818.3.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT)

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.276.917

Apresentação do Projeto:

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória, autoimune, crônica e desmielinizante que acomete o Sistema Nervoso Central (SNC). Sua etiologia ainda não é bem definida, mas vários fatores de risco podem estar associados ao desenvolvimento da doença, incluindo fatores genéticos e ambientais. Recentemente, tem sido sugerido que a microbiota do indivíduo pode ter um papel importante no desenvolvimento da esclerose múltipla. Sendo assim, o objetivo desse estudo será investigar a relação entre esclerose múltipla e infecções fúngicas orais.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo desse estudo será investigar a relação entre esclerose múltipla e infecções fúngicas orais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram reformulados e nesta versão estão adequadamente descritos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem delineada, e todas as pendências foram respondidas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE foi reformulado, atendendo todas as exigências éticas.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas **CEP:** 12.245-000

UF: SP **Município:** SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078 **Fax:** (12)3947-9010 **E-mail:** ceph.ict@unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



Continuação do Parecer: 3.275.917

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a reformulação de partes do projeto, acatando as sugestões do relator e respondendo todas as pendências, aprovo o projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado acata o parecer do(a) Relator(a).

O (a) pesquisador(a) irá receber e-mail da Secretaria do CEPH-ICT-CAMPUS DE SJCAMPOS-UNESP, para envio de relatórios parciais/final, para não incorrer na penalidade de não o fazendo, em não ter novas submissões avaliada pelo Comitê de Ética, até que sane a pendência de envio do relatório, na forma de notificação através do sistema da Plataforma Brasil. Obs:- No site <https://www2.ict.unesp.br/> – Sobre o ICT – Comissões e Comitês - Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos, encontrará o formulário para envio do Relatório parcial/final

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1252460.pdf	21/03/2019 11:25:08		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	21/03/2019 11:24:33	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito
Outros	formulario_resposta_pendencia.doc	20/03/2019 18:28:37	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	20/03/2019 18:28:28	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICEA.docx	20/03/2019 18:15:40	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	APENDICEC.docx	20/03/2019 18:15:30	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	APENDICEB.docx	20/03/2019 18:14:51	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	19/12/2018 11:41:38	ELIANA TOMOMI SHIMABUKURO DA CUNHA	Aceito

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SAO JOSE DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph.ict@unesp.br

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS



Continuação do Parecer: 3.276.917

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 22 de Abril de 2019

Assinado por:
Denise Nicodemo
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph.ict@unesp.br

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido

Caro (a) Senhor(a)

Este é um convite para você participar da pesquisa: “Relação entre Esclerose Múltipla e infecções fúngicas orais”. Eu, Eliana Tomomi Shimabukuro da Cunha, médica e aluna de Mestrado do Instituto de Ciência e Tecnologia ICT/Unesp em São José dos Campos, portadora do CPF 265.802.838-58, estabelecida à Av. Anchieta 1281, São José dos Campos, e telefone de contato (12) 3921-3277, sou a pesquisadora responsável pelo desenvolvimento dessa pesquisa.

O objetivo será estudar a influência do fungo *Candida* na Esclerose Múltipla. Sendo assim, será necessário coletar amostras de saliva de pessoas com Esclerose Múltipla e de pessoas não portadoras da doença, como grupo controle para o estudo. Essas amostras serão transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), em São José dos Campos, onde serão realizados estudos sobre a existência do fungo na cavidade bucal. Não há risco envolvido na coleta de saliva e na execução da pesquisa para os participantes. Não haverá nenhum custo ao participante da pesquisa e nem pagamento pela sua colaboração.

Caso venha apresentar alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/UNESP, situado na Av. Eng. Francisco José Longo, nº 777, Jardim São Dimas, CEP: 12245-000 - São José dos Campos-SP, Telefone: (12) 3947- 9000 Fax: (12) 3947-9010. O Sr. (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, acredito ter sido esclarecido (a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa ou recebimento pela colaboração.

RG: _____ CPF: _____

Endereço: _____

Local: _____ Data: _____

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

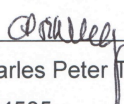
APÊNDICE C - Autorização do Centro de Atendimento e Tratamento de Esclerose Múltipla (CATEM) da Irmandade da Santa Casa de São Paulo



AUTORIZAÇÃO

Eu Dr. Charles Peter Tilbery, presidente do Centro de Atendimento e Tratamento de Esclerose Múltipla - CATEM, CNPJ 001.564.201/0001-38, autorizo a abordagem e coleta de saliva dos participantes do projeto "RELAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MULTIPLA E INFECÇÕES FUNGICAS ORAIS" no nosso centro.

São Paulo, 8 de março de 2019-03-08



Dr. Charles Peter Tilbery
CRM 14535
Presidente do CATEM

*Rua Dr. Cesário Mota Júnior, 112 CEP: 01221-020
São Paulo - SP - Tel (011) 2176-7232*

APÊNDICE D - ESCALA EXPANDIDA DO ESTADO DE INCAPACIDADE (EDSS)

0	Normal neurological exam (all grades 0 in Functional Systems [FS]; cerebral grade 1 acceptable).
1.0	No disability, minimal signs in one FS (ie, grade 1, excluding cerebral grade 1).
1.5	No disability, minimal signs in more than one FS (more than one grade 1 excluding cerebral grade 1).
2.0	Minimal disability in one FS (one FS grade 2, others 0 or 1).
2.5	Minimal disability in two FS (two FS grade 2, others 0 or 1).
3.0	Moderate disability in one FS (one FS grade 3, others 0 or 1) or mild disability in three or four FS (three/four FS grade 2, others 0 or 1) though fully ambulatory.
3.5	Fully ambulatory but with moderate disability in one FS (one grade 3) and one or two FS grade 2; or two FS grade 3; or five FS grade 2 (others 0 or 1).
4.0	Fully ambulatory without aid, self-sufficient, up and about some twelve hours a day despite relatively severe disability consisting of one FS grade 4 (others 0 or 1), or combinations of lesser grades exceeding limits of previous steps. Able to walk without aid or rest for some 500 meters.
4.5	Fully ambulatory without aid, up and about much of the day, able to work a full day, may otherwise have some limitation of full activity or require minimal assistance, characterised by relatively severe disability, usually consisting of one FS grade 4 (others grade 0 or 1), or combinations of lesser grades exceeding limits of previous steps. Able to walk without aid or rest for some 300 meters.
5.0	Ambulatory without aid or rest for some 200 meters; disability severe enough to impair full daily activities (e.g. to work a full day without special provisions). (Usual FS equivalents are one grade 5 alone, others 0 or 1; or combinations of lesser grades usually exceeding specifications for step 4.0).
5.5	Ambulatory without aid or rest for about 100 meters; disability severe enough to preclude full daily activities. (Usual FS equivalents are one grade 5 alone, others 0 or 1; or combinations of lesser grades usually exceeding specifications for step 4.0).
6.0	Intermittent or unilateral constant assistance (cane, crutch, or brace) required to walk about 100 meters with or without resting. (Usual FS equivalents are combinations with more than two FS grade 3+).
6.5	Constant bilateral assistance (cane, crutch, or brace) required to walk about 20 meters without resting. (Usual FS equivalents are combinations with more than two FS grade 3+).
7.0	Unable to walk beyond 5 meters even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self in standard wheelchair and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 hours a day. (Usual FS equivalents are combinations with more than one FS grade 4+; very rarely, pyramidal grade 5 alone).
7.5	Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need aid in transfer; wheels self but cannot carry on in standard wheelchair a full day; may require motorised wheelchair. (Usual FS equivalents are combinations with more than one FS grade 4+).
8.0	Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair; but may be out of bed itself much of the day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms. (Usual FS equivalents are combinations, generally grade 4+ in several systems).
8.5	Essentially restricted to bed much of the day; has some effective use of the arm(s); retains some self-care functions. (Usual FS equivalents are combinations, generally grade 4+ in several systems).
9.0	Helpless bed patient; can communicate and eat. (Usual FS equivalents are combinations, mostly grade 4+ in several systems).
9.5	Totally helpless bed patient; unable to communicate effectively or eat/swallow. (Usual FS equivalents are combinations, almost all grade 4+).
10	Death due to MS.

Fonte: Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale. *Neurology* 1983;33:1444-1452