



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

**ROSANA FERREIRA SILVA**

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. NA CAVIDADE BUCAL DE  
PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS**

2016

**ROSANA FERREIRA SILVA**

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. NA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES  
SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO  
HEMATOPOIÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência 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 de Patologia

Orientador: Prof. Tit. Sigmar de Mello Rode  
Coorientador: Prof. Dr. Lucio Murilo dos Santos

São José dos Campos

2016

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2016]. 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).

Silva, Rosana Ferreira

Prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas / Rosana Ferreira Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2016.

50 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, 2016.

Orientador: Sigmar de Mello Rode

Coorientador: Lucio Murilo Dos Santos

1. Candidíase. 2. Quimioterapia. 3. Transplante de células-tronco hematopoiéticas. I. Rode, Sigmar de Mello, orient. II. Santos, Lucio Murilo Dos, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Titular Sigmar de Mello Rode** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Professor Dr. Fernando Callera**

Hospital Pio XII

São José dos Campos

São José dos Campos, 01 de dezembro de 2016

## DEDICATÓRIA

*Ao meu Amor, **Ronaldo Camargo**, por não desistir de estar ao meu lado.*

*Ao meu amado filho **Vitor**, para lembrá-lo que sempre se pode ir além, por mais difícil que possa parecer.*

*À minha mãe **Maria do Amparo** por despertar e incentivar o amor pelos estudos.*

*Ao **Projeto Onco** início e motivação desta jornada.*

## AGRADECIMENTOS

*À UNESP - Universidade Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Professor Titular Estevão Tomomitsu Kimpara e da vice-diretora Professora Adj. Rebeca de Nicoló.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Dra. Ana Lia Anbinder.*

*Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal. Em especial à Professora Titular Yasmin Rodarte e ao Professor Dr. José Benedito de Oliveira Amorim pela generosa participação e contribuição na Banca do Exame de Qualificação.*

*Aos Professores, Professor Titular Sigmar de Mello Rode e Professor Dr. Lucio Murilo dos Santos, pela orientação, confiança, paciência e amizade.*

*Ao Professor. Titular. Antônio Olavo Cardoso Jorge, pelo apoio irrestrito na execução do projeto.*

*À Professora Dra Graziella Nuernberg Back Brito, pelas orientações e considerações iniciais.*

*Aos colegas da Pós-graduação, especialmente à Patrícia Pimentel, Rafaella Braga e Fernanda Freire pela inestimável contribuição e ensinamentos no campo da microbiologia.*

*Ao Dr. Fernando Callera pelo incentivo, apoio e acesso ao Hospital Pio XII.*

*À equipe de enfermagem do setor de Onco-hematologia do Hospital Pio XII, na pessoa da Enfermeira Sra. Natalia Vieira, pela colaboração durante a execução do trabalho.*

*À Seção técnica de Pós-graduação do ICT – Unesp, na pessoa do Sr. Ivan Damasceno.*

*Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Sérgio e Domingos, pelo apoio e prestatividade.*

*À FUJEPO - Fundação Joseense de Ensino e Pesquisa em Odontologia pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição de parte dos materiais necessários para a realização deste trabalho.*

*Aos colegas do Projeto Onco, pela convivência harmoniosa, e incentivo constante.*

*Às queridas amigas Zulene Eveline e Fernanda Papaiz, pela presença, apoio e incentivo constantes.*

*Aos pacientes que gentilmente concordaram em participar da pesquisa.*

*“Quanto mais pesado o fardo, mais próxima da terra está a nossa vida, e mais ela é real e verdadeira ...*

*Então, o que escolher? O peso ou a leveza?*

*Não existe meio de verificar qual é a boa decisão, pois não existe termo de comparação. Tudo é vivido pela primeira vez e sem preparação. Como se um ator entrasse em cena sem nunca ter ensaiado. Mas o que pode valer a vida, se o primeiro ensaio da vida já é a própria vida? É isso que faz com que a vida pareça sempre um esboço. No entanto, mesmo ‘esboço’ não é a palavra certa porque um esboço é sempre um projeto de alguma coisa, a preparação de um quadro, ao passo que o esboço que é a nossa vida não é o esboço de nada, é um esboço sem quadro.”*

*(Milan Kundera - A insustentável leveza do ser)*

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 PROPOSIÇÃO.....	16
2.1 Objetivos gerais.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Aspectos éticos.....	17
3.2 Grupo de estudo.....	17
3.3 Critérios de inclusão.....	18
3.4 Anamnese.....	18
3.5 Exame clínico.....	18
3.6 Coleta e processamento das amostras.....	19
3.7 Identificação das amostras de <i>Candida</i> .....	21
3.7.1 Extração do DNA das amostras.....	21
3.7.2 Quantificação do DNA extraído.....	22
3.7.3 Amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase).....	23
3.7.4 Análise filogenética e construção da árvore filogenética.....	23
3.8 Análise dos resultados.....	24
4 RESULTADO .....	25
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICES.....	45
ANEXO.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LH	Linfoma Hodgkin
LNH	Linfoma não Hodgkin
MM	Mieloma Múltiplo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TA	Transplante autólogo
TCG	Tumor de células germinativas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	Transplante de Células-tronco Hematopoiéticas
TMO	Transplante de Medula Óssea
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Silva RF. Prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2016.

## RESUMO

Micro-organismos como fungos do gênero *Candida*, são habitantes comensais da cavidade bucal; em condições normais, co-existem com a microbiota normal sem provocar doenças. Entretanto, alterações locais ou sistêmicas como imunossupressão, desequilíbrio da microbiota oral, hipossalivação e mucosite, secundárias ao tratamento quimioterápico, predispõem pacientes com câncer a um alto risco de infecções fúngicas orais e sistêmicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de pacientes onco-hematológicos submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH). Foram avaliados 27 pacientes, nos períodos pré, e pós-transplante. As amostras da cavidade bucal foram obtidas pela técnica de enxágüe bucal e semeadas em Chromagar *Candida* para triagem das cepas isoladas. Após o crescimento, foi extraído o DNA e submetido a identificação molecular (PCR) utilizando iniciadores para os genes ribossomais dessa levedura. Após a amplificação do fragmento esperado, as cepas foram sequenciadas utilizando sequenciador automático. Para análise descritiva e estatística dos resultados obtidos, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Em seguida, o teste de variância Wilcoxon foi utilizado. A significância adotada foi de 5%. *Candida* spp foi encontrada em 40,74% (11 pacientes), sendo que 2 (18,18%) possuíam mais de uma espécie, dos 9 pacientes colonizados por apenas uma espécie, 7 eram portadores de *Candida albicans* (77,77%) e 1 *Candida dubliniensis* (11,11%) e 1 *C. krusei* (11,11%). As colonizações mistas, nos outros dois pacientes, foram compostas de *C. albicans* + *C. glabrata*; *C. albicans* + *C. dubliniensis*. Na segunda coleta (C2), 9 (81,81%) dos portadores de *Candida* permaneceram colonizados, inclusive por espécies não albicans. A homologia na identificação das espécies com cepas padronizadas foi de 85 a 99%. Dentro das condições deste trabalho foi possível determinar, com precisão as espécies de *Candida* na cavidade oral dos pacientes, bem como observar que o uso profilático de clorexidina tópica não elimina a colonização alertando para possibilidade de infecções sistêmicas.

Palavras-chave: Candidíase. Quimioterapia. Transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Silva RF. Prevalence of Candida spp. in the oral cavity of patients undergoing autologous hematopoietic stem cells transplantation [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2016.

## ABSTRACT

Microorganisms such as fungi of the genus Candida, are commensal inhabitants of the oral cavity; under normal conditions co-exist with normal microflora without causing disease. However, local or systemic changes such as immunosuppression, imbalance in the oral microbiota, hyposalivation and mucositis, secondary to chemotherapy, predispose cancer patients at high risk of oral and systemic fungal infections. The aim of this project is to evaluate the presence of Candida species in the oral cavity of hematological malignancies patients undergoing autologous transplantation of hematopoietic stem cells (HSCT). We evaluated 27 patients in pre- and post-transplant. Samples of the oral cavity were obtained by oral rinse technique and plated on Chromagar Candida for screening of the strains. After growth, the DNA was extracted and subjected to molecular identification (PCR) using primers for the ribosomal genes in this yeast. After amplification of the expected fragment, the strains were sequenced using the sequencer automático. For descriptive and statistical analysis of the results, the data will be submitted to the Shapiro-Wilk test for evaluation of normality. Then the variance Wilcoxon test was used. The significance of 5% was adopted. Candida spp. was found in 40.74% (11pacientes), and 2 (18.18%) had more than one species, of the 9 patients colonized by only one species, 7 patients had Candida albicans (77.77%) and 1 Candida dubliniensis (11.11%) and 1 C. krusei (11.11%). Mixed settlements, in the other two patients were composed of C. albicans + C. glabrata; C. albicans + C. dubliniensis. In the second collection (C2), 9 (81.81%) of Candida carriers remained colonized, including by non albicans species. The homology identification of species standardized strains was 85 99%. Within the conditions of this study it was possible to determine with precision the species of Candida in the oral cavity of patients, and noted that the prophylactic use of topical chlorhexidine does not eliminate the possibility of colonization warning of systemic infections

Keywords: Candidiasis. Chemotherapy. Hematopoietic stem cell transplantation.

## 1 INTRODUÇÃO

O transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), comumente conhecido como transplante de medula óssea (TMO), tem sido uma importante modalidade de tratamento para várias doenças hematológicas malignas como leucemias aguda e crônica, síndromes mielodisplásicas, desordens mieloproliferativas, mieloma múltiplo, linfomas não-Hodgkin, assim como outras doenças não malignas como a anemia aplástica (Wong, 2014). Consiste na administração de altas doses de quimioterapia seguida da infusão de células-tronco hematopoiéticas (CTH) provenientes da medula óssea ou do sangue periférico do próprio paciente (transplante autólogo) ou de um doador (transplante alogênico). (Massumoto, Mizukami, 2000). Os intensos protocolos de quimioterapia têm o potencial de provocar efeitos adversos debilitantes, que não só diminuem a qualidade de vida dos pacientes, mas também aumentam a sua morbidade e mortalidade.

Atualmente os transplantes autólogos são realizados quase exclusivamente com CTH obtidas do sangue periférico, pois em relação à medula óssea, apresenta as vantagens de oferecer uma recuperação hematopoiética mais rápida, podem ser coletadas sem anestesia geral e sem necessidade do emprego de técnicas invasivas. São obtidas por meio de separadores celulares que coletam um grande número de leucócitos do sangue periférico, através de leucoaféreses. (Massumoto, Mizukami, 2000; Copelan, 2006). O marcador CD34 é uma glicoproteína de superfície, expressa em células progenitoras e linfematopoiéticas imaturas, em células endoteliais e em fibroblastos embriônicos. As células CD34+ da medula óssea correspondem a 1,5% das células mononucleares medulares, mas contêm precursores para todas as linhagens linfematopoiéticas. Os anticorpos CD34, especificamente, detectam uma média de apenas 1,5% de células mononucleares de baixa densidade, de aspirados de medula óssea de doadores normais. Em contraste, há menos de 0,5% de células CD34+ no sangue periférico não mobilizado. As células-tronco hematopoiéticas podem ser mobilizadas da medula óssea através de quimioterapia ou da associação desta com fatores de crescimento. Empregando a mobilização com quimioterapia, a porcentagem de células CD34+

pode aumentar para 1% a 5%. A contagem de células CD34+ pode prever a recuperação de células progenitoras, que podem ser coletadas por leucoaférese (Massumoto, Mizukami, 2000; Copelan, 2006).

O transplante autólogo com células tronco-hematopoiéticas mobilizadas para o sangue periférico, produz um período de neutropenia significativamente inferior ao verificado no transplante alogênico de medula óssea, acarretando uma frequência muito menor de infecções bacterianas e fúngicas na fase pós-transplante. Entretanto, essas infecções podem constituir problema, quando se depletam células imunocompetentes do transplante, como pela seleção positiva de células CD34 (Massumoto, Mizukami, 2000).

No Brasil o TCTH autólogo com utilização de CTH provenientes da medula óssea ou do sangue periférico pode ser indicado em pacientes com idade inferior ou igual a 75 anos nas seguintes situações:

- a) leucemia mielóide aguda (LMA) em primeira ou segunda remissão;
- b) linfoma não Hodgkin (LNH) de graus intermediário e alto, indolente transformado e quimiossensível, como terapia de salvamento após a primeira recidiva;
- c) linfoma Hodgkin (LH) quimiossensível, como terapia de salvamento, excluídos os doentes que não se beneficiaram de um esquema quimioterápico atual;
- d) mieloma múltiplo (MM);
- e) tumor de célula germinativa (TCG) recidivado, quimiossensível (excluídos os doentes que não se beneficiaram de um esquema quimioterápico atual);
- f) neuroblastoma em estágio IV e/ou alto risco o (estádio II, III e IVS com nMyc amplificado) em pacientes com idade igual ou maior do que 6 meses, desde que bom respondedor à quimioterapia em primeira terapia (Callera et al., 2013).

Vários fatores predisponentes, relacionados à doença de base, aos tipos e às complicações do transplante de CTH influenciam o perfil das infecções que acometem os pacientes submetidos ao procedimento (Nucci, Maiollino, 2000).

A quimioterapia provoca efeitos secundários orais e sistêmicos como imunossupressão, desequilíbrio da microbiota oral, hipossalivação e mucosite que predis põem os pacientes a um alto risco de infecções fúngicas e bacterianas; outras complicações orais incluem estomatites, sangramento, dor, perda de função e xerostomia, problemas nutricionais e neurológicos (Lalla et al., 2010; Wong, 2014; Lerman et al., 2008).

Segundo Lerman et al. (2008), *Candida albicans* são habitantes comensais da cavidade bucal de 34 a 68% da população saudável; podendo provocar infecções locais e ou sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, principalmente sob uso de quimioterapia (Lalla et al., 2010; Sardi et al., 2013; Willians, Lewis, 2011).

As formas pseudomembranosa e eritematosa, são as manifestações clínicas de candidose oral mais comuns em pacientes oncológicos. Podem ser assintomáticas ou associadas a alterações como sensação de ardência bucal, despapilamento da língua, desconforto, e alterações no paladar, o que tem um impacto significativo na qualidade de vida e na ingestão alimentar dos pacientes cujo bom estado nutricional é imprescindível. Além disso a candidose oral pode se disseminar sistemicamente, após atingir a orofaringe ou através das lesões de mucosite, o que pode ser fatal (Lalla et al., 2010; Lerman et al., 2008).

As infecções por fungos do gênero *Candida* acontecem principalmente durante o período de neutropenia, quando a fagocitose está seriamente comprometida. As espécies de *Candida* são responsáveis pela maioria das fungemias em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas. Em seus estudos, Nucci et al. (2013) e Park et al. (2016) indicaram micro-organismos do gênero *Candida*, como causa comprovada de infecção fúngica sistêmica em 0,6% e 0,8 % respectivamente, dos pacientes submetidos a transplante autólogo de CTH. Enquanto, anteriormente, *Candida albicans* era a espécie prevalente nas infecções, atualmente, as espécies não albicans são tão ou mais frequentes, especialmente *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. Estas duas últimas têm seu aumento atribuído, ao menos parcialmente, ao uso profilático de fluconazol ao qual são resistentes (Nucci, Maiollino, 2000; Pfaller, Diekema, 2007; Westbroock et al., 2013; Fathi et al., 2016).

Segundo Pfaller e Diekema (2007), mais de 17 espécies diferentes do gênero *Candida* são conhecidas como agentes etiológicos de infecções em

humanos, entretanto mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

As complicações orais advindas da quimioterapia, agudas ou tardias, podem se desenvolver devido ao dano direto aos tecidos orais, ou por danos indiretos causados pela toxicidade sistêmica principalmente imunossupressão. As infecções fúngicas se relacionam tanto a reações agudas como tardias, devido a alterações na microbiota oral, diminuição da imunidade sistêmica e disfunções de glândulas salivares (Haverman et al., 2014; Fischer, Epstein, 2008).

A mucosite oral é uma complicação aguda comum da quimioterapia; manifesta-se como eritema ou ulceração da mucosa oral, sendo uma condição dolorosa e debilitante que aumenta o risco de infecções locais e sistêmicas. É caracterizada por uma reação inflamatória tóxica que pode ocorrer por exposição a agentes quimioterapêuticos e / ou radiações ionizantes. É comum durante a terapia oncológica, e é a mais comum complicação e causa de dor na cavidade oral em pacientes submetidos a TCTH autólogo ou alogênico, com uma frequência de 75% - 99% . (Epstein, Shubert\*, 1999 citado por Patussi et al., 2014)

Os quimioterápicos podem causar danos transitórios nas glândulas salivares, 40% dos pacientes relatam hipossalivação durante o tratamento. Além do desconforto, a hipossalivação pode ocasionar disfagia, dificuldades de fala, deglutição e alterações no paladar. Sem os efeitos lubrificantes da saliva, os tecidos intraorais tornam-se friáveis e suscetíveis a inflamação e infecções bacterianas e fúngicas especialmente pelo gênero *Candida* (Fischer, Epstein, 2008; Epstein et al., 2009).

A prevalência de colonização fúngica da cavidade oral de pacientes oncológicos é de 48,2% pré-tratamento, 72,2% durante o tratamento e 70,1% após o tratamento. A prevalência clínica de candidose oral em pacientes com câncer é estimada em 7,5% no período pré-tratamento, 39,1% durante o tratamento e 32,6 % após o fim da terapia (Lalla et al., 2010).

Segundo Lalla et al. (2010), *Candida albicans* é relatada como a espécie mais prevalente durante a terapia oncológica (46,2%), seguida de *C. tropicalis* (16,6%), *C glabrata* (5,5%) e *C. krusei* (3%).

---

\*Epstein JB, Shubert MM. Oral mucositis in myelosuppressive cancer therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999 Sep; 88(3):273-6. 1997 apud Patussi et al, Clinical assessment of oral mucositis and candidiasis compare to chemotherapeutic nadir in transplanted patients. Braz Oral Res. 2014, 28(1):1-7

Em seus estudos Westbrook et al. (2013) mostraram que 42% dos pacientes durante TCTH apresentavam colonização fúngica da cavidade bucal. Dentre as nove diferentes espécies encontradas, *C. albicans* e *C. glabrata* foram as espécies predominantes; a taxa de colonização por múltiplas espécies foi de 13% e *C. glabrata* estava presente em 93% destes casos. Apesar do uso profilático de fluconazol pré-transplante, 45% dos pacientes permaneciam colonizados no dia do transplante que ocorria em média 5,5 dias após o início do medicamento.

O manejo das infecções fúngicas orais em pacientes oncológicos envolve o uso profilático de antifúngicos tópicos e sistêmicos. Em geral, os agentes tópicos são preferidos devido ao menor risco de efeitos colaterais e interações medicamentosas. É comum o uso de bochechos com soluções de nistatina, a desvantagem é o curto contato com os tecidos orais e reclamações em relação ao seu gosto, o que tende a desestimular o uso (Lalla et al., 2010).

A identificação laboratorial de *Candida* spp a partir de culturas, pode se obtida através da caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica; ou por técnicas moleculares que fornecem resultados mais rápidos, mais precisos e muitas vezes menos onerosos.

Meios de cultura cromógenos como o HiCrome *Candida*<sup>®</sup> oferecem uma ferramenta de triagem sendo utilizados para identificação presuntiva de espécies de *Candida* de acordo com a cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos (Madhavan et al., 2011). Técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e o sequenciamento genético, apresentam altas sensibilidade e especificidade e oferecem resultados mais rapidamente.

Considerando-se a importância do gênero *Candida* como patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos, bem como a variabilidade no perfil de resistência das espécies, a identificação precisa dessas espécies se faz de extrema importância para que de maneira segura sejam prevenidos e tratados, priorizando a necessidade de assegurar ao paciente oncológico, menores complicações e melhores condições de saúde durante o processo de tratamento antineoplásico.

## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a prevalência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de pacientes onco-hematológicos anterior e posterior ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TCTH).

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos foram:

- a) correlacionar os achados microbiológicos com dados clínicos dos pacientes submetidos a TCTH;
- b) identificar e sequenciar as cepas do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal dos pacientes TCTH utilizando primers para região ribossomal ITS2;
- c) comparar as sequências de DNA obtidas e avaliar a similaridade através da análise filogenética;
- d) avaliar a eficiência do tratamento profilático adotado.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICT/UNESP São José dos Campos e aprovado sob o parecer de número 924.097 (ANEXO A).

#### 3.2 Grupo de estudo

O trabalho foi realizado com 27 pacientes submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas, provenientes do setor de Onco-hematologia do Hospital Pio XII\* de São José dos Campos-SP, sob a supervisão do Dr. Fernando Callera.

Neste hospital o TCTH segue o seguinte protocolo: a mobilização das CTH (definidas pela presença da proteína de membrana CD34), é realizada utilizando-se quimioterapia em doses baixas (Ciclofosfamida 1500 mg/m<sup>2</sup> por 1 dia) em associação com fator de crescimento de granulócitos (G-CSF 10 mcg/kg por 7 dias). A quimioterapia em altas doses, chamada condicionamento, é realizada conforme o diagnóstico do paciente, sendo:

- a) Melphalan 200mg/m<sup>2</sup> para mieloma múltiplo;
- b) Ciclofosfamida 5000mg/m<sup>2</sup>, BCNU 350mg/m<sup>2</sup> e Etoposide 1500mg/m<sup>2</sup> para linfomas;
- c) Bussulfan 4mg/Kg/dia e Ciclofosfamida 30mg/Kg/dia para leucemias;
- d) Carboplatina 1500mg/m<sup>2</sup> em associação com Etoposide 1500mg/m<sup>2</sup> para tumores germinativos.

---

\*O Hospital Pio XII de São José dos Campos é referência no tratamento de doenças onco-hematológicas, na região do Vale do Paraíba e Litoral Norte de São Paulo. Em 2016, atingiu a notável marca da realização de 300 transplantes de medula desde 2004.

A recuperação medular após a quimioterapia em altas doses é caracterizada pela contagem de neutrófilos acima de  $0,5 \times 10^9/L$  e de plaquetas acima de  $20 \times 10^9/L$ . No período entre a reinfusão das células CD34+ descongeladas e a recuperação medular os pacientes permanecem isolados na unidade de transplante de medula óssea e recebem suporte padronizado incluindo antimicrobianos e antifúngicos, quando necessário, bem como componentes do sangue para reposição de hemoglobina e plaquetas. É adotado o uso profilático de bochechos diários com clorexidina a 0,12%.

### **3.3 Critérios de inclusão**

Foram incluídos os pacientes admitidos para transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas no Hospital Pio XII de São José dos Campos, que concordaram em participar da pesquisa, mediante assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (APÊNDICE A).

### **3.4 Anamnese**

Os indivíduos foram questionados a respeito de dados pessoais e demográficos, condições de saúde geral e bucal, uso medicamentos doença base e/ou associadas, hábito de tabagismo e higiene bucal, uso de próteses e/ou aparelhos ortodônticos; e os dados anotados em uma ficha clínica (APÊNDICE B).

### **3.5 Exame clínico**

Todos os pacientes foram submetidos ao exame clínico para avaliação das condições de saúde bucal. A cavidade oral foi avaliada através de inspeção visual e

palpação digital, quanto à presença de lesões bucais, candidíase, mucosite, uso de próteses e aparelhos ortodônticos. Todos os indivíduos foram examinados pelo mesmo operador e os dados referentes ao exame clínico foram anotados nas fichas clínicas para análise.

Para avaliação geral da saúde bucal foi utilizado o índice CPO-d, índice odontológico que tem por objetivo a contabilização de dentes cariados, perdidos e restaurados (obturados).

Mucosite foi avaliada de acordo com a Escala de Toxicidade oral da Organização Mundial da Saúde (OMS), que se baseia em sinais objetivos (vermelhidão ou eritema, desenvolvimento de úlcera) e sinais subjetivos (capacidade de engolir, sensibilidade da mucosa) e classifica mucosa em quatro tipos: Grau 0, nenhuma mudança observada na cavidade oral durante tratamento; Grau I, presença de dor e eritema na mucosa, gengivas, língua, ou palato; Grau II, presença de eritema e úlceras, ser capaz de se alimentar normalmente; Grau III, presença de úlceras, apenas alimentação "pastosa" é suportada; e grau IV, presença de úlceras, eritema, e dor, tornando impossível alimentação (Tabela 1) (World Health Organization, 1979).

Tabela 1 - Mucosite Escala de Toxicidade Oral da Organização Mundial de Saúde (OMS)

<b>Escala</b>	<b>Alterações clínicas</b>
<b>Grau 0</b>	Sem alterações
<b>Grau I</b>	Dor e eritema
<b>Grau II</b>	Eritema e úlceras
<b>Grau III</b>	Úlceras (apenas dieta líquida)
<b>Grau IV</b>	Incapaz de se alimentar

Fonte: World Health Organization (1979).

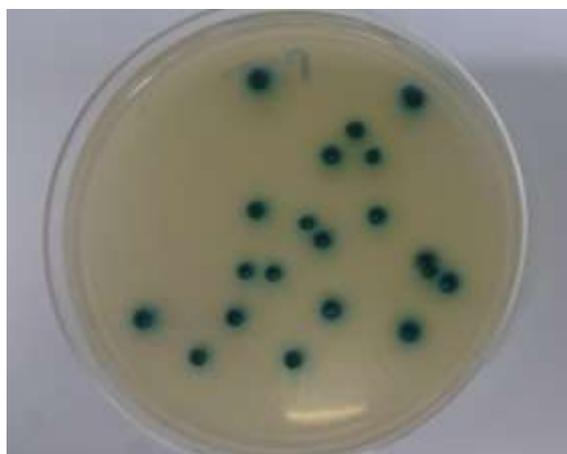
### **3.6 Coleta e processamento das amostras**

Realizou-se 2 coletas por indivíduo, nos períodos pré e pós transplante autólogo células-tronco hematopoiéticas. A primeira coleta ocorreu no momento da internação para o transplante, a segunda coleta ocorreu no momento da aplasia

medular (Nadir: momento do tratamento quimioterápico em que ocorre o menor valor de contagem hematológica) (Patussi et al., 2014). As contagens sanguíneas de neutrófilos absoluta e relativa foram aferidas nestes momentos.

A coleta de material da cavidade bucal foi realizada por meio de enxague bucal com 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%) tamponada com fosfato (PBS 0,1M e pH 7,2 - Gibco) contida em um coletor universal estéril descartável. Os indivíduos realizaram bochecho com a solução durante um minuto, devolvendo em seguida para o mesmo recipiente, que foi mantido em uma bolsa térmica com gelo até ser transportado para o Laboratório de Imunologia e Microbiologia do Curso de Odontologia do Instituto de Ciência Tecnologia de São José dos Campos/UNESP, respeitando-se o período máximo de 3 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, a 4500 rpm em centrífuga (MPW-350, MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido em 2,5 mL de PBS (0,1M e pH 7,2 Gibco) e homogeneizado em agitador de tubos (Vortex, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) por 30 segundos. Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas meio cromogênico HiCrome *Candida* (Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas. Após esse período foi realizado a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). As espécies de *Candida* foram diferenciadas pela cor da colônia em Agar HiCrome *Candida*: verde para *C. albicans*, creme para *C. glabrata*, azul para *C. tropicalis* e roxa para *C. krusei* (Figura 1).

Figura 1 – Crescimento de *Candida spp* em HiCrome *Candida*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para obtenção de culturas puras, cada colônia obtida no meio cromógeno foi semeada, por esgotamento, em ágar Sabouraud dextrose (Difco) e incubada por 24 horas a 37°C. Após o crescimento, as leveduras foram adicionadas ao caldo YPD glicerol por 24 horas a 37°C e posteriormente estocadas em freezer a -70°C (-86°C Ultra-Low freezer, Nuaire, Plymouth, MN, USA).

### **3.7 Identificação das amostras de *Candida***

#### **3.7.1 Extração do DNA das amostras**

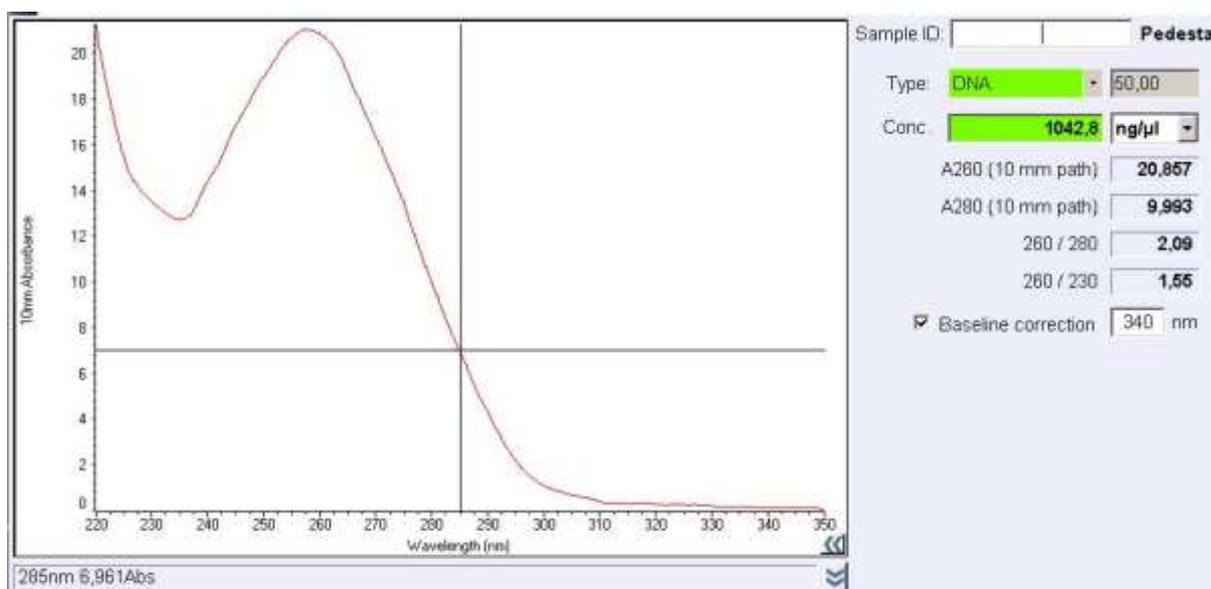
Para a extração de DNA, foi adicionado 100 µl de uma solução de lise da parede celular (0,9 M sorbitol; 0,1 M EDTA; 50 mM dithiothreitol - DTT, Calbiochem, USA; Zymolyase® 165 ug por mL, ICN, USA) em cada tubo. Os tubos foram incubados à temperatura de 37°C por 30 minutos em banho-maria, modelo Q215M2, nº de série: 11050546(Quimis, Diadema/SP, Brasil). Após este período, foram centrifugados a 2.500 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o depósito ressuspenso em outra solução para lise das membranas celulares (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% SDS). Em seguida, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos para a extração total do DNA.

O DNA extraído foi precipitado, acrescentado às amostras 100 µL 5M de acetato de amônio (Quimex, Brasil) e foram mantidas no gelo por 20 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 g. por 15 minutos para remoção de proteínas. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro microtubo contendo 150 µL de isopropanol. O sistema foi homogeneizado e mantido em congelador a -20°C por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 7.500 g. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 80% e centrifugação por 5 minutos a 7.500 g. Os tubos permaneceram abertos em estufa de secagem por 30 minutos para a completa evaporação do etanol. O precipitado foi suspenso em 30 µL de tampão TE (10mM TE, pH 7,5) (Liguori et al., 2007, 2010).

### 3.7.2 Quantificação do DNA extraído

Após os procedimentos de extração foi realizada a quantificação de DNA com o objetivo de obter melhores resultados na amplificação. Um microlitro do produto de extração foi avaliado em espectrofotômetro Nanodrop com medição da sua absorvância em 260 nm (Figura 2). Após aferição, as amostras foram diluídas para a concentração final de 20 ng/μL<sup>-1</sup>.

Figura 2 – Curva de DNA total extraído do biofilme em ng/ μL no espectrofotômetro Nanodrop 2000, com comprimento de onda 260 nm



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.7.3 Amplificação (Reação em Cadeia da Polimerase)

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, 10 mM Tris HCl pH 8,3/50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM de desoxirribonucleotídeo, 0,3 μL de

cada iniciador (10 µM/µL) e 1 U 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 minutos, 40 ciclos de desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento de 62°C por 45 segundos, extensão de 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. 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*, 342 pb para *C. dubliniensis*, 414 pb para *C. glabrata*, 345 pb para *C. krusei* e de 328 pb para *C. tropicalis*.

Em todas as reações foram utilizados DNA molde das cepas ATCCs como controle positivos da reação e um controle negativo, sem adição de DNA molde.

Os fragmentos obtidos foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3730 (Applied Biosystems, Foster/CA, EUA), utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) pela empresa Myleus Biotechnology.

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do software Chromas 2.4 (Technelysium Pty Ltda, South Brisbane, Austrália).

### **3.7.4 Análise filogenética e construção da árvore filogenética**

Após a edição, as sequências foram comparadas com sequências referência do banco de dados do GenBank\* e a detecção de identidade pelo programa BLAST/

---

\* Disponível em: [www.ncbi.nlm.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.gov/genbank/)

NCBI/ GENBANK<sup>‡</sup>. O alinhamento foi realizado com o auxílio do programa MAFFT<sup>§</sup> (Kato et al., 2002) e inspeção visual com auxílio do software Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Para a análise filogenética foram utilizados 23 isolados clínicos de leveduras do gênero *Candida* caracterizados molecularmente. A construção das árvores filogenéticas baseada em Maximum Likelihood, utilizando análise de bootstrap com 1000 repetições (Tamura et al., 2011). Para a construção da árvore filogenética utilizou-se também sequências de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) e *C. glabrata* depositadas no banco de dados GenBank\* para comparação com as sequências obtidas.

### 3.8 Análise dos resultados

Foi feita análise descritiva dos dados e para a análise estatística dos resultados obtidos pela técnica de cultivo, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Em seguida, o teste de Wilcoxon foi utilizado. A significância adotada foi de 5%. A presença e o comprimento dos fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose 2% com brometo de etídio (0,5 ug mL<sup>-1</sup>) e visualizadas na presença de luz ultravioleta pelo aparelho transluminador.

---

<sup>‡</sup> Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

<sup>§</sup> Disponível em: <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>

## 4 RESULTADO

Foram avaliados 27 pacientes admitidos para TCTH autólogo no Hospital Pio XII de São José dos Campos, dentre os quais, 12 mulheres (44,44%) e 15 homens (55,56%). Quanto à patologia, 19 pacientes (70,37%) eram acometidos por MM, 3 (11,11%) por TCG, 2 por LH (7,4%), 2 (7,4%) por LNH, e 1(3,7%) por LMA. A faixa etária variou de 25 a 70 anos, idade média de 53,48 anos (Tabela 2).

O índice de CPO-d calculado, apresentou média geral de 15,37 ; nos pacientes de 35 a 44 anos, o CPO-d médio foi de 10 e nos idosos de 65 a 74 anos, o CPO-d médio calculado correspondeu a 20,42.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes transplantados

<b>Características</b>	<b>Resultado</b>
<b>Pacientes</b>	27
<b>Idade</b> Média (anos)	53,48 (faixa etária 25 a 70)
<b>Sexo</b>	Masculino - 15 (55,56%) Feminino - 12 (44,44%)
<b>Diagnóstico</b>	Mieloma Múltiplo – 19 (70,37%) Tumor Células Germinativas – 3 (11,11%) Linfoma de Hodgkin - 2 (7,4%) Linfoma não Hodgkin – 2 (7,4%) Leucemia Mielóide Aguda – 1 (3,7%)

Fonte: elaborado pelo autor.

Não houve observação de sinais clínicos de candidose bucal em nenhum paciente, em nenhum momento das coletas.

Não houve ocorrência de mucosite Grau II ou superior, durante o período estudado; 4 pacientes relataram desconforto e dor em boca no momento da coleta 2, caracterizando mucosite Grau I, nenhum deles era portador de *Candida spp* no

momento anterior durante a coleta 1; um desses paciente apresentou colonização por *C. albicans* na segunda coleta.

Na primeira coleta, no momento da internação (C1) dos 27 pacientes, 11 (40,74%) eram portadores de uma ou mais espécies do gênero *Candida*, nos demais 16 (59,26%) não houve crescimento fúngico. Dos 11 pacientes portadores de *Candida spp* na cavidade bucal, 2 (18,18%) possuíam mais de uma espécie, dos 9 pacientes colonizados por apenas uma espécie, 7 eram portadores de *Candida albicans* (77,77%) e 1 *Candida dubliniensis* (11,11%) e 1 *C. krusei* (11,11%). As colonizações mistas, nos outros dois pacientes, foram compostas de *C. albicans* + *C. glabrata*; *C. albicans* + *C. dubliniensis*. O tempo médio decorrido entre a primeira e a segunda coleta foi de 10,3 dias.

Na segunda coleta (C2), durante a fase de aplasia medular onde a contagem neutrófilos é igual a zero, 9 (81,81%) dos portadores de *Candida* permaneciam colonizados, e apenas o paciente número 9 (P9) em que não houve crescimento em C1, passou a ser colonizado pelo microrganismo (Tabela 3).

Dois pacientes, evoluíram ao óbito no decorrer do tratamento, após a segunda coleta. Não houve a comprovação de infecções fúngicas sistêmicas, porém esta causa não pode ser descartada Quanto às contagens de Unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.

Tabela 3 - Espécies de *Candida* identificadas pelo sequenciamento genético

Amostra	Paciente	Coleta	Abreviatura	Identificação da espécie pelo sequenciamento	Quantidade de pares de bases (PB) sequenciadas
1	1	1 <sup>a</sup>	P1C1. A	<i>C. glabrata</i>	198 pb
2	1	1 <sup>a</sup>	P1C1. B	<i>C. albicans</i>	210 pb
3	1	2 <sup>a</sup>	P1C2. A	<i>C. glabrata</i>	171 pb
4	1	2 <sup>a</sup>	P1C2. B	<i>C. albicans</i>	208 pb
7	2	1 <sup>a</sup>	P2C1	<i>Pichia kudriavzevii</i> ( <i>C. krusei</i> )	240 pb
8	2	2 <sup>a</sup>	P2C2	<i>C. albicans</i>	150 pb
9	7	1 <sup>a</sup>	P7C1. A	<i>C. albicans</i>	153 pb
10	7	1 <sup>a</sup>	P7C1. B	<i>C. albicans</i>	145 pb
11	7	2 <sup>a</sup>	P7C2	<i>C. albicans</i>	146 pb
12	9	2 <sup>a</sup>	P9C2	<i>C. albicans</i>	546 pb
13	14	1 <sup>a</sup>	P14C1	<i>C. albicans</i>	268 pb
14	14	2 <sup>a</sup>	P14C2	<i>C. albicans</i>	266 pb
16	16	1 <sup>a</sup>	P16C1	<i>C. albicans</i>	309 pb
17	18	1 <sup>a</sup>	P18C1	<i>C. albicans</i>	247 pb
18	18	2 <sup>a</sup>	P18C2	<i>C. albicans</i>	248 pb
19	19	1 <sup>a</sup>	P19C1. A	<i>C. albicans</i>	321 pb
20	19	1 <sup>a</sup>	P19C1. B	<i>C. dubliniensis</i>	323 pb
21	19	1 <sup>a</sup>	P19C1. C	<i>C. dubliniensis</i>	304 pb
22	19	2 <sup>a</sup>	P19C2	<i>C. dubliniensis</i>	240 pb
23	20	1 <sup>a</sup>	P20C1. A	<i>C. albicans</i>	240 pb
24	20	2 <sup>a</sup>	P20C2	<i>C. albicans</i>	237 pb
25	25	1 <sup>a</sup>	P25C1	<i>C. dubliniensis</i>	314 pb
26	26	1 <sup>a</sup>	P26C1	<i>C. albicans</i>	288pb
27	26	2 <sup>a</sup>	P26C2	<i>C. albicans</i>	291 pb
28	27	1 <sup>a</sup>	P27C1	<i>C. albicans</i>	210 pb
29	27	2 <sup>a</sup>	P27C2	<i>C. albicans</i>	197 pb

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Contagem de UFC/mL

Paciente (n°)	Uso de Prótese	Coleta 1 (UFC/mL)	Coleta 2(UFC/mL)
1	Sim	2960	93
2	Não	210	1820
7	Não	85	7
9	Não	0	10
14	Sim	77	10
16	Sim	227	0
18	Não	123	10
19	Não	663	230
20	Não	77	37
25	Não	170	0
26	Não	153	17
27	Sim	43	3

Fonte: Elaborado pelo autor.

De cada amostra clínica obtida nas coletas 1 e 2, caracterizados molecularmente, obteve-se o alinhamento e análise filogenética. Os resultados demonstraram 90 a 96% de homologia entre as espécies identificadas e encontram-se nas Figuras 3 a 21.

Figura 3 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 1, utilizando o software MaFFT(v.7)

```

Seq_ID_P1C1_A 1 GTTTGAGCGGTGATTTCC-TTCTCAAAGCAATGTGTTCCTAAGTGAATGATCTCCATTTG---AGTTAAGTTGAAATTGTAAGCCA-----ATCAGATGTTGGACA 104
Seq_ID_P1C2_A 1 GTTTGAGCGGTGATTTCC-TTCTCAAAGCAATGTGTTCCTAAGTGAATGATCTCCATTTG---AGTTAAGTTGAAATTGTAAGCCA-----ATCAGATGTTGGACA 104
Seq_ID_P1C1_B 1 - -TTGAGCGGTGATTTCTAGCGTCAAAG-GCTGACCTTGGTGTGAGCA-GAGGACTTGAATTTCTTGAAG-AGGTG-C-CCCAAGCCGGGAGCGGATTCACAGGC 113
Seq_ID_P1C2_B 1 GTTTGAGCGGTGATTTCC-TTCTCAAAG-GCTGACCTTGGTGTGAGCA-GAGGACTTGAATTTCTTGAAG-AGGTG-C-CCCAAGCGGTGATCGGATTCAGAGTCTACGGC 114

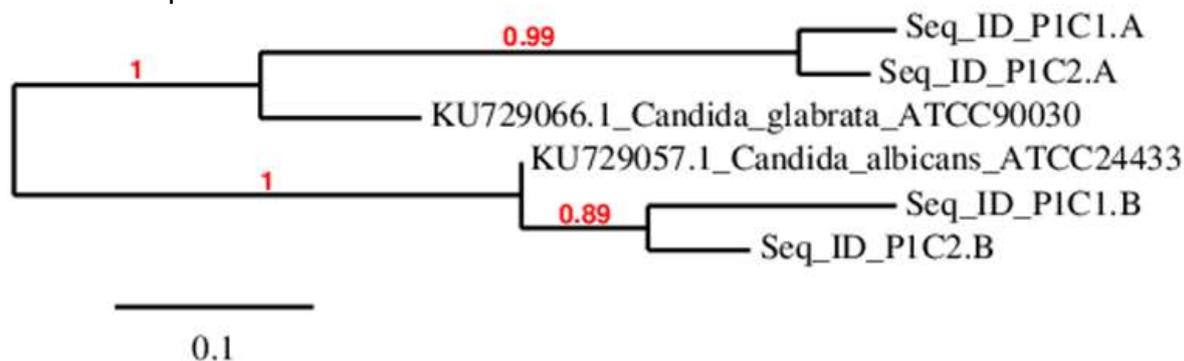
Seq_ID_P1C1_A 105 CAAAGGCAGAGCTTCTAATAAACTCAAAAAGAGCGG-CCTACTCCAAACACAAATGTGTGATATGATGACGGCTCAACAGGCA---TG 198
Seq_ID_P1C2_A 105 TAAAGGCAGAGCTTCAATTAACCTCCAGCAGAGTGCGGACCTACTCCAAACAAATGTGTG----- 171
Seq_ID_P1C1_B 114 TAAAGAAACACTTTCGTTTCGGCGGGCCAGGAGCCACAAAAATTTCAACTTTGACCCAAAACAGGTCGG-TTACCAGCTGATTTAAGCATATCA 210
Seq_ID_P1C2_B 115 TAAAGAAACACTTTCGTTTCGGCGGGCCAGGAGCCACAAAAATTTCAACTTTGACCCAAAACAGGTTAGGACTACCAGCTGACTTAAG---CA 208

```

Legenda: A porcentagem de identidade entre as sequências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idêntico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 1



Legenda: Os números em vermelho indicam o grau de similaridade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 2, utilizando o software MaFFT(v.7)

```

Seq_ID_P2C1      1 c-----cagggcggggg-----12
Seq_ID_P2C2      1 cggaaagtaatatgatgcagatattcgtgcatcatcgaatcttgaacgcaca53

Seq_ID_P2C1      13 -----cgtacccttacctttttaccatgtcgcgcgctccttcaactct55
Seq_ID_P2C2      54 ttgcgccctctggatattccggagcc ttggctagattgagcgtcggttcttccct106

Seq_ID_P2C1      56 cttttcaaa gaccttttca tctttccttcacagctcttgttcgctatcgggtctc108
Seq_ID_P2C2      107 atcacgc t gacctttgctt-----127

Seq_ID_P2C1      109 tcgccagtatttagccttagatggaatttaccaccgccttgagatgcatc161
Seq_ID_P2C2      128 -----gag-----c131

Seq_ID_P2C1      162 caaac cactc gactc gtttagagggggc taaaagattcagcaggcatcccaggg214
Seq_ID_P2C2      132 caagc gactt gactc-----146

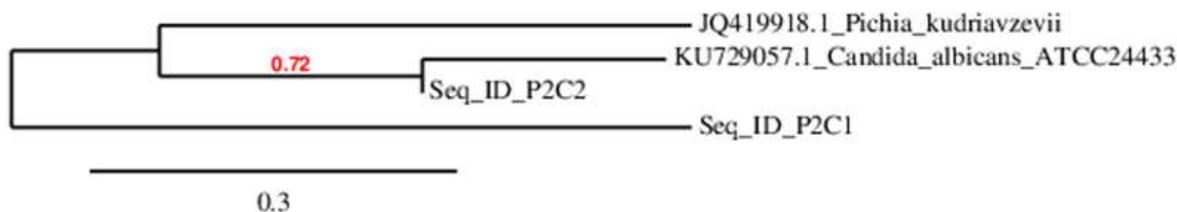
Seq_ID_P2C1      215 gcttcaccctcctggcgccctgttc240
Seq_ID_P2C2      147 -----ggat150

```

Legenda: A porcentagem de identidade entre as seqüências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idêntico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 2



Legenda: Os números em vermelho indicam o grau de similaridade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

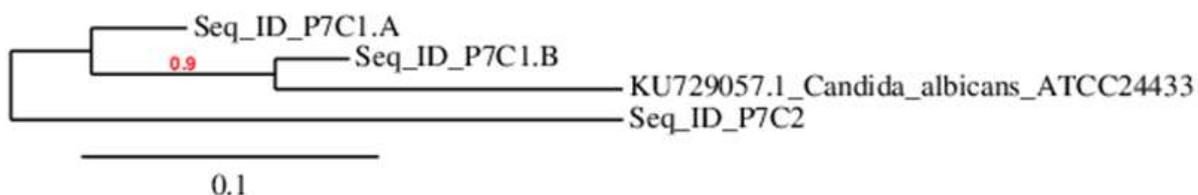
Figura 7 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 7, utilizando o software MaFFT(v.7)



Legenda: A porcentagem de identidade entre as sequências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idênticas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

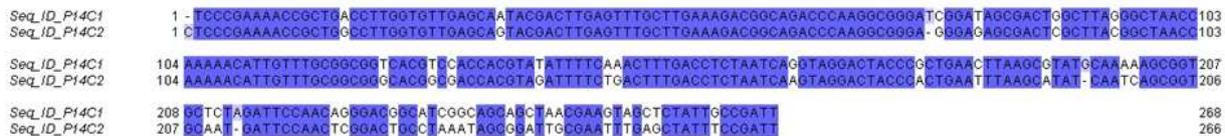
Figura 8 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 7



Legenda: Os números em vermelho indicam o grau de similaridade.

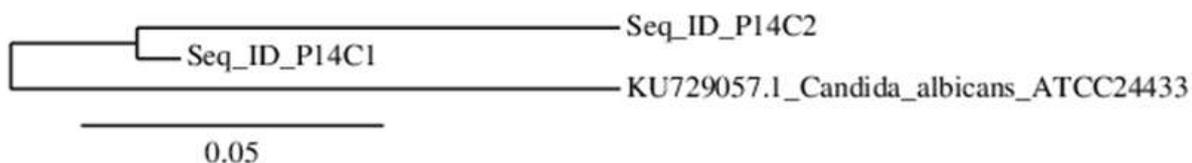
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 14, utilizando o software MaFFT(v.7)



Legenda: A porcentagem de identidade entre as sequências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idêntico.  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 14



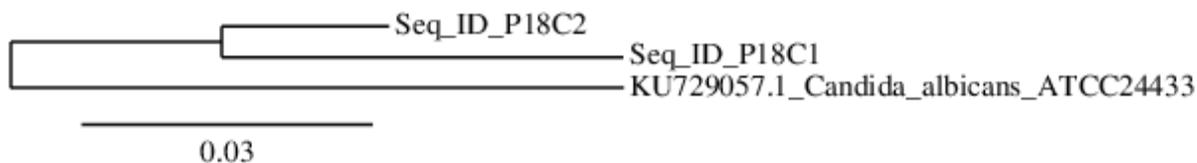
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 18, utilizando o software MaFFT(v.7)



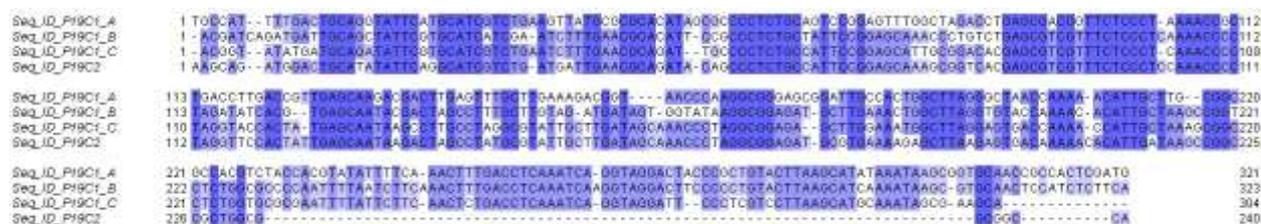
Legenda: A porcentagem de identidade entre as sequências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idêntico.  
 Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 – Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 18



Fonte: Elaborado pelo autor.

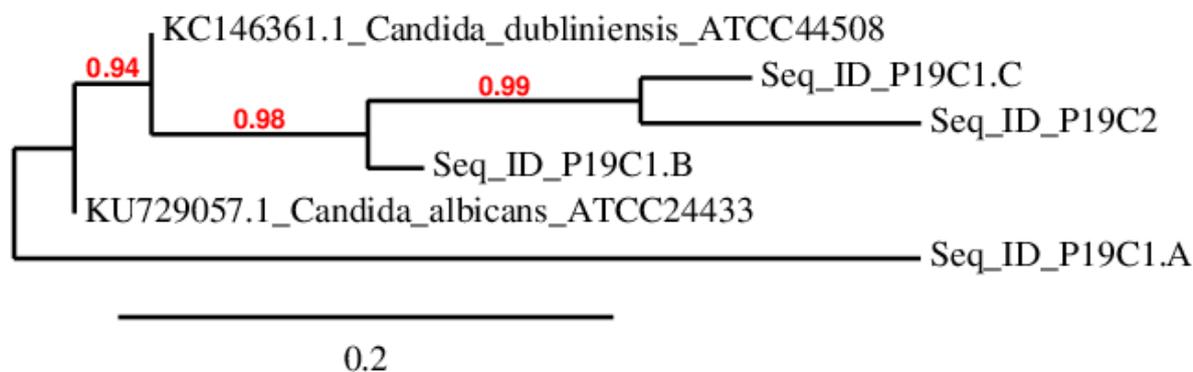
Figura 13 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 19, utilizando o software MaFFT(v.7)



Legenda: A porcentagem de identidade entre as sequências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idêntico.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 19

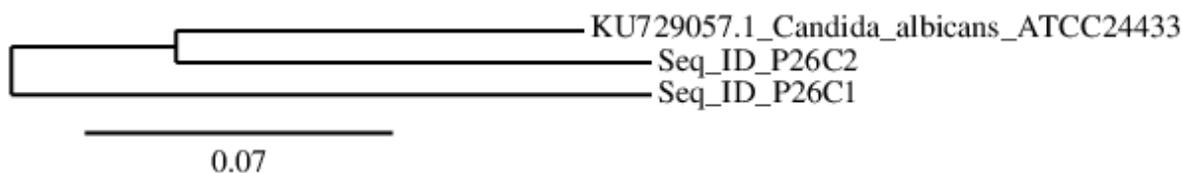


Legenda: Os números em vermelho indicam o grau de similaridade.

Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 18 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 26



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Alinhamento das sequências nucleotídicas parciais da região ITS2 dos isolados clínicos do paciente 27, utilizando o software MaFFT(v.7)

```

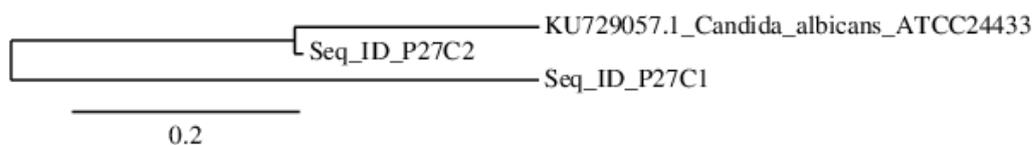
Seq_ID_P27C1 1 GGCCTGGTTTGTTCAGCGAGCGACGAAACAGACCTCACACAGGTTGAAATCCCGTGGATGGATGACCCGGCCCTGTGGCAAAATCTTTTCGACGACTCGGGTTGTTG116
Seq_ID_P27C2 1 GAAT---TGGCTTGTTCAGCGAGCGACCTTGGTTGAGLAAATACACTTGAGTTTGGTTGAAAGACGGTAAGCCGAGCGGTGATCTTAAACAATGTTAAAAACAATTC113

Seq_ID_P27C1 117 GAATGCACCTGTGATTCCTGGTAAATTTCTTTTCGAAGCTAAATATGGGCGAGGTAACCAAGCGAGTGAATATGTAAGT 201
Seq_ID_P27C2 114 TTGCGGCGGGGAGCGCTACACATATTTCTAACTTGGCTCA--ATCAGGTAGGACTACCGAATAAGCGAGGCHATAAGT 197
  
```

Legenda: A porcentagem de identidade entre as sequências é indicada pela tonalidade da cor azul, quanto mais escuro mais idêntico.

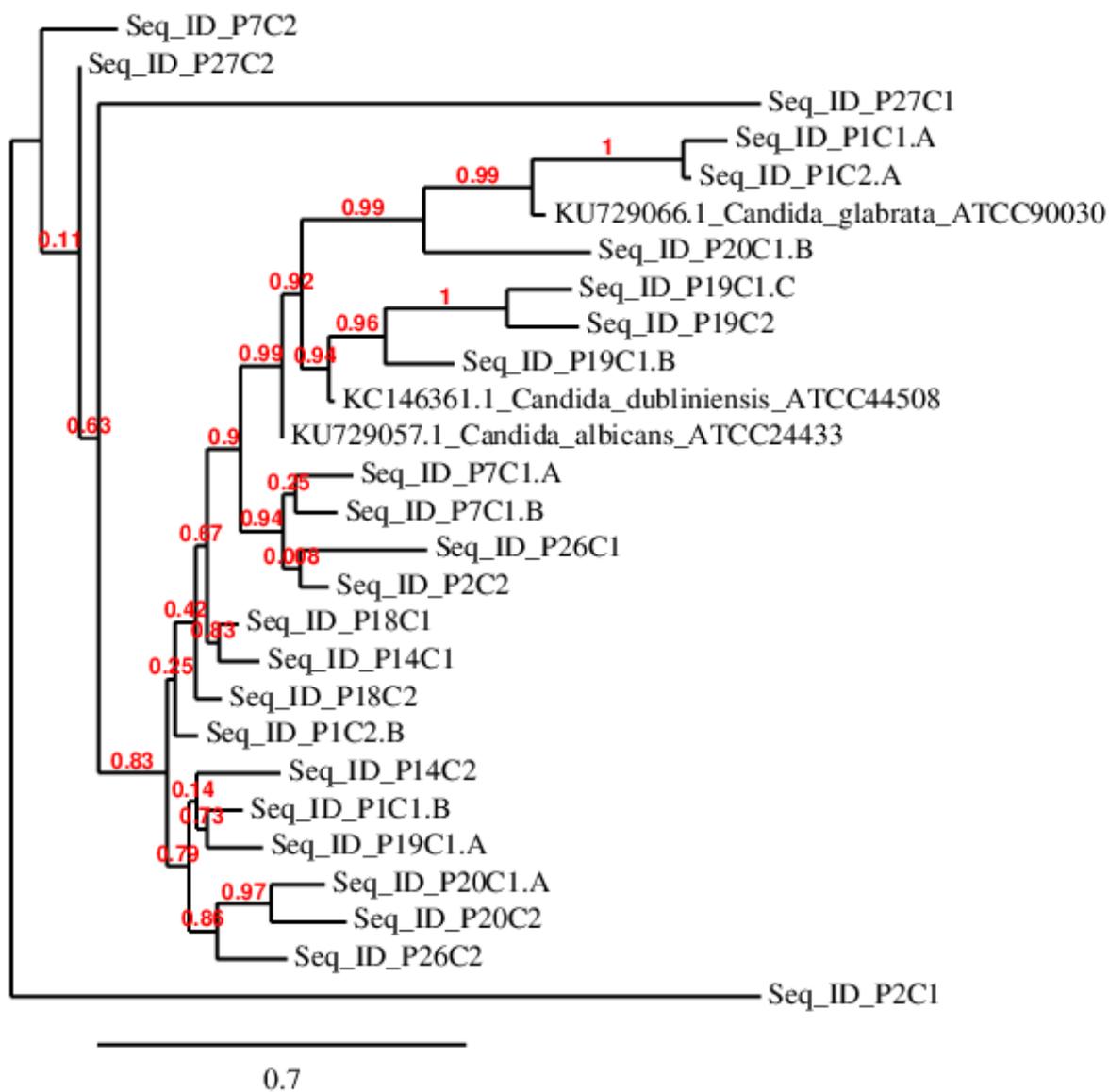
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 - Árvore filogenética construída baseada na similaridade entre os isolados clínicos do paciente 27



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Árvore filogenética de maximum likelihood baseada no alinhamento da região parcial de ITS2 construída com 100 bootstrap, usando o software Phylogeny.fr



Legenda: Os números em vermelho indicam o grau de similaridade.

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

Na avaliação clínica bucal através de inspeção visual e cálculo do índice de CPO-d, pode-se observar que os pacientes apresentavam boas condições de higienização bucal no momento do exame. A opção pelo CPO-d, deveu-se ao fato de tratar-se de método não invasivo, evitando-se a exploração possivelmente traumática por meio de sondagem periodontal em pacientes com perfil hematológico comprometido, nos quais a ocorrência de sangramento está contra indicada. Os valores do índice correspondem aos seguintes graus de severidade: muito baixo (0,0 a 1,1), baixo (1,2 a 2,6), moderado (2,7 a 4,4), alto (4,5 a 6,5) e muito alto (6,6 e mais). Valores elevados indicam más condições de saúde bucal da população, freqüentemente associadas a condições socioeconômicas desfavoráveis, a dificuldade de acesso aos serviços e a hábitos deletérios, como alto consumo de açúcares. Também pode indicar limitado acesso ao flúor (Brasil, 2008).

Nos adultos de 35 a 44 anos, o CPO-d médio no Brasil é de 16,75 , já nos idosos de 65 a 74 anos, o CPO-d médio é 27,53; segundo dados da última Pesquisa Nacional de Saúde Bucal de 2010, realizada pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2011).

Os valores calculados para os índices de CPO-d nos pacientes de 35 a 44 anos (10) e nos idosos de 65 a 74 anos (20,42), encontram-se abaixo das médias nacionais 16,75 e 27,53 respectivamente, mas esta diferença não é estatisticamente significativa para  $p < 0,05$ . Esse resultado equipara o grupo estudado na média nacional para as faixas etárias.

A ocorrência de espécies de *Candida* na cavidade bucal de 40,74% dos pacientes no período pré transplante, encontrada em nossos estudos, é similar aos resultados descritos por Lalla et al. em 2010 e Westbroock et al. em 2013.

A morfologia de cor no meio HiCrome *Candida*, só foi compatível com a espécie *C albicans*, confirmando a capacidade presuntiva para espécie e seletiva para o gênero.

Quanto às diferenças nas contagens de UFC entre a primeira e segunda coletas, o valor-p é 0,034 e o resultado é significativo em  $p \leq 0,05$ . A diminuição dos valores de UFC/mL entre as contagens mostrou-se estatisticamente significativa, mas o uso tópico profilático da clorexidina a 0,12% não foi capaz de eliminar a

colonização fúngica bucal: 9 (81,81%) dos pacientes mantiveram-se colonizados no momento do transplante, um número quase duas vezes maior que achados de Westbrook et al. (2013), que relataram que os 45% dos pacientes permanecem colonizados por *Candida* spp no momento do transplante, provavelmente devido ao tipo de profilaxia adotada. Segundo Ramla et al. (2016), não há uma contagem de UFC/mL que permita diferenciar entre doença e comensalismo, mas altas contagens podem prever a possibilidade do desenvolvimento de infecção. É válido ressaltar os altos valores de UFC/mL encontrados no paciente P1 que é portador de prótese do tipo protocolo superior; este tipo de prótese propicia uma interface palato/prótese de difícil higienização, requerendo cuidados adicionais por parte do paciente, como visitas regulares ao dentista para higienização. Outra observação interessante é o aumento exacerbado da contagem de UFC/mL observado no paciente P2C2, contrariando o comportamento dos demais em que o número de colônias diminuiu entre as coletas; o paciente tinha um perfil não colaborador, recusando-se a fazer os bochechos com clorexidina, podendo dever-se a isso o aumento. Apenas o paciente P9 passou a ser colonizado a partir da segunda coleta, o que coincidiu com relato e mucosite Grau I por parte do paciente; uma justificativa pode ser o tipo de quimioterapia considerada mais agressiva para o Linfoma de Hodgkin, diagnóstico do paciente em questão.

A presença de *Candida* apresentou-se como uma variável independente do uso de prótese, apesar dos relatos da literatura que correlacionam o uso de prótese e a presença de *Candida* spp e candidose oral (Bianchi et al., 2016; Oliveira et al., 2010).

Durante nosso trabalho, não observamos a ocorrência clínica de candidose oral, nem de mucosite Grau II ou mais, não sendo possível correlacionar a ocorrência desses eventos com a neutropenia. Westbrook et al. (2013), não encontraram correlação positiva entre a colonização por *Candida* e a presença ou severidade da mucosite.

Apesar da não comprovação, na ocorrência de óbito em dois pacientes no decorrer do tratamento, não pode ser descartada a implicação de causa fúngica sistêmica. Em seus estudos, Kolbe et al. (1997) não observaram infecções fúngicas sistêmicas, nem infecções fúngicas comprovadas nem prováveis em 66 pacientes

submetidos a quimioterapia de altas doses e transplante autólogo de células-tronco periféricas.

Considerando-se o número total de pacientes (27) durante a primeira coleta, as espécies de *Candida* foram identificadas nas seguintes proporções: *C. albicans* (33,33 %), *C. dubliniensis* (7,4%), *C. glabrata* (3,7%), *C. krusei* (3,7%). A espécie *C. albicans* estava presente em 25,92% dos pacientes como espécie única, um paciente apresentou colonização única por *C. dubliniensis* (3,7%) e um por *C. krusei*; 7,4 % dos pacientes apresentaram colonização por mais de uma espécie: *C. albicans* e *C. glabrata*; e *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Os estudos de Nucci et al. (2010), sugerem uma distribuição geográfica diferente entre a América Latina e o hemisfério norte, para a epidemiologia de candidemia, que no Brasil e países vizinhos depois da *Candida albicans*, as espécies mais prevalentes nas micoses invasivas são a *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, e a *C. glabrata* nos Estados Unidos.

Nossos resultados corroboram com os dados da literatura onde ocorre maior prevalência de *Candida albicans*. A identificação de espécies não- *albicans* é de grande importância, principalmente *C. glabrata* e *C. krusei* serem apontadas por diversos autores como resistentes ao fluconazol (Westbrook et al., 2013; Mohammadi, Foroughifar, 2016; Sardi et al., 2013).

Quanto ao sequenciamento e identificação genética, pode-se observar que todas as amostras apresentaram algum grau de alteração na sequência de nucleotídeos, inclusive dentro da mesma espécie, entre a primeira e segunda coleta. Este é um dado importante, que merece estudos mais aprofundados já que existem relatos de que o tratamento quimioterápico influencia e altera a biologia de *Candida* na cavidade oral de pacientes oncológicos, aumentando a virulência por meio de aumento na adesividade, resistência a antifúngicos, resistência à fagocitose e tempo de sobrevivência na cavidade oral (Ueta et al., 2001; Ramla et al., 2016). O resultado da análise filogenética apresentou 85 a 99% de homologia na comparação das amostras com espécies geneticamente determinadas, indicando uma alta acurácia e confiabilidade na identificação. A identificação molecular tem alta acurácia mostrando-se muito importante na identificação das espécies, permitindo melhor manejo profilático e terapêutico de pacientes imunocomprometidos. Os pacientes P9 e P25 não aparecem nas figuras de alinhamento e árvore filogenética, porque estas

avaliações são comparativas, e estes pacientes apresentaram-se colonizados em apenas uma das coletas, não sendo possível fazer a comparação.

## 6 CONCLUSÃO

Dentro das condições deste trabalho, foi possível identificar o gênero *Candida*, na cavidade bucal de pacientes onco-hematológicos submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas de forma acurada através do sequenciamento genético. O trabalho mostrou-se importante para implementar o manejo profilático e terapêutico dos pacientes oncológicos com vistas a diminuir a morbidade e mortalidade dos mesmos, em relação a presença de *Candida spp* na cavidade oral.

## REFERÊNCIAS\*

Bianchi CMPC, Bianchi HA, Tadano T, Paula CR, Hoffmann-Santos HD, Leite Jr DP et al. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;58:17. doi:10.1590/S1678-946201658017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde/ Secretaria de Vigilância a Saúde. SB Brasil 2010 [internet]. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância à Saúde; 2011 [acesso em 2016 Jul 03]. Disponível em: [http://189.28.128.100/dab/docs/geral/projeto\\_sb2010\\_relatorio\\_final.pdf](http://189.28.128.100/dab/docs/geral/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf)

Brasil. Ministério da Saúde. Fichas de Qualificação da RIPSA [internet]. Brasília (DF): RIPSA; 2008 [acesso em 2016 Set 04]. Disponível em: [http://fichas.ripsa.org.br/2008/D-12/?l=pt\\_BR](http://fichas.ripsa.org.br/2008/D-12/?l=pt_BR)

Callera AF, Silva AM, Callera F. Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas no Vale do Paraíba-SP: aspectos demográficos, clínicos e curvas de sobrevivência. *J Health Sci Inst*. 2013;31(1):7-12.

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 Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *J Clin Microbiol*. 2000 June;38(6):2302–10.

Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1813-26. doi: 10.1056/NEJMra052638.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F et al. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465–W469. doi: 10.1093/nar/gkn180.

Epstein JB, Raber-Drulacher JE, Wilkins A, Chavarria MG, Myint H. Advances in hematologic stem cell transplant: an update for oral health care providers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Mar;107(3):301-12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.12.006>.

Fathi N, Mohammadi R, Tabatabaiefar MA, Ghahri M, Sadrossadati S. Sequence-identification of *Candida* species isolated from candidemia. *Adv Biomed Res*. 2016 Sep 26;5:150. doi: 10.4103/2277-9175.188485.

---

\*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado em 25 de maio de 2016; acesso em 23 outubro de 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Fischer DJ, Epstein JB. Management of patients who have undergone head and neck cancer therapy. *Dent Clin North Am.* 2008 Jan;52(1):39-60, viii. doi: 10.1016/j.cden.2007.09.004.

GenBank. [acesso em 2016 Ago 10]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Haverman TM, Raber-Durlacher JE, Rademacher WM, Vokurka S, Epstein JB, Huisman C, et al. Oral complications in hematopoietic stem cell recipients: the role of inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:378281. doi: 10.1155/2014/378281.

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):3059-66.

Kolbe K, Domkin D, Derigs HG, Bhakdi S, Huber C, Aulitzky WE. Infectious complications during neutropenia subsequent to peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation.* 1997 Jan;19(2):143-7.

Lalla RV, Latortue MC, Hong CH, Ariyawardana A, D'Amato-Palumbo S, Fischer DJ et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. *Support Care Cancer.* 2010 Aug;18(8):985-92. doi: 10.1007/s00520-010-0892-z.

Lerman MA, Laudendach J, Marty FM, Baden LR, Treister NS. Management of oral infections in cancer patients. *Dent Clin North Am.* 2008 Jan;52(1):129-53, ix. doi: 10.1016/j.cden.2007.10.006

Liguori G, Di Onofrio V, Gallé F, Lucariello A, Albano L, Catania MR, et al. *Candida albicans* identification: comparison among nine phenotypic systems and a multiplex PCR. *J Prev Med Hyg.* 2010 Sep;51(3):121-4.

Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol.* 2007 Sep;60(9):1035-9. doi: 10.1136/jcp.2006.040782.

Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. Identification of local clinical *Candida* isolates using microorganism *Candida*™ as a primary identification method for various *Candida* species. *Trop Biomed.* 2011 Aug;28(2):269-74.

Massumoto C, Mizukami S. Transplante autólogo de medula óssea e imunoterapia pós-transplante. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2000 Out/Dez;33:405-14.

Mohammadi R, Foroughifar E. *Candida* infections among neutropenic patients. *Caspian J Intern Med.* 2016 Spring;7(2):71-7.

Nucci M, Maiolino A. Infecções em transplante de medula óssea. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2000 Ju./Set;33:278-293.

Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 1;51(5):561-70. doi: 10.1086/655683.

Nucci M, Garnica M, Gloria AB, Lehugeur DS, Dias VC, Palma LC, et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Aug;19(8):745-51. doi: 10.1111/1469-0691.12002.

Oliveira CE, Gasparoto TH, Dionísio TJ, Porto VC, Vieira NA, Santos CF, Lara VS. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont*. 2010 Mar-Apr;23(2):158-9.

Park S, Kim K, Jang JH, Kim SJ, Kim WS, Chung DR, et al. Randomized trial of micafungin versus fluconazole as prophylaxis against invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Infect*. 2016 Nov;73(5):496-505. doi: 10.1016/j.jinf.2016.06.011.

Patussi C, Sassi LM, Munhoz EC, Zanicotti RT, Schussel JL. Clinical assessment of oral mucositis and candidiasis compare to chemotherapeutic nadir in transplanted patients. *Braz Oral Res*. 2014;28:1-7. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2014.vol28.0050.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133-63. doi:10.1128/CMR.00029-06.

Ramla S, Sharma V, Patel M. Influence of cancer treatment on the *Candida albicans* isolated from oral cavities of cancer patients. *Support Care Cancer*. 2016 Jun;24(6):2429-36. doi: 10.1007/s00520-015-3035-8.

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013 Jan;62(Pt 1):10-24. doi: 10.1099/jmm.0.045054-0.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*. 2011 Oct;28(10):2731-9. doi: 10.1093/molbev/msr121.

Ueta E, Tanida T, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Increase of *Candida* cell virulence by anticancer drugs and irradiation. *Oral Microbiol Immunol*. 2001 Aug;16(4):243-9.

Westbrook SD, Kirkpatrick WR, Wiederhold NP, Freytes CO, Toro JJ, Patterson TF, Redding SW. Microbiology and epidemiology of oral yeast colonization in hemopoietic progenitor cell transplant recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Mar;115(3):354-8. doi: 10.1016/j.oooo.2012.10.012

Willians D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J Oral Microbiol.* 2011 Jan 28;3. doi: 10.3402/jom.v3i0.5771.

Wong HM. Oral complications and management strategies for patients undergoing cancer therapy. *ScientificWorldJournal.* 2014 Jan 8;2014:581795. doi: 10.1155/2014/581795.

World Health Organization. Handbook for reporting results for cancer treatment. Geneva: WHO; 1979.

**APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido**

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de microrganismos do gênero *Candida spp* na boca de pacientes em tratamento quimioterápico submetidos a transplante de medula óssea. Desta forma, é necessário coletar amostras por meio de enxague bucal em recipientes descartáveis e que serão levados ao laboratório Imunologia e Microbiologia, no Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos para serem processados. Este enxague consiste em bochechar solução fisiológica durante 01 minuto. O processamento será passar a amostra para meios de cultura específicos e verificar a presença destes microrganismos. O trabalho é de extrema importância, pois vai fornecer aos médicos e aos dentistas informações necessárias para a prevenção de doenças causadas por estes microrganismos nos pacientes que estão sob o tratamento quimioterápico.

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. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, situada na Av. Eng. Francisco José Longo, 777, CEP 12 245-000, em São José dos Campos, Fone: 39479033 e comunique-se com o coordenador Profa. Dra. Janete Dias Almeida. Informo que será garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

Acredito ter sido esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo, e concordo em participar sabendo quais os propósitos e os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que a minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e com a publicação anônima dos dados gerados por ele. Poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

---

Local e Data

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente

Assinatura do pesquisador





## ANEXO A – Parecer consubstanciado emitido pelo Comitê de ética em Pesquisa em seres humanos ICT – UNESP

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



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. NA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIICAS

**Pesquisador:** Sigmar de Mello Rode

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 36635514.0.0000.0077

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 924.097

**Data da Relatoria:** 18/12/2014

#### Apresentação do Projeto:

Micro-organismos como fungos do gênero *Candida*, são habitantes comensais da cavidade oral; em condições normais, co-existem com a microbiota normal sem provocar doenças. Entretanto, alterações locais ou sistêmicas como imunossupressão, desequilíbrio da microbiota oral, hipossalivação e mucosite, secundárias ao tratamento quimioterápico, predisõem pacientes com câncer a um alto risco de infecções fúngicas orais e sistêmicas. O objetivo desse projeto é avaliar a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de pacientes onco-hematológicos submetidos a transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (TACTH). Serão avaliados 60 pacientes, nos tempos pré, durante e pós transplante. A coleta das amostras da cavidade bucal será realizada pela técnica de enxágüe bucal e serão semeadas em Chromagar *Candida* para contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) e triagem das cepas isoladas. A identificação em nível de espécie será realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex. Para análise estatística dos resultados obtidos pela técnica de cultivo, os dados serão submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade. Em seguida, o teste de variância (Repeated Measure One way ANOVA, ou teste de Wilcoxon) será utilizado. A significância adotada será de 5%

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Cláudio CEP: 12.245-000

UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-5075 Fax: (12)3947-5010 E-mail: ceph@foajc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 924.067

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

- a) avaliar a prevalência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral de pacientes onco-hematológicos submetidos a transplante autólogo de medula óssea;
- b) identificar as espécies de *Candida* isoladas.

**Objetivo Secundário:**

- a) correlacionar a ocorrência clínica de candidose oral e neutropenia a colonização fúngica;
- b) avaliar a eficiência do tratamento profilático adotado.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A autora coloca que não há riscos e o benefício seria dos pacientes identificados como portadores de *Candida* spp, ficarem sinalizados com a possibilidade de necessitarem de tratamento antifúngico sistêmico.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa se mostra de grande relevância, principalmente por se propor a melhorar a qualidade de vida das pessoas que já apresentam tantos comprometimentos. A forma de coleta é bem simples e os resultados esperados se mostram promissores.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram enviados e adequados conforme orientações do parecer anterior.

**Recomendações:**

Que a pesquisa seja realizada com toda responsabilidade e seriedade.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A autora fez as adequações necessárias. Não há pendências neste projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado confirma o parecer do relatora.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Ciríaco CEP: 12.245-000

UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9079 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@foajo.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 926.087

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS, 19 de Dezembro de 2014

---

Assinado por:  
Denise Nicodemo  
(Coordenador)

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777  
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
Telefone: (12)3947-8078 Fax: (12)3947-8010 E-mail: caph@foxc.unesp.br