



**Universidade Federal De Minas Gerais - UFMG**

**Instituto de Ciências Biológicas - Departamento de Microbiologia**

**Lourimar Viana Nascimento Franco de Sousa**

**Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com câncer orogástrico: susceptibilidade a drogas antifúngicas, virulência e perfil de resposta imune**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida de Resende Stoianoff - UFMG

**Co-orientadoras:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kênia Valéria dos Santos - UFES

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Speziali de Faria - UNIVALE

**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**2014**

**Lourimar Viana Nascimento Franco de Sousa**

**Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com câncer orogástrico: susceptibilidade a drogas antifúngicas, virulência e perfil de resposta imune**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Resende Stoianoff - UFMG

**Co-orientadoras:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kênia Valéria dos Santos - UFES

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Speziali de Faria - UNIVALE

**Belo Horizonte - Minas Gerais**

**2014**

## **Colaborações**

Este projeto foi executado em parceria com os Laboratórios de Microbiologia e Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE). Contou, ainda, com a colaboração da Policlínica Municipal e o com o Laboratório Alvarenga, de Governador Valadares/MG. No ICB da UFMG contou com os laboratórios de Micologia e Microbiologia Oral e Anaeróbios.

### **Colaboradores:**

1. Dr. Juan Moisés Zonis - Dentista Estomatologista e Patologista Bucal responsável pela Policlínica Municipal de Governador Valadares/MG. Dentista responsável pela coleta das amostras de leveduras e os fragmentos para a biópsia dos pacientes.
2. Dr. Paulo Bicalho - Médico gastroenterologista, pesquisador e colaborador na realização das coletas dos swabs e biópsia dos pacientes com câncer esofágico e gástrico.
3. Dr<sup>a</sup>. Simone Gonçalves dos Santos - Professora Adjunta no Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ICB - UFMG. Pesquisadora colaboradora na realização dos testes microbiológicos.
4. Dr. Daniel Gomes de Alvarenga - Médico Patologista. Responsável pelo Laboratório Alvarenga, em Governador Valadares/MG, especializado em exames patológicos. Médico responsável pelos diagnósticos citológicos e histológicos.

Lourimar Viana Nascimento Franco de Sousa

**Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com câncer orogástrico: susceptibilidade a drogas antifúngicas, virulência e perfil de resposta imune**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida de Resende Stoianoff – Orientadora  
ICB/UFMG - BH

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiane Yume Koga-Ito  
UNESP/ São José dos Campos - SP

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cleide Viviane Buzanello Martins  
UNIOESTE/ Toledo - PR

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>a. Patrícia Silva Cisalpino  
ICB/UFMG – BH

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danielle Letícia da Silva  
ICB/UFMG – BH

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_.

***Dedico esta. . .***

*... à minha mãe Lourizete por não medir esforços em me auxiliar  
nesta minha caminhada.*

*... ao meu amado esposo José Franco pelo amor, confiança,  
compreensão e indubitável apoio na concretização de mais esta  
etapa em minha vida.*

*.... aos meus filhos Samuel e Ana Laura pelo amor, muita  
compreensão, dedicação, apoio.*

*... aos meus irmãos Sadson e Louriene pelo apoio, incentivo e  
dedicação em todo e qualquer instante.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus em primeiro lugar, pelo sustento durante a minha caminhada, porque sem Ele eu não teria chegado aonde cheguei.

À minha experiente orientadora, Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida de Resende, pela sua dedicação, apoio, responsabilidade, compromisso, compreensão e, acima de tudo, a confiança em me receber mais uma vez em seu laboratório permitindo assim a concretização deste sonho.

À Dr<sup>a</sup>. Kênia Valéria dos Santos, minha co-orientadora, por todo esforço, empenho, tudo quanto fez por mim. Pela amizade, companheirismo, dedicação e atenção, que contribuíram enormemente para a conclusão deste.

À Dr<sup>a</sup>. Elaine Speziali de Faria, que além de co-orientadora foi amiga, companheira, me incentivando e acompanhando, motivando. Meu muito obrigada você é muito especial.

À Dr<sup>a</sup>. Simone Gonçalves dos Santos, pela amizade, apoio, incentivo, conselhos... Valeu!!!!

Ao Dr. Juan Moisés Zones, meu amigo, companheiro de coletas, muito obrigada pelo incondicional apoio, conversas, mudanças em seu horário para me auxiliar no trabalho. Você é dez!!!

Ao Dr. Paulo Bicalho, pela amizade, disposição e grande colaboração, acreditando neste trabalho, coletando amostras para o mesmo.

Ao Dr. Daniel Alvarenga, por acreditar no trabalho, abrir as portas de seu laboratório apoiando e incentivando a realização deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andrea Monteiro, pelo grande apoio, discussões, opiniões... suas contribuições foram fundamentais. Muito obrigada.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Lúcia dos Santos, por ter aberto as portas de seu laboratório, confiando seus alunos Marcus e Patrícia para nos auxiliarem na conclusão deste trabalho.

À Prof. Dr. Daniel de Assis Santos, pela amizade e disponibilidade, contribuições a toda e qualquer situação.

Aos meus tios Glória e Isaías, meus pais adotivos e primo Haendel, pela convivência, companheirismo e amizade durante todo o tempo em que estivemos juntos.

À Maria Geralda, pelo seu incondicional apoio, sempre muito prestativa, compreensiva em olhar as crianças durante todo este tempo. MG, que Deus te abençoe sempre. Muito obrigada.

Aos meus amigos e irmãos em Cristo da Igreja Batista Morada do Vale, em Governador Valadares/MG, pelas orações, apoio sem medida. Que Deus os recompense grandemente.

Ao Rodrigo, por ter aberto mão de seus trabalhos para estar me auxiliando na realização da pesquisa.

À Jaqueline, por ter dedicado semanas, aberto mão de seu tempo para me ajudar na realização dos experimentos. Muito obrigada!

Aos colegas Douglas, Juliana, Marliete pelas conversas, discussões que muito ajudou e colaborou para a realização deste trabalho, pela amizade, valeu mesmo...

À Gabriela, pelas contribuições, apoio para que os experimentos fossem realizados.

Aos colegas do Laboratório de Micologia, muito obrigada por tudo, vocês também fazem parte desta conquista.

Ao Douglas, que quando entrei era o secretário da Pós-Graduação, por toda atenção dispensada durante todo o período em que estive na secretária.

À Elaine Alves, técnica do laboratório de microbiologia da UNIVALE, pela disposição, contribuição e ajuda durante todo o tempo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, cujos ensinamentos foram de grande importância para mim.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da UNIVALE, pelo companheirismo, amizade em todo tempo.

Aos coordenadores de cursos da UNIVALE pela compreensão e apoio durante todo o trabalho.

Aos Professores do Curso de Odontologia da UNIVALE que aceitaram participar deste trabalho fazendo parte do grupo controle.

A todos os funcionários do Núcleo de Especialistas em Oncologia (NEO), em Governador Valadares/MG, do setor de quimioterapia, na pessoa da Enfermeira Patrícia gostaria de agradecer a todos, pela colaboração em todas as coletas. Vocês foram fundamentais.

À Juliana, também do Núcleo de Especialistas em Oncologia (NEO), em Governador Valadares/MG, do setor de registro, por dividir o seu espaço, auxiliar no levantamento, agendamento, sua contribuição foi de fundamental importância.

A todos os pacientes, sem vocês não haveriam as coletas, muito obrigada.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho, os meus mais sinceros agradecimentos.

***“Clama a mim e responder-te-ei e anunciar-te-ei coisas grandes e firmes que não sabes”.***

**Jeremias 33:3 - Bíblia Sagrada**

## RESUMO

O câncer é uma enfermidade crônica degenerativa que apresenta um crescimento desordenado (maligno) de células, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. O processo de carcinogênese ou oncogênese compreende desde alterações precoces no DNA até a formação do tumor, podendo acarretar a destruição do organismo hospedeiro, de maneira lenta e progressiva. Como em outras neoplasias malignas, o câncer de boca tem o seu desenvolvimento estimulado pela interação de fatores ambientais, agentes cancerígenos ou carcinógenos e fatores do hospedeiro como idade, raça, sexo e herança genética. Alguns agentes externos também são fatores predisponentes ao desenvolvimento do câncer como exposição à radiação solar, e tabagismo e etilismo crônicos. As infecções oportunistas da cavidade bucal são primariamente causadas por fungos do gênero *Candida* e ocorrem frequentemente nesse grupo de pacientes. Considerando os aspectos relacionados à presença de fungos na cavidade bucal e seu discutível papel no câncer, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial agressor das leveduras do gênero *Candida* entre os diferentes pacientes que apresentam câncer orogástrico, incluindo aspectos relacionados ao diagnóstico da neoplasia bucal, a produção de proteinase e fosfolipase, e a capacidade de adesão das leveduras, à terapia antifúngica e à população celular envolvida na resposta imune do paciente. Foram incluídos neste estudo 59 pacientes com diagnóstico clínico confirmado para o câncer e presença de *Candida* spp. e 34 indivíduos do grupo controle. Para confirmação do diagnóstico de câncer, fragmentos de tecido foram submetidos às análises cito e histológicas. As amostras de swabs orais foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose, para posterior identificação das espécies. As leveduras foram identificadas por testes presuntivos através da produção de pigmento no meio de CRHOMagarCandida, características morfológicas e teste confirmativo através da espectrometria de massa MALDI-TOF. No grupo com câncer foram identificadas 32 (51,6%) amostras como *Candida albicans*, 4 (6,5%) como *C. tropicalis*, 9 (14,5%) como *C. glabrata*, 4 (6,5%) como *C. krusei*, 8 (12,9%) como *C. parapsilosis* e 5 (8%) como *C. lusitanae*. Para o grupo controle 14 (66,7%) foram identificadas como *C. albicans*, 5 (23,8%) como *C. parapsilosis*, 1 (4,8%) como *C. krusei* e 1 (4,8%) como *C. glabrata*. As leveduras foram também avaliadas quanto à expressão de fatores de virulência como a produção de proteinase e fosfolipase, a sua capacidade de adesão, e quanto ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, comumente utilizados na clínica médica. Também foi feita uma avaliação no soro dos pacientes com câncer oro-gástrico e grupo controle para que

fosse determinado o perfil de resposta imune nos indivíduos envolvidos no trabalho. Tanto o exame histopatológico que é o método mais utilizado para a análise de lesões suspeitas de malignidade, quanto o exame citopatológico, considerado uma forma de diagnóstico alternativo, demonstraram sensibilidade de 100% em todas as amostras analisadas, sendo este método uma ferramenta promissora para a realização do diagnóstico de câncer de boca. Cinquenta e nove por cento dos indivíduos do grupo controle e 85% dos pacientes com câncer orogástrico apresentaram levedura na cavidade oral sendo a espécie *Candida albicans* a mais prevalente com 66,7% nos indivíduos do grupo controle e 48,4% nos pacientes com câncer. As leveduras recuperadas dos indivíduos com câncer foram mais aderentes que os isolados provenientes do grupo controle. Quanto à produção de fosfolipase, foi observado uma maior produção, tanto para as amostras recuperados dos indivíduos do grupo controle quanto para os pacientes com câncer, com 61,9% e 51,6% respectivamente. Já para a proteinase, foi observada maior produção nas amostras proveniente dos pacientes com câncer com 41,9%. Para grupo controle, somente 4,8% apresentaram esta característica. Diante do teste de susceptibilidade à drogas antifúngicas, a maiorias das amostras para os dois grupos que fizeram parte do estudo apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados sendo que, as amostras do grupo controle apresentaram maior sensibilidade dos que as amostras dos pacientes com câncer. Por fim, quanto ao perfil imunológico avaliado a partir do soro dos pacientes com câncer e grupo controle, foi observado que nos pacientes com câncer, houve um aumento estatisticamente significativo das citocinas IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 em relação aos indivíduos do grupo controle (saudáveis), mostrando haver uma alteração sistêmica nestas citocinas inflamatórias entre os indivíduos com câncer oro gástrico.

**Palavras chave:** Leveduras, *Candida* spp., câncer orogástrico, diagnóstico, identificação, antifúngicos, resposta imune.

## ABSTRAT

Cancer is a chronic degenerative disease that presents a disordered growth of cells and may spread to other body regions. The process of carcinogenesis and oncogenesis ranges from early changes in DNA to tumor formation, which may cause the destruction of the host organism, slowly and progressively. As in other malignant neoplasms, oral cancer has its development stimulated by the interaction of environmental factors, carcinogens or carcinogens and host factors as age, race, sex and genetic inheritance. Some external agents are also predisposing to cancer development factors such as exposure to solar radiation, as well as smoking and chronic alcoholism. Opportunistic infections of the oral cavity are primarily caused by fungi of the genus *Candida* and occur frequently in this group of patients. Considering the aspects related to the presence of fungi in the oral cavity and its questionable role in cancer, the aim of this study was to determine the potential aggressor of *Candida* species among different patients who had orogastric cancer, including issues related to the diagnosis of neoplasia buccal, antifungal therapy and cell population involved in the immune response of the patient. To confirm the diagnosis of cancer, tissue fragments were subjected to cytological and histological analyzes. Both histopathologic as cytopathologic tests, considered a form of alternative diagnosis, showed sensitivity of 100% for all samples analyzed. In this study 59 patients with clinical diagnosis for cancer and presence of *Candida* spp. and 34 control subjects without cancer were included. Oral swabs samples of individuals were seeded in Sabouraud Dextrose Agar for identification of species. Yeasts, after screening with pigment production in the middle of CRHOMagarCandida were identified by morphological tests through microcultiive and confirmatory testing by MALDI-TOF. Fifty (85%) of patients with cancer oro-gastric and 20 (59%) of the control subjects showed yeast in the oral cavity. *Candida albicans* was the most prevalent species, both in patients with cancer (48.4%) and in control subjects (66.7%). Among the 50 cancer patients who had yeast in the oral cavity, in eight of these, two different *Candida* species and in two, three different strains were isolated, totaling 62 samples. Of the 20 control subjects, positive for *Candida* in the oral cavity, one had two species, totaling 21 isolates. In the group with cancer 32 (51.6%) samples were identified as *Candida albicans*, 4 (6.5%) as *C. tropicalis*, 9 (14.5%) as *C. glabrata*, 4 (6.5%) as *C. krusei*, 8 (12.9%) as *C. parapsilosis* and 5 (8%) as *C. lusitaniae*. In the control group 14 yeast (66.7%) were identified as *C. albicans*, 5 (23.8%) as *C. parapsilosis*, 1 (4.8%) as *C. krusei* and 1 (4.8%) as *C. glabrata*. Yeasts were also assessed for the expression of virulence

factors such as the production of proteinase and phospholipase, their adhesion ability, and as to the susceptibility to antifungal agents, commonly used in medical clinical profile. Among the samples of *Candida* spp. isolated, 54.2% and 32.5% produced phospholipase and proteinase, respectively. Isolates from patients with cancer showed higher proteinase production (41.9%) than those isolated from the control group (4.8%). Samples of *Candida* isolated from the oral cavity of patients with cancer had higher adhesion to buccal epithelial cells (BEC) than those of the oral cavity of people without alteration of the oral mucosa ( $p = 0.05$ ). *Candida* species from cases with cancer showed higher sensitivity to isoconazole, voriconazole, ketoconazole and amphotericin B antifungals while the samples of *Candida tropicalis* were resistant to fluconazole. The samples of the control group demonstrated the sensitivity to all the antifungals tested. In this study 100% of individuals who had oral cancer were smokers and chronic alcoholics. An assessment was also performed, to be given the profile of immune response in the serum of individuals with oro-gastric cancer and the control group. In cancer patients there was a statistically significant increase in IL-2, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  and IL-17 in the control group suggesting that there was a systemic change in these inflammatory cytokines in patients with neoplasia.

Keywords: Yeast, *Candida* spp., cancer orogastric, diagnosis, antifungals, immune response

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Câncer orogástrico.....	18
2.1.1 Diagnóstico.....	24
2.2 Candidíase .....	28
2.2.1 Fatores de virulência da <i>Candida spp</i> .....	30
2.2.2 <i>Candida spp</i> e sua relação com o câncer orogástrico.....	32
2.3 Drogas antifúngicas e resistência .....	33
2.3.1 Poliênicos .....	34
2.3.2 Azólicos.....	35
2.3.3 Flucitosina .....	40
2.3.4 Alilaminas.....	40
2.3.5 Equinocandinas.....	41
2.4 Resposta imune, câncer e às candidíases.....	43
3 OBJETIVOS.....	48
3.1 Objetivo Geral .....	48
3.2 Objetivos específicos.....	48
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1 Etapa clínica .....	49
4.1.1 Cuidados com o paciente.....	49
4.1.2 Grupo de estudo.....	49
4.1.3 Coleta de espécimes clínicos .....	50
4.2 Etapa laboratorial .....	51
4.2.1 Identificação preliminar de microrganismos .....	51
4.2.2 Identificação fenotípica dos isolados.....	51
4.2.2.1 Microcultivo em lâmina.....	52
4.2.2.2 Prova de resistência a temperatura .....	52
4.2.2.3 Meio de ágar Sabouraud hipertônico.....	52
4.2.3 Identificação das leveduras por MALDI-TOF MS.....	53
4.3. Fatores de Virulência.....	53
4.3.1 Teste de adesão.....	54
4.3.2 Produção de proteinase.....	55

4.3.3 Produção de Fosfolipase .....	55
4.4 Perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas .....	56
4.5 Caracterização das citocinas no soro dos pacientes .....	57
4.6 Análise estatística .....	58
5. RESULTADOS .....	59
5.1 Diagnóstico do câncer .....	59
5.2 Grupo de estudo.....	60
5.3 Identificação dos isolados de <i>Candida</i> .....	61
5.4 Fatores de virulência .....	65
5.5 Caracterização dos Indivíduos.....	70
5.5.1 Faixa etária .....	70
5.5.2 Sexo, etilismo e tabagismo .....	72
5.6 Avaliação do perfil de suscetibilidade a agentes antifúngicos das amostras de <i>Candida</i> spp. ....	73
5.7 Caracterização das citocinas no soro dos pacientes .....	85
6. DISCUSSÃO.....	94
6.1 Diagnóstico do câncer .....	94
6.2 Aspectos epidemiológicos e fatores de risco para o câncer orogástrico .....	95
6.3 Identificação dos isolados de <i>Candida</i> .....	98
6.4 Fatores de Virulência.....	101
6.5 Avaliação do perfil de suscetibilidade a agentes antifúngicos das amostras de <i>Candida</i> spp .....	104
6.6 Caracterização das citocinas no soro dos pacientes .....	108
7. CONCLUSÕES.....	115
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	120
9. ANEXO 1 .....	155
10. ANEXO 2 .....	156
11. ANEXO 3 .....	159

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A incidência de câncer tem aumentado significativamente em todo o mundo, configurando-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública. Como consequência, o câncer de boca também tem aumentado assustadoramente correspondendo a 94% dos casos de carcinoma de células escamosas (CCE). O CCE é uma neoplasia epitelial maligna agressiva e de etiologia ainda desconhecida, embora fatores intrínsecos e extrínsecos pareçam estar envolvidos. Como fatores intrínsecos citam-se o estado sistêmico do paciente como desnutrição, anemia por deficiência de ferro, deficiência de vitamina A e susceptibilidade genética. Os fatores extrínsecos incluem o fumo de tabaco, o tabaco sem fumaça, o hábito de mascar folha de bétela, o consumo de álcool, a exposição aos fenóis, infecções por vírus oncogênicos, sífilis, candidíase e o uso de próteses totais ou parciais. As associações entre a exposição a estes fatores de risco e a ocorrência de câncer ainda não estão claras, requerendo investigações mais apuradas.

A realização de um diagnóstico precoce é de fundamental importância para um melhor prognóstico do câncer. Dentre os métodos de diagnóstico disponíveis, a citopatologia se destaca por ser uma técnica rápida, de baixo custo e não invasiva. Embora o método citopatológico tenha sido considerado suficiente para a definição diagnóstica em lesões da tireóide, mama, pulmão, mediastino, rim e bexiga, não há consenso na literatura a respeito de sua eficácia no diagnóstico do carcinoma de células escamosas (CCE). Assim, para que o paciente possa ser submetido aos protocolos terapêuticos faz-se necessária uma definição diagnóstica que, obrigatoriamente, passa pela análise histopatológica de uma biópsia, habitualmente incisiva. Diante das vantagens da citopatologia e de seu aceite pelo paciente, a primeira proposta deste trabalho é avaliar a viabilidade deste método de diagnóstico na triagem de lesões bucais suspeitas de malignidade.

Considerando a imunossupressão, inerente ao paciente com câncer, infecções oportunistas por *Candida* são frequentes, embora a função destas leveduras na etiologia da doença ainda não tenha sido definida. Objetivou-se identificar as espécies de *Candida* presentes na mucosa oral de pacientes com câncer e analisar seu potencial agressor, por meio da pesquisa de marcadores de virulência como a proteinase, a fosfolipase e capacidade de adesão.

Outro aspecto importante no direcionamento da terapia antimicrobiana de candidíases em pacientes com câncer é o conhecimento do perfil de susceptibilidade de *Candida* spp. às drogas antifúngicas disponíveis na clínica médica, sendo este outro objetivo deste estudo.

Outra abordagem deste trabalho se refere ao entendimento da maneira pela qual o indivíduo com câncer desenvolve uma resposta imune, inata e adquirida, frente à infecção por *Candida*. Um outro objetivo do trabalho foi quantificar as citocinas presentes no soro dos indivíduos que fizeram parte do estudo por meio da técnica Cytometric Bead Array (CBA) associando aos aspectos relacionados à resistência ou susceptibilidade dos indivíduos às candidíases.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Câncer orogástrico

O câncer é definido como uma enfermidade crônica degenerativa, pois apresenta um crescimento rápido e anormal de células defeituosas que ao se disseminarem pelo organismo (metástase), aumentam a taxa de mortalidade da doença. Outros termos utilizados para o câncer são tumores malignos ou neoplasias malignas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Se o processo de carcinogênese se inicia em tecidos epiteliais é denominado carcinoma e quando se inicia em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma (FERREIRA, MACIEL, 2004).

O processo de carcinogênese ou oncogênese compreende desde alterações precoces no DNA até a formação do tumor, podendo acarretar a destruição do organismo hospedeiro, de maneira lenta e progressiva. Embora numerosos estudos realizados reportem o mecanismo de oncogênese, o desenvolvimento celular do tumor, sua progressão e agressividade não são, ainda, bem conhecidas (FERREIRA & MACIEL, 2004).

Em nossa sociedade, o câncer continua sendo uma enfermidade muito importante, tanto qualitativa como quantitativamente. Sua incidência e índices de mortalidade são cada vez mais elevados e, embora afete todas as faixas etárias, na maioria das vezes, acomete as pessoas com mais de 65 anos de idade, sendo que os homens sofrem maior incidência de câncer do que as mulheres (FERREIRA, 1996).

Anualmente, são diagnosticados cerca de 6,4 milhões de casos de tumores malignos no mundo, sendo o câncer de boca responsável por 10% dos casos (STEWART & KLEIHUES, 2003). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os cânceres de boca e orofaringe são considerados as neoplasias mais frequentes de cabeça e pescoço, com cerca de 390 mil novos casos por ano (INCA, 2008). As taxas de incidência destas neoplasias em países não desenvolvidos são superadas somente pelas taxas de câncer do colo de útero. O tratamento de escolha para essas neoplasias é a cirurgia, associada ou não à radioterapia. Cirurgia e radioterapia são formas de tratamento para a doença localizada ou regional (JHAM et al., 2006).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por esta doença, em todo o mundo, em 2012 (INCA, 2014). Nesses casos, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram de próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três tipos de câncer mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (INCA, 2014).

Assim, nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, a carga global será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2012).

Ainda, segundo o Instituto Nacional do Câncer (2014), no Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema da doença no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil).

Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 395 mil casos novos de câncer, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide (INCA, 2014).

A etiologia da neoplasia é multifatorial e, apesar de todo o avanço tecnológico obtido até o momento, os agentes etiológicos para o câncer ainda são uma incógnita (NEVILLE et al., 1998).

A expressão “tumores de cabeça e pescoço” inclui um número grande de tumores com diferentes características histológicas que surgem em vários locais anatômicos, como o lábio, mucosa oral, faringe, laringe, porção cervical do esôfago, seios paranasais, glândulas salivares, tireóide, paratireóide e pele (RUBIRA et al., 2007).

A cavidade bucal é uma das principais localizações anatômicas de câncer em todo o mundo, estando, em geral, entre as dez neoplasias mais frequentes. A maioria dos estudos epidemiológicos descreve como sítio anatômico para o câncer de boca qualquer localização da boca, algumas estruturas como palato, gengiva, assoalho de boca e mucosa jugal e a língua excluindo lábio e/ou glândula salivar (BORGES et al., 2009; COSTA et al., 2005; QUEIROZ, 2002).

A exclusão do lábio se deve ao fato de que a sua face externa está exposta à radiação solar, que é o principal fator de risco para este sítio anatômico sendo este, então, muitas das vezes, incluído nos tipos de câncer de cabeça e pescoço (GUNARSKOG et al., 1995; BLOT et al., 1996), diferentemente de outras regiões anatômicas da boca que são associadas de forma causal ao consumo de fumo e álcool. No caso das glândulas salivares, o tumor aí originado apresenta um padrão histológico diferente daquele observado no carcinoma espinocelular, principal tipo histológico observado nas demais partes da boca (BLOT et al., 1996).

O câncer bucal é um problema de saúde pública no Brasil, não somente em virtude das altas taxas de incidência e prevalência, mas principalmente devido aos baixos índices de sobrevivência, apesar dos avanços na terapêutica oncológica (MELO & ROSA, 2009).

Carcinoma de células escamosas (CCE), também chamado de epidermóide, escamocelular ou espinocelular é definido como uma neoplasia maligna derivada do epitélio escamoso ou exibindo características morfológicas do mesmo. O CCE é frequentemente o estágio final de alterações no epitélio estratificado escamoso, que culmina no rompimento da membrana basal e invasão do tecido conjuntivo adjacente. Anualmente, mais de 300.000 novos casos de CCE de boca ocorrem em todo o mundo (PIMENTA, 2005), consistindo na quarta localização anatômica de câncer (BORGES et al., 2009).

O câncer de boca acontece mais frequentemente nos homens do que nas mulheres - 75 e 25%, respectivamente. Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da

cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 novos casos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente nas regiões Sudeste (15,48/ 100 mil) e Nordeste (7,16/100 mil). Na região Centro-Oeste, é o quinto (8,18/ 100 mil). Nas regiões Sul (15,21/ 100 mil) e Norte (3,21/ 100 mil), o sexto. Para as mulheres, é o nono mais frequente nas regiões Sudeste (4,88/ 100 mil) e Nordeste (3,72/ 100 mil). Na região Norte (1,60/ 100 mil), ocupa a 11ª posição. Na região Centro-Oeste (3,30/ 100 mil), é o 12º mais frequente e, na região Sul (3,09/ 100 mil), o 15º (INCA, 2014).

O câncer de boca e faringe é o sexto tumor mais comum no mundo. Mais de 90% destes cânceres orofaríngeos são carcinomas de células escamosas (CCE) (SAHEBJAMEE et al., 2008).

Com etiologia multifatorial e complexa, a ocorrência do câncer de boca pode ser influenciada tanto por fatores ambientais como por aqueles fatores relacionados ao hospedeiro. Dentre os fatores de risco para o seu desenvolvimento estão o tabagismo, a exposição profissional, os traumatismos crônicos, os hábitos de higiene bucal, fatores nutricionais, estados de imunodeficiência, infecções fúngicas e virais com o HPV e o Herpes, a radiação ultravioleta, o grupo étnico e as condições socioeconômicas (KOWALSI & NISHIMOTO, 2000).

O câncer de boca está fortemente associado com o ato de fumar ou de mastigar tabaco: aproximadamente 90% das pessoas com cânceres de boca são fumantes (BOUDA et al., 2000). O risco aumenta com a quantidade e duração do tabagismo. O uso de álcool e a exposição à luz solar também aumentam o risco de câncer da cavidade bucal (HOMANN et al., 2001).

A ação do fumo e do álcool é conhecida pelo seu papel na gênese e desenvolvimento do câncer, devendo-se avaliar tais elementos como fonte de nitrosaminas, resultantes principalmente da degradação de componentes do tabaco. Nitrosaminas são compostos químicos cancerígenos, de estrutura química  $R_2N-N=O$  (MAFF, 1992). Nitrosaminas são produzidas a partir de nitritos e aminas. Esses compostos podem ser produzidos no fumo do tabaco pela reação da nicotina e outros compostos com nitrito no tabaco. Sua formação pode ocorrer apenas sob certas condições, incluindo condições fortemente ácidas tais como a do

interior do estômago humano. As nitrosaminas têm sido associadas ao desenvolvimento de câncer, especialmente, de tumores localizados na cavidade oral, no trato respiratório, no sistema digestivo, na bexiga e no cérebro (MAGEE & BARNES, 1956).

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre a ingestão de álcool e a ocorrência de câncer em seres humanos. Todos os tipos de bebidas alcoólicas estão associados com um risco aumentado para o surgimento do câncer oral e de esôfago, o que sugere que o etanol é o composto crucial como causa desta doença. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer afirmou que o consumo de álcool associado ao acetaldeído é um fator cancerígeno para os seres humanos cujos locais mais comuns são a cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, colo-retal, fígado e mama feminina. Os mecanismos pelos quais o consumo de álcool mostra seus efeitos cancerígenos não foram definidos totalmente, embora os eventos plausíveis incluam um efeito genotóxico do acetaldeído e concentração de estrogênios, sendo este último um importante fator para a carcinogênese mamária. Qualquer nível de consumo de álcool aumenta o risco para o desenvolvimento de um câncer. O nível de risco aumenta em conformidade com o consumo de álcool (TESTINO, 2011).

Pessoas com câncer de boca têm mais probabilidade de desenvolver câncer de laringe, de esôfago ou de pulmão (LEITE, 2009). Nos estágios iniciais, o CCE aparece como placas firmes e elevadas ou como áreas irregulares, ásperas ou verrugosas do espessamento da mucosa, possivelmente confundidas com leucoplasia. Ambos os padrões podem se sobrepor a uma base de leucoplasia ou eritroplasia aparente. Com a progressão da lesão, este pode apresentar aspecto nodular ou infiltrativo, este último caracterizado por uma úlcera irregular e áspera, assintomática, com bordas elevadas, firmes e onduladas (COTRAN et al., 2000). CCE de boca tem um crescimento infiltrativo profundo no tecido conjuntivo adjacente, com poucas alterações na superfície do epitélio e pode se apresentar como uma área endurecida com perda da mobilidade do tecido (SAPP et al., 1997).

Alguns dos possíveis sintomas do câncer de boca incluem uma ferida na boca que não cicatriza após duas semanas sendo este o sintoma mais comum dessa doença. Outros sintomas seriam a presença de uma região na boca que se torna descorada e permanece desta forma; a presença de nódulo (caroço) persistente endurecido na mucosa jugal; dor de garganta persistente; mudanças na voz; dificuldade para mastigar ou engolir; dificuldade para mover a mandíbula ou a língua; dentes soltos; amortecimento da língua ou de outra área da boca; dor

ao redor dos dentes ou da mandíbula; dor ou irritação na boca que persiste; perda de peso sem explicação; inchaço na mandíbula causando desconforto no uso de próteses. A maioria dos sintomas dos cânceres de boca pode ser causada por outras desordens menos sérias. Entretanto, se qualquer sintoma dura duas semanas ou mais, eles merecem a avaliação médica (LEITE, 2009).

Para o câncer de estômago, esperam-se 12.870 casos novos em homens e 7.520 em mulheres para o Brasil, no ano de 2014. Esses valores correspondem a um risco estimado de 13,19 casos novos a cada 100 mil homens e 7,41 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de estômago em homens é o segundo mais frequente nas regiões Norte (11,10/ 100 mil) e Nordeste (10,25/ 100 mil). Nas regiões Sul (16,07/ 100 mil) e Centro-Oeste (10,88/ 100 mil), é o quarto. Já na região Sudeste (14,99/ 100 mil), ocupa a quinta posição. Para as mulheres, é o terceiro mais frequente na região Norte (5,91/ 100 mil). Nas regiões Sudeste (8,20/100 mil) e Nordeste (6,39/ 100 mil), ocupam a quinta posição. Nas regiões Sul (8,43/ 100 mil) e Centro-Oeste (6,32/ 100 mil), ocupam a sexta posição (INCA, 2014).

Estudos epidemiológicos sugerem que a mudança no padrão alimentar da população, com o aumento na ingestão de frutas e verduras, está associado a um baixo risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. A hipótese de que a alimentação saudável possa ser um fator protetor deve-se ao fato de as frutas e legumes frescos possuírem vitaminas com propriedades antioxidantes, como as vitaminas C e E e o betacaroteno (INCA, 2014).

O maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer do estômago é a infecção em longo prazo pela bactéria *Helicobacter pylori*. É uma das infecções mais comuns no mundo e pode ser responsável por 63% dos casos de câncer gástrico. A prevalência mundial calculada de infecção pelo *H. pylori* é de 50%, sendo que chega a 90% nos países em desenvolvimento. Na maioria das populações em que a prevalência da infecção é alta, geralmente, ela é adquirida na infância, persistindo ao longo da vida (INCA, 2014).

O câncer de esôfago afeta mais de 450 mil pessoas no mundo a cada ano. Para o ano de 2014, no Brasil, esperam-se 8.010 casos novos de câncer de esôfago em homens e 2.770 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 8,18 casos novos a cada 100 mil homens e 2,70 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não

melanoma, o câncer de esôfago em homens é o quinto mais frequente na região Sul (15,97/100 mil). Na região Centro-Oeste (6,88/ 100 mil), é o sexto. Nas regiões Sudeste (9,45/ 100 mil) e Nordeste (4,50/100 mil), o sétimo, e, na região Norte (1,88/100 mil), é o 11o mais frequente. Para as mulheres, é o 13o mais frequente nas regiões Sul (5,27/100 mil), Sudeste (2,86/100 mil) e Nordeste (1,80/100 mil). Já nas regiões Centro-Oeste (2,39/100 mil) e Norte (0,67/100 mil), é o 14º mais incidente (INCA, 2014).

O câncer de esôfago divide-se em dois principais subtipos histológicos: carcinomas de células escamosas e adenocarcinomas. O primeiro é o mais comum, com aproximadamente 90% dos casos, e ocorre mais frequentemente em homens a partir dos 50 anos, acometendo mais o terço médio e inferior do esôfago. Já o adenocarcinoma surge na parte distal do esôfago, na presença de refluxo gástrico e metaplasia gástrica do epitélio (INCA, 2014).

Os fatores de risco relacionados ao câncer do esôfago são idade, história familiar e fatores extrínsecos, como uso do álcool e fumo (fumado, mascado ou aspirado), infecções orais por fungos e outros agentes infecciosos (como o HPV), deficiência de riboflavina e vitamina A, contaminação de produtos alimentícios pela micotoxina fumonisina e ingestão excessiva de erva-mate em temperatura elevada, muito comum no sul do Brasil, na Argentina e no Uruguai (INCA, 2014).

O conceito de campo de cancerização foi estabelecido por SLAUGHTER et al. em 1953 e foi baseado no fato de que a superfície epitelial do trato aero digestivo é comumente exposta a muitas substâncias carcinogênicas como o cigarro e o álcool e, portanto, possui um risco maior de desenvolvimento de carcinomas, inclusive o CCE de boca. O desenvolvimento de um segundo tumor primário no campo de cancerização ocorre em uma razão de 20 a 30%, apesar do controle local para prevenção de uma nova neoplasia (PIMENTA, 2005).

### **2.1.1 Diagnóstico**

O diagnóstico do CCE é realizado através de suspeita clínica e confirmação através de exame histopatológico com a obtenção de um fragmento representativo do tumor mediante uma biópsia do tecido neoplásico (ISLES et al., 2008).

O diagnóstico precoce dos tumores de boca não deveria apresentar dificuldades, uma vez que os grupos de maior risco são bem conhecidos e a região é de fácil acesso ao exame clínico, dispensando qualquer tipo de equipamento especial. As lesões com risco de malignização podem ser diagnosticadas e tratadas antes da transformação carcinomatosa. No entanto, observa-se que os pacientes não são esclarecidos e negligenciam os sintomas, assim como os profissionais de saúde não examinam rotineiramente a mucosa da boca (KOWALSKI, NISHIMOTO *In*: PARISE JÚNIOR, 2000).

A suspeita clínica se baseia na anamnese do paciente com levantamento de questões sobre a duração da ferida, a ocorrência de dor, sangramento e dificuldade de adaptação de prótese. Considera-se na evolução da doença, a existência de antecedentes como o tabagismo, uso de prótese, higiene bucal, bem como precedentes familiares.

O diagnóstico precoce do câncer bucal e o imediato encaminhamento do paciente para tratamento são fatores importantes para a redução da morbidade e mortalidade causadas pela doença. O diagnóstico tardio das lesões primárias bucais e metástases cervicais é comum, o que faz do tratamento dessas doenças uma situação particularmente grave (MAIO et al., 2009).

A classificação histopatológica para os carcinomas de células escamosas (CCE) da cavidade oral surgiu na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes. Assim, Broders (1941), propôs uma classificação da graduação histopatológica baseada no grau de diferenciação celular (LOURENÇO et al., 2007).

Há muitos anos, o sistema de estadiamento clínico de tumores TNM tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores, propor a terapia mais adequada e, assim, estimar a sobrevida dos pacientes. As informações obtidas através dos exames clínicos e de imagem são utilizadas para estabelecer o estágio clínico (cTNM). Caso o paciente seja submetido à ressecção cirúrgica, determina-se também o estágio patológico (pTNM), por meio do exame histopatológico do tumor e/ou dos linfonodos regionais, o que auxilia na seleção da terapia adjuvante pós-operatória e na estimativa do prognóstico ( PATEL & SHAH, 2005; LOURENÇO et al., 2007).

O estadiamento clínico dos carcinomas da cavidade bucal segue princípios definidos que utilizam critérios anatômicos, obtidos por meio de exame físico minucioso, exames de imagem ou outros métodos diagnósticos. O sistema TNM considera o tamanho da lesão, o comprometimento de estruturas adjacentes, as evidências de metástase cervical e a distância. Na classificação TNM o T indica o tamanho de tumor primário, N a presença ou ausência de lesões metastáticas nos linfonodos e M a presença ou ausência de metástases à distância em algum outro órgão ou local. A classificação é a mesma para os carcinomas da região de cabeça e pescoço. Da composição dos dados citados acima, os pacientes são agrupados em estádios que vão de “0” (*in situ*) a “IV” (mais avançado, com presença de metástase). O estadiamento auxilia na determinação da terapêutica a ser empregada e na definição do prognóstico quanto às chances de disseminação neoplásica, sobrevida livre de doença e sobrevida global (SILVERMAN, EVERSOLE, TRUELOVE, 2004; ARAUJO, ARAUJO *In: PARISE JÚNIOR*, 2000).

O emprego da citopatologia como método de diagnóstico de CCE fundamenta-se na análise e interpretação, à microscopia de campo claro, de esfregaço da lesão (FONTES et al., 2008) . Em lesões orais, as células são obtidas pela raspagem da superfície da lesão suspeita, possibilitando a análise das características citopatológicas e a classificação da lesão (BIRMAN et al., 1999). Essa técnica é bem aceita pelos pacientes, aspecto esse que pode ser bastante útil para o diagnóstico (MEHROTRA et al., 2006). Entre as muitas vantagens da citopatologia destacam-se a rapidez de execução; o custo baixo; a não invasividade; a não necessidade de anestesia infiltrativa. Este método apresenta alta especificidade e sensibilidade, o que viabiliza a sua utilização como exame de rotina; minimização da possibilidade de infecção e hemorragia em pacientes imunossuprimidos; além de permitir a aplicação de técnicas quantitativas, citomorfológicas, imunocitoquímica e biologia molecular, proporcionando maior precisão no diagnóstico (EPSTEIN, et al., 2002; ROCO PEREZ et al., 2002; DINIZ et al., 2004).

A confirmação do diagnóstico de CCE é feita através de biópsia do tecido neoplásico. O CCE é caracterizado histologicamente por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa (NEVILLE et al., 2002).

Outras modalidades de exames por imagem, como tomografia computadorizada, ultrassonografia, imagem por ressonância magnética, cintilografia óssea e PET (Positron

Emission Tomography) tem sido empregadas como complemento ao exame clínico para avaliar a localização primária, a extensões e a invasão de estruturas adjacentes (DAMMANN et al., 2005; YEN et al., 2005, ISLES et al., 2008).

A ressonância magnética (RNM) apresenta melhor qualidade de imagem para tecidos moles, sem utilização de radiação ionizante e sem riscos biológicos conhecidos (LANGLAIS et al., 2000; LENZ et al., 2000). A RNM fornece informações sobre extensão da lesão, possível infiltração de grandes vasos e comprometimento de linfonodos, contribuindo para a determinação do tratamento e prognóstico (WEBER et al., 2003). Exames de RNM e Tomografia Computadorizada (TC) realizados geralmente seis meses após a radioterapia, podem contribuir na detecção de alterações locais, em complemento ao exame clínico. Persistência ou recorrência de assimetria dos tecidos e/ou aumento de volume são sinais suspeitos de persistência ou recorrência do tumor (HERMANS, 2005).

Hoje a biologia molecular já tem sido usada como uma ferramenta para detectar a expressão de micro genes envolvidos no câncer. Um destes instrumentos, a RT-PCR tem sido útil na detecção de miRNA (micro RNAs), bem como seu nível em vários tipos de câncer humanos. Uma grande quantidade de miRNA já foi detectada em todos os tipos de tumores, incluindo as malignidades hematológicas (CALIN et al., 2004), linfoma (EIS et al., 2005), melanoma (GAUR et al., 2007), cânceres de pulmão (TONG, 2006; EDER & SCHERR, 2005), mama (IORIO et al., 2005), cólon (CUMMINS et al., 2006), fígado (MURAKAMI et al., 2006), tireóide (VISONI et al., 2007), pâncreas (LEE et al., 2007), dentre outros. A utilização desta ferramenta tem se mostrado potencialmente útil para o diagnóstico e o prognóstico do câncer, tendo assim objetivos terapêuticos (CHEN et al., 2008).

O protocolo convencional para o tratamento de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço é cirurgia e/ou radioterapia. A radioterapia tem como princípio a destruição de células neoplásicas malignas, porém também causa injúrias à população de células normais provocando efeitos colaterais e complicações variadas que afetam a cavidade bucal durante e após o tratamento (SPOLIDORIO et al., 2001). Atualmente, a pesquisa em oncologia, tem concentrado esforços na identificação de antígenos de superfície da célula cancerosa, na perspectiva de desenvolvimento de vacinas e/ou imunotoxinas que podem ser alternativas para terapia do câncer (HAN et al., 2009).

## 2.2 Candidíase

A candidíase é uma infecção fúngica de espectro bastante extenso, que acomete, principalmente, pacientes imunocomprometidos e apresenta como agente etiológico leveduras do gênero *Candida*. As espécies de *Candida*, de interesse médico, residem mais comumente na cavidade bucal, vaginal e no trato gastrointestinal onde são, normalmente, controladas por fatores locais, como a competição com a microbiota bacteriana residente. Apesar de ser um microrganismo sapróbio, *Candida* spp. pode assumir uma forma patogênica frente a determinadas condições que comprometem o sistema imunológico (ISHIDA et al., 2009).

Os fatores de risco para infecção por *Candida* em pacientes imunocomprometidos incluem o aumento desta população de imunossuprimidos que é uma consequência da diabetes *mellitus*, do uso prolongado de antibióticos e corticóides, da difusão da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), leucemia, queimaduras, dos avanços na medicina de transplantes e tratamento quimioterápico e do aumento da expectativa de vida do homem devido a tratamentos médicos avançados (SHEEHAN et al., 1999; HEIMDAHL & NORD, 1990; CHEN et al., 2000), a duração e gravidade da neutropenia, a presença de um dispositivo central de acesso venoso, a nutrição parenteral total, o uso de esteróis e recente ou simultâneo uso de agentes antibacterianos (PAPPAS et al., 2004). Com isso, as infecções fúngicas oportunistas têm aumentado drasticamente nos últimos anos (ARENDRUP et al., 2005; ENOCH et al., 2006). As infecções fúngicas são, pois, causas importantes de morbidade e mortalidade neste grupo de indivíduos (PARAKH et al., 2008; YOKOYAMA et al., 2000; LIN et al., 2006; AVRELLA & SILVEIRA, 2008). Pelo caráter endógeno desta levedura, sua habilidade de colonização e oportunismo evidente, as candidíases, são freqüentes e têm distribuição mundial (ISHIDA et al., 2009).

A mortalidade e morbidade das infecções fúngicas em imunodeprimidos são bastante significativas, e os patógenos fúngicos mais comuns continuam sendo aqueles dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* (ARENDRUP et al., 2005; LASS-FLORL et al., 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007; SEGAL & WALSH, 2006).

A freqüência de infecções por espécies de *Candida* tem aumentado nas últimas décadas, tornando a candidemia uma infecção presente nos hospitais. Atualmente, essas infecções representam o quarto lugar entre as adquiridas no ambiente hospitalar (YILDIRIM et al.,

2007; MARO & YÜCESOY, 2008). A maior frequência ocorre em pacientes com predisposição de base como a prematuridade de neonatos, presença de patologia oncológica, o uso de quimioterapia, a terapia imunossupressora, e cirurgias de grande porte. A espécie *C. albicans* é a mais frequente, sendo responsável por 50 a 70% de todas as infecções invasivas atribuídas ao gênero *Candida* (SAMONIS et al., 2008). Outras espécies também estão implicadas em quadros clínicos e têm apresentado uma elevada taxa de incidência compreendendo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e mais recentemente, *C. dubliniensis*.

A patogênese da candidíase envolve a invasão do tecido do hospedeiro por formas filamentosas das leveduras, especialmente *C. albicans* (STAAB, 1999). As manifestações clínicas da candidíase apresentam grande diversidade de quadros, podendo ser divididas em três grupos: mucocutânea, cutânea e sistêmica. Na candidíase mucocutânea, os tecidos mais atingidos são os da mucosa bucal e vaginal, sendo que a forma oral pode subdividir-se em cinco apresentações distintas: pseudomembranosa, atrófica aguda, hiperplásica crônica, queilite angular e língua negra pilosa (ANDRIOLI et al., 2009).

A candidíase é a micose mais comum na boca, sendo a *Candida albicans* a principal espécie encontrada. A infecção por *Candida* spp. é frequente no palato de portadores de próteses totais, pacientes imunossuprimidos, e pacientes durante antibioticoterapia ou uso de drogas que causam xerostomia. *Candida* spp. pode infectar secundariamente lesões bucais como líquen plano, leucoplasia e carcinoma.

Na cavidade bucal as candidíases podem aparecer sob várias formas. Os termos pseudomembranosa, atrófica e hiperplásica servem como grupamentos primários, que geralmente descrevem os sinais da doença bucal. A pseudomembranosa caracteriza-se pela presença de placas brancas amolecidas que cobrem áreas eritematosas da mucosa. Estas placas podem ser removidas facilmente e apresentar áreas de ulceração. A atrófica descreve um estado em que a mucosa apresenta-se eritematosa ou observa-se atrofia nas papilas linguais. A hiperplásica ocorre quando são observadas placas brancas que não podem ser removidas (FOTOS & HELLSTEIN, 1992).

### 2.2.1 Fatores de virulência de *Candida* spp.

A patogenicidade da *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que contribuem para a sua virulência, como capacidade de crescimento a 37°C, variabilidade fenotípica (*switching*) (NAGLIK et al. 2003), formação de hifas e pseudo-hifas, formação de biofilmes e presença de moléculas como um receptor homólogo a integrina CR3 humana, as quais facilitam a aderência às células epiteliais e habilidade de produzir enzimas hidrolíticas como as fosfolipases (KANEMITSU et al., 2001; MOHAN & BALLAL, 2008). A aderência do fungo à superfície da mucosa do hospedeiro ocorre provavelmente pela interação entre adesinas do microrganismo e receptores das células epiteliais (OLSEN, 1990).

A grande maioria das leveduras cresce bem em temperaturas entre 30 e 37°C, quando cultivadas em meios de cultura artificiais. Entre as espécies do gênero *Candida*, as temperaturas de incubação que permitem crescimento satisfatório podem variar entre 20°C e 38°C (ODDS et al., 1994). A prova de termo-tolerância utilizando temperatura de crescimento (42°C e 45°C por 48 horas) associada com outros testes é um método eficaz para diferenciar isolados de espécies de *Candida* (SANKAC ET al., 2003; ANANE et al., 2007). Foi demonstrado que *C. dubliniensis* é sensível a temperaturas elevadas e não é capaz de crescer quando incubada entre 42°C e 45°C (PINJON ET al., 1998). Esta prova, portanto, tem sido útil para identificação presuntiva desta espécie, embora seja um teste que requer provas complementares, devido à existência de algumas cepas de *C. albicans* que podem apresentar comportamento semelhante (SPOLIDORIO et al., 2009).

O efeito proteolítico de amostras de *C. albicans* foi demonstrado pela primeira vez por Staib, 1965. Enzimas hidrolíticas têm sido observadas em sobrenadante de cultura e no citoplasma de blastoconídios de *C. albicans*. A proteinase extracelular produzida por diferentes espécies de *Candida* é capaz de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular. Enzimas proteolíticas foram encontradas em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtidas de várias amostras clínicas (OLIVEIRA et al., 1998). Nas candidíases observa-se a aderência da levedura à superfície celular. A formação do tubo germinativo com consequente desenvolvimento da forma filamentosa, a variabilidade fenotípica (*switching*), a produção de toxinas e enzimas extracelulares, constituem os fatores mais importantes para o desencadeamento da infecção por *C. albicans*. A produção de fosfolipases é também um fator importante no processo da infecção, variando conforme a

amostra. *Candida albicans* também possui adesinas, biomoléculas que promovem a aderência do fungo às células do hospedeiro (ZARDO & MEZZARI, 2004).

As três principais enzimas hidrolíticas extracelulares produzidas por *C. albicans* são aspartil proteínase (Sap), fosfolipases e lipases. A secreção de fosfolipase celular é considerada um atributo chave para ajudar na invasão dos epitélios da mucosa do hospedeiro. A fosfolipase, em geral, quebra os fosfolipídeos que são componentes principais de todas as membranas da célula (IBRAHIM et al., 1998; RIBEIRO et al., 2007).

As enzimas hidrolíticas vão destruir ou desorganizar os elementos da membrana celular, levando à disfunção da membrana e / ou ruptura física. Fosfolipases agem invadindo a célula, provocando danos nos tecidos, ruptura da célula epitelial, e permitindo que as hifas penetrem no citoplasma. A produção de proteínase aumenta a capacidade de certos organismos colonizar e penetrar o tecido hospedeiro, enganar o sistema imunológico, e perturbar um número significativo de proteínas importante para a imunidade, tais como imunoglobulinas, proteínas do complemento, e citocinas (D'EÇA et al, 2011).

A Sap tem sido o determinante de virulência mais estudado em *C. albicans* (FELK et al., 2002). Esta proteínase é codificada por uma família de 10 genes (Sap 1 – 10) que pode ser dividida em subfamílias baseado em aminoácido com alinhamentos homólogos (NAGLIK et al., 2008).

A descoberta de que os genes da família Sap são expressos diferencialmente sob uma variedade de condições ambientais *in vitro* (HUBE et al., 1994; WRITE & AGABIAN, 1995) conduziu à proposição de que diferentes membros da família Sap também poderiam ser diferencialmente expressos *in vivo*, contribuindo para os diversos tipos de infecções por *C. albicans*.

A Sap é responsável pela adesão, pelo dano tecidual e pela evasão da resposta imune do hospedeiro (MOHAN & BALLAL, 2008). Sua atividade proteolítica está associada à invasão de tecido (HUBE & NAGLIK, 2001). Estudos demonstram que as proteínas Sap se localizam na parede da célula de *C. albicans* durante o processo de infecção. Em vaginites experimentais em modelos murinos, foi observada a presença de Sap1 a Sap3 na parede da

levedura durante as fases iniciais de infecção, um padrão que pode ser correlacionado com as Saps visualizadas *in vitro* (STRINGARO et al., 1999).

### **2.2.2 *Candida* spp. e sua relação com o câncer orogástrico**

*Candida albicans* é frequentemente encontrada em lesões de câncer de boca (OLIVEIRA et al., 1998). Embora não haja evidências da participação de *Candida* spp. no desenvolvimento de carcinomas bucais, alguns trabalhos (TILLONEN et al., 1999; MEURMAN & UITTAMO, 2008) mostram que sua presença aumenta a gravidade das displasias. Segundo Gligorov (2011) a candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum que afeta pacientes oncológicos. Particularmente, pacientes que receberam tratamento de radioterapia para câncer de cabeça e pescoço, são mais suscetíveis à colonização por *Candida*.

O papel de fungos, principalmente *C. albicans* frente a neoplasias bucais, em especial, o CCE, tem sido pouco estudado. A interação entre doente e microrganismo começa, em parte, a ser melhor compreendida, permanecendo porém, muitas questões ainda sem resposta, pois estudos *in vitro* nem sempre podem traduzir o que ocorre *in vivo*.

A hipótese de que fungos teriam relação com câncer de boca devido à formação endógena de nitrosaminas também tem sido aventada. As nitrosaminas não são reativas e necessitam de ativação enzimática para formarem intermediários que se ligam ao DNA, iniciando o processo carcinogênico. A ativação metabólica de nitrosaminas é catalisada por membros da família do Citocromo P450, presentes nas membranas fúngicas (PRADO & TAVEIRA, 2003). É importante lembrar que nitritos estão disponíveis em excesso na cavidade bucal de fumantes ou etilistas crônicos, e tendo em vista a produção destes compostos por microrganismos como os fungos, Kingnel et al., (2000) estudaram fumantes e etilistas crônicos com câncer inicial, analisando e caracterizando seus aspectos clínicos bem como identificando os fungos presentes na cavidade bucal. Neste trabalho foram encontrados, predominantemente, representantes de *C. albicans* (21%), além de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parasilopsis*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporum cutaneum*, *Criptococcus laurentii* e *C. glabrata*. Segundo estes autores, considerando-se o alto poder de nitrosação dos fungos e as consequências deste fenômeno na transformação maligna de tumores, o papel destes microrganismos na etiologia do câncer de boca deve ser melhor investigada em conjunto com outros fatores indutores como o fumo, a bebida alcoólica e as alterações da mucosa.

### **2.3 Drogas antifúngicas e resistência**

As últimas décadas têm testemunhado um aumento significativo da resistência a agentes antibacterianos e antifúngicos. O desenvolvimento e o aumento associado de infecções fúngicas tem intensificado a busca por novas drogas mais seguras e mais eficazes no combate às infecções fúngicas graves (MAHMOUD, 1999).

O caráter eucariota, comum entre os organismos do Reino Fungi e a célula do hospedeiro e suas similaridades bioquímicas e fisiológicas, limitam, em muito, o arsenal terapêutico antifúngico disponível (ALVES et al., 1997). Este fato é o responsável pela dificuldade em se encontrar compostos que possam exibir seletividade suficiente para o uso nas micoses humanas profundas, cujo tratamento, na maior parte das vezes, exige administração sistêmica de agentes antifúngicos.

Contrapondo-se à grande diversidade dos agentes antibacterianos disponíveis, os antifúngicos existem em um número limitado. As principais famílias de antifúngicos existentes compreendem os poliênicos, os azólicos, tiocarbamatos, alilaminas, derivados morfolínicos e uma miscelânea de outros agentes que incluem a 5-fluorocitosina (flucitosina) e a griseofulvina, entre outros (ALVES et al., 1997). Atualmente, quatro classes de drogas estão disponíveis para tratar infecções fúngicas invasivas: poliênicos, triazólicos, equinocandinas e análogo de nucleosídeos. As equinocandinas correspondem a uma nova classe de drogas e os triazólicos são novos derivados azólicos que compreendem o posaconazol, ravuconazol e voriconazol, de uso já autorizados em muitos países, e outros ainda em fase de testes, como o isavuconazol e albaconazol (CHAKRABARTI et al., 2009; PAPPAS et al., 2004).

A diretriz de 2004 da Sociedade Americana de Doenças Infecciosas recomenda o tratamento com caspofungina e fluconazol para pacientes não expostos previamente a azóis, anfotericina B, ou fluconazol. A terapia de combinação da anfotericina B com fluconazol é recomendada para o tratamento inicial da candidemia crônica. A 5-fluorocitosina, associada com qualquer uma dessas duas drogas também pode ser recomendada (PAPPAS et al., 2004). Os antifúngicos mais relevantes, disponíveis comercialmente, têm mecanismos de ação similares, sendo os principais alvos os esteróis da membrana fúngica (ESPINEL-INGROFF, 2009).

A descoberta da atividade antifúngica dos compostos azólicos representou um importante passo no desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra micoses (CANDIDO et al., 1999). Sendo assim, tornou-se necessário a realização de testes de susceptibilidade *in vitro* que possam servir como um guia na seleção e controle da terapia antifúngica (COLOMBO et al., 2002).

### 2.3.1 Poliênicos

A anfotericina B é um antimicrobiano produzido pelo *Streptomyces nodosus*, formado por átomos de carbono com dupla ligação. Esta droga interage, sobretudo com o ergosterol da membrana plasmática fúngica, alterando a permeabilidade seletiva desta membrana, por originar poros permeáveis à saída de água e de pequenas moléculas essenciais à sobrevivência do microrganismo, especialmente íons de potássio, amônio, fosfato, açúcares, éteres, fosfatos, nucleotídeos e proteínas. Em consequência do desequilíbrio da permeabilidade da membrana ocorre uma desorganização metabólica e consequente morte celular (MOEN et al., 2009; LANCE et al., 1995; DOMER & LEHRER, 1993). Anfotericina B mostra boa atividade *in vitro* contra um amplo espectro de fungos, clinicamente importantes, incluindo a maioria das espécies de *Candida*, *Aspergillus* spp. e outros fungos filamentosos como Zigomicetos.

Anfotericina B Liposomal é uma formulação lipídeo associado que tem se mostrado efetiva no tratamento de candidíases, aspergiloses, fusarioses e zigomicoses em vários modelos animais (MOEN et al., 2009).

Apesar da recente introdução de derivados azólicos de baixa toxicidade e ação antifúngica sistêmica, a anfotericina B permanece sendo a droga de escolha contra as micoses disseminadas graves, especialmente no hospedeiro imunocomprometido (BAGINSKI et al., 2005; LANCE et al., 1995; TAVARES, 1993).

Em se tratando de pacientes com infecções invasivas, as drogas que vem demonstrando eficácia continuam sendo a anfotericina B, e entre os azólicos, o fluconazol e, mais recentemente a caspofungina e os azólicos de nova geração que são voriconazol, posaconazol e ravuconazol (PARAKH et al., 2008; CHAKRABARTI et al., 2009).

A resistência aos poliênicos pode se desenvolver durante a terapêutica com essas drogas. Entretanto, pelas dificuldades técnicas na realização dos testes de susceptibilidade, os relatos não são numerosos, embora, crescentes. Segundo Alves e colaboradores (1997), o maior número de publicações evidenciando o fenômeno da resistência de fungos aos poliênicos refere-se ao gênero *Candida*, sendo as espécies não-*albicans* as mais envolvidas.

Segundo ANDREU e colaboradores (2001), a nistatina é um dos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento tópico da candidíase vaginal e é, talvez, a droga mais utilizada em Cuba. Entretanto, os frequentes relatos de candidíase vaginal recorrente têm sugerido o surgimento de cepas com sensibilidade reduzida ou resistência à nistatina (SUÁREZ & ANDREU, 2003). Opções terapêuticas tem sido o uso tópico dos azólicos cetoconazol, miconazol e clotrimazol, que têm se mostrado mais eficazes que a nistatina, aliviando os sintomas em 80 a 90% das pacientes. No que se refere aos efeitos colaterais, não foram encontrados em nenhum dos dois grupos, sendo que todos foram bem tolerados pelas pacientes (TOPETE & VALENCIA, 2004).

Para o tratamento de candidíase mucocutânea utiliza-se nistatina tópica, pois esse antimicótico não é absorvido por via oral e, se usado por via intravenosa ou intramuscular é altamente tóxico, sendo capaz de causar hemólise, necrose e abscessos frios nos locais de injeção. Segundo TAVARES (1993), isto se deve à ligação da nistatina aos esteróis das membranas celulares das hemácias e células tissulares, causando sua destruição.

Os principais mecanismos sugeridos para explicar o desenvolvimento da resistência aos poliênicos são: alterações na composição dos esteróis das membranas, com diminuição ou ausência do ergosterol ou a formação de esteróis modificados, com menor afinidade pelos polienos e o aumento da atividade da enzima catalase no interior da célula fúngica, impedindo a formação de radicais livres responsáveis pela formação do “poro” na membrana fúngica (TAVARES, 1993; ALVES et al., 1997).

### **2.3.2 Azólicos**

Os derivados azólicos são compostos sintéticos que vêm crescendo e se tornando uma alternativa promissora ao uso da anfotericina B, uma vez que se apresentam com uma menor

toxicidade além de exibirem amplo espectro de ação e melhores propriedades farmacocinéticas (LYMAN & WALSH, 1992). As novas gerações de azólicos, os triazólicos, têm expandido a atividade antifúngica contra um grande número de fungos, incluindo as leveduras do gênero *Candida*. Estes novos azólicos incluem voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Outros ainda em fase de testes incluem o isavuconazol e albaconazol (CHAKRABARTI et al., 2009).

A estrutura química dos azóis compreende, basicamente, um ou mais anéis de cinco átomos de carbono (anel azólico), unido(s) ao restante da molécula por ligações do tipo C-N. Os imidazólicos contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico, enquanto que, para os triazólicos, um terceiro átomo de nitrogênio foi introduzido ao anel (GRUPTA et al., 1994). Embora haja diferenças estruturais nas diversas drogas que compõem este grupo, provavelmente elas compartilham um mesmo mecanismo de ação (LYMAN & WALSH, 1992).

O mecanismo de ação primário dos derivados azólicos envolve a inibição da biossíntese do ergosterol, que é o produto final da via metabólica de esteróis fúngicos. Isto ocorre através da inibição da enzima  $14\alpha$ -demetilase, dependente do citocromo P-450, que participa da seqüência de eventos envolvida na conversão de lanosterol a ergosterol. Esta inibição resulta no acúmulo de uma série de precursores metilados, incluindo o lanosterol e diminuição, ou mesmo ausência do produto final da via biossintética. Em seguida, a substituição do ergosterol pelos precursores metilados determina a formação de membranas defectivas, com permeabilidade alterada, prejudicando várias de suas funções tais como, transporte de nutrientes e síntese de quitina (CHAKRABARTI et al., 2009; SHEEHAN et al., 1999; ESPINEL-INGROFF & PFALLER, 1995). Este mecanismo de ação, fundamentado na inibição enzimática, é responsável pela atividade fungistática dos derivados azólicos (LEES et al., 1990).

Os azólicos são efetivos através da administração oral e são geralmente menos tóxicos que o complexo anfotericina B-desoxicolato (DOMER & LEHRER, 1993). Os triazólicos, fluconazol e itraconazol, de administração oral ou intravenosa, são comumente utilizados no tratamento das micoses. Esses fármacos são utilizados na profilaxia de pacientes com risco de desenvolverem infecções fúngicas, pois são menos tóxicos do que os poliênicos.

A anfotericina B, uma droga poliênica, tem sido considerada o padrão "ouro" para o tratamento de infecções fúngicas, mas sua toxicidade limita seu uso. Com a introdução dos antifúngicos azólicos, especialmente o fluconazol e itraconazol, que possuem boa absorção oral e baixa incidência de efeitos colaterais, uma nova era no tratamento das infecções fúngicas se iniciou. Seu espectro de ação inclui leveduras e fungos dimórficos (ZARDO & MEZZARI, 2004).

O tratamento das candidíases sistêmicas geralmente consiste em primeiro controlar as condições subjacentes básicas do paciente (ex.: neutropenia ou leucemia), seguida da administração de um antifúngico (MURPHY et al., 1993). Para o tratamento de candidíase bucal e esofágica em pacientes com AIDS, na Uganda, foram feitos testes com miconazol, que se mostrou mais efetivo que a nistatina para o tratamento de candidíase esofágica (RAVERA, 1999).

Segundo SHEEHAN (1999), o controle de infecções graves causadas por *Candida* spp. tem sido um problema devido ao aumento da incidência de espécies não-*albicans* e à emergência de microrganismos resistentes à anfotericina B e fluconazol. No entanto o fluconazol e o itraconazol continuam com boa atividade contra muitas espécies do gênero *Candida*, sendo satisfatoriamente indicados para o tratamento de infecções fúngicas locais e sistêmicas (NENOFF et al., 1999; MAHMOUD et al., 1999). Este antifúngico também tem sido recomendado para o tratamento de pacientes neutropênicos e com candidíase mucocutânea, particularmente em pacientes infectados com vírus HIV (SOBEL et al., 2001; SHEEHAN et al., 1999). O fluconazol é facilmente solúvel em água, o que permite sua administração por via oral e parenteral. Essa droga é muito pouco metabolizada, eliminando-se predominantemente por via renal como droga inalterada, o que exige o ajuste da dosagem em pacientes com insuficiência renal (TAVARES, 1993).

O voriconazol é um derivado do fluconazol, que recebeu um grupo de  $\alpha$ -metil e uma substituição do anel de fluoropirimidina por um do grupo azol, ampliando a atividade fungicida do composto original contra muitos fungos (ALMIRANTE & RODRIGUEZ, 2007). Administrado por via oral e com um estômago vazio, a droga é rapidamente e quase completamente absorvida, mas na presença de algum alimento ocorre uma baixa de sua viabilidade e demora na absorção. Segundo Chakrabarti e colaboradores, 2009, esta droga também tem sido usada em crianças com infecções fúngicas invasivas causadas por *Candida*.

Outro azólico, o posaconazol, foi aprovado pelo FDA (United States Food and Drug Administration) em 2006 para a profilaxia de infecções invasivas causadas por *Aspergillus* e *Candida* em pacientes transplantadas, naqueles com leucemia, e em neutropênicos devido à quimioterapia prolongada. Posaconazol é estruturalmente semelhante ao itraconazol e tem um amplo espectro de atividade *in vitro* contra um grande número de leveduras, fungos filamentosos, e, especialmente os Zigomicetos para os quais opções de tratamento são limitadas (CHAKRABARTI et al., 2009). Diferentemente do voriconazol, esta droga é melhor absorvida quando administrado juntamente com alimentos. O posaconazol tem se mostrado efetivo no tratamento de aspergiloses pulmonar, cerebral, e disseminada em vários modelos experimentais *in vivo* (IMAI et al., 2004; KIRKPATRICK et al., 2000). Estudos comparativos randomizados da eficácia e segurança do posaconazol em adultos infectados com HIV com candidíase orofaríngea mostraram que esta droga é tão efetiva quanto o fluconazol (CHAKRABARTI et al., 2009). Uma taxa de 40-80% de resposta foi encontrada em pacientes com uma grande variedade de infecções invasivas inclusive criptococoses, candidíases, feohifomicose, aspergilose e fusariose (WALSH et al., 2002; GREENBERG et al., 2006; RAAD et al., 2006). Os dados de eficácia têm sido encontrados em jovens e adultos, mas não há nenhum dado disponível com relação à segurança e eficácia de posaconazol em neonatos.

Ravuconazol é outro derivado do fluconazol com potente atividade contra espécies de *Candida*, *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis in vitro*. Entretanto, apresenta menor atividade contra *Fusarium* e *Scedosporium* quando comparado ao voriconazol. Além disso, também já foi observada resistência cruzada entre fluconazol e ravuconazol em amostras de *C. glabrata* e outras *Candida* spp. (PFALLER et al., 2004). A droga não tem apresentado nenhuma atividade contra *Rhizopus* spp. e espécies de *Mucor*. A segurança e tolerabilidade de ravuconazol em adultos são semelhantes àquelas observadas para fluconazol, embora não haja, ainda, dados disponíveis para uso terapêutico em crianças (CHAKRABARTI et al., 2009).

BAL-8557 (sulfato de isavuconazonium) é uma nova droga, solúvel em água, obtida a partir da clivagem de BAL-4815 (isavuconazol) (STEINBACH et al., 2005; SCHMITT-HOFFMANN et al., 2006; MOUTON et al., 2005). Vários estudos clínicos randomizados estão avaliando a segurança e eficácia desta droga para o tratamento de infecções invasivas causadas por *Candida* (PFALLER et al., 2004). Triazolicos adicionais, tais como são albaconazol estão sendo submetidos à avaliação clínica inicial. Para todos os triazolicos,

existe uma preocupação com o surgimento cada vez maior de fungos resistentes o que comprometeria o futuro da utilização destes novos compostos (CHAKRABARTI et al., 2009).

A administração profilática de agentes antifúngicos sistêmicos, usualmente fluconazol, é utilizada somente em pacientes considerados com alto risco de adquirir candidíase. Contudo, a profilaxia não é rotineiramente recomendada porque outras espécies de *Candida*, bem como *C. albicans* têm demonstrado resistência a este antifúngico *in vivo* e *in vitro*. (SHEEHAN et al., 1999). Contudo, a resistência adquirida para fluconazol observado para cepas de *C. albicans* isoladas nos últimos anos é atribuída à profilaxia em longo prazo com a droga particularmente em pacientes de AIDS (COMERT et al., 2006).

Algumas revisões têm focado a resistência de *Candida* spp. aos azólicos e a maioria tem colocado o fluconazol em primeiro lugar por ser esta a droga mais extensamente usada (BORMAN et al., 2008; PFALLER et al., 2007; MAHMOUD et al., 1999). *Candida* spp. resistente aos azólicos *in vitro* têm sido mais encontradas em pacientes com AIDS devido à falência do tratamento clínico nesta população de pacientes. Espécies não-*albicans* resistentes ao fluconazol incluem *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. krusei*. Tipicamente estas espécies têm sido isoladas de pacientes que tem recidivas por causa da terapia com azólico e usualmente os altos valores de CIM têm sido associados com falhas clínicas. Muitos dos casos de resistência aos azólicos em pacientes não infectados com HIV estão associados às espécies não-*albicans* tais com *C. krusei*, que são, intrinsecamente, resistentes ao fluconazol. Para *C. albicans* a resistência tem sido descrita raramente em pacientes não-HIV positivos. Segundo SHEEHAN e colaboradores (1999) dois pacientes com leucemia desenvolveram fungemia por *C. albicans* com resistência ao fluconazol e anfotericina B após, aproximadamente, duas semanas de tratamento profilático com fluconazol.

Adicionalmente, estudos têm mostrado que espécies de *Candida* não-*albicans*, especialmente *C. glabrata* e *C. krusei* estão mais ligadas a resistência ao fluconazol. Há dados, *in vitro*, demonstrando que cepas de *Candida* resistentes ao fluconazol são mais aderentes à superfície mucosa fator que, contudo favorece a manifestação da doença (KRCMERY et al., 2002). Segundo LAVERDIERE e colaboradores (2002), as espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol são frequentemente mais suscetíveis aos agentes antifúngicos mais novos incluindo os voriconazol e caspofungina.

O perfil de resistência aos azólicos traz como consequência, na prática clínica, a necessidade da identificação da espécie de *Candida* antes do início da terapêutica antifúngica, pois o fluconazol é contra-indicado para o tratamento de *C. krusei* e *C. glabrata*, resistentes a este azólico (ALVES, 1997; HOBAN et al., 2006).

Tem sido observado, com maior frequência, o isolamento de cepas de leveduras com suscetibilidade diminuída ou resistente aos antifúngicos. Esta resistência pode ser clínica ou *in vitro*. A primeira pode ser consequência do baixo nível do fármaco no tecido e no sangue, devido à interação entre os fármacos ou à imunodepressão do paciente. É consenso que a resistência ao fármaco depende da interação entre o hospedeiro, o fármaco e o fungo, porém os fatores do paciente são os mais importantes para o surgimento da resistência (ZARDO & MEZZARI, 2004).

### **2.3.3 Flucitosina**

Quando usado em combinação com anfotericina B, 5-fluorocitosina pode ter utilidade no tratamento de meningite por *Candida* (DOMER & LEHRER, 1993). Este agente é convertido pela deaminação e fosforilação para ácido 5-fluorodeoxiuridílico, um inibidor competitivo da timidilato sintetase e é também incorporado extensivamente dentro do RNA fúngico. Resistência primária de *C. albicans* para este agente é comum.

O rápido desenvolvimento de resistência pelos organismos tem sido um problema com flucitosina e essa droga é geralmente ineficiente para terapia prolongada quando usada isoladamente. A elevada incidência de resistência natural e adquirida justifica a terapêutica combinada de flucitosina com outros antifúngicos como a anfotericina B. A resistência é uma das principais causas de falhas terapêuticas e se manifesta em percentuais muito elevados (ALVES et al., 1997; VANDEN BOSSCHE et al., 1998).

### **2.3.4 Alilaminas**

A terbinafina é um agente antifúngico sintético do grupo das alilaminas com potente atividade *in vitro* contra um grande número de fungos filamentosos e dimórficos e algumas leveduras. Ao contrário dos azólicos, que são primariamente fungistáticos, a terbinafina tem seu mecanismo de ação explicado pela capacidade de inibir a esqualeno epoxidase, levando a um

efeito fungicida causado pela acumulação de esqualeno na célula fúngica. Estudos anteriores indicaram que a terbinafina seria uma droga de pouca atividade contra *C. albicans*. Em contraste, estudos clínicos demonstraram ser essa droga ativa em candidíases cutâneas e onicomicoses causadas por leveduras do gênero *Candida* (ÖZCAN et al., 2009; RYDER et al., 1998; EVANS 1997).

Segundo Özcan e colaboradores (2009), em seu trabalho para verificar o uso tópico da terbinafina em gel e o seu efeito sobre amostras de *Candida* e outros fungos filamentosos, verificaram que esta droga pode ser sugerida como sistema de terapia tópica promissora para o tratamento de infecções fúngicas por estes microrganismos.

Em estudos para a determinação da susceptibilidade *in vitro*, terbinafina apresentou uma CIM de 1µg/ml para uma amostra de referência de *C. albicans* e foi altamente efetiva contra *C. parapsilosis*. Essa droga demonstrou potencial de atividade contra *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. humicola* e *C. lusitanae*. Por outro lado, a terbinafina não apresentou atividade contra *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (RYDER et al., 1998). Em adição, terbinafina apresenta sinergismo quando associada ao fluconazol contra *C. albicans* multiresistente a várias drogas. Resultados de testes de susceptibilidade *in vitro* sugerem que esta droga possui potencial, quando usada isoladamente ou combinada com outras drogas comumente usadas como o fluconazol, para tratamento de uma gama de infecções graves, causadas por vários agentes fúngicos (RYDER, 1999; JESSUP et al., 2000).

### **2.3.5 Equinocandinas**

Casposfungina pertencente a uma nova classe de antifúngicos, a “equinocandina” é uma droga recente. A absorção oral da casposfungina é baixa (<0.2%) sendo então administrada de forma intravenosa. Esta droga é distribuída rapidamente nas células vermelhas do sangue. Casposfungina é metabolizada no fígado através de sua hidrólise. O metabolismo não é dependente das funções renais ou hepáticas e o sistema enzimático do citocromo P450 não está envolvido (PARAKH et al., 2008).

A casposfungina (acetato de casposfungina) inibe a síntese da  $\beta$  (1, 3) D-glucana sintetase, impedindo a formação de polímeros de glucana, um componente essencial da parede de muitos fungos filamentosos e leveduriformes. A casposfungina apresenta atividade fungicida

contra uma grande variedade de patógenos, incluindo *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Histoplasma* spp. É ativa contra isolados de *C. albicans*, tanto resistentes quanto sensíveis ao fluconazol (BOANG, 2001). Keating & Jarvis (2001) observaram que a caspofungina foi efetiva no tratamento de pacientes com candidíase orofaríngea e esofágica, se caracterizando como uma droga com grande potencial para o tratamento destas infecções.

Caspofungina é uma nova droga antifúngica de importante significado para uso intravenoso sendo comparável a outros agentes antifúngicos como anfotericina B e fluconazol na terapia empírica de pacientes neutropênicos com candidíases orofaríngea/esofágica e aspergilose invasiva. Devido a sua menor toxicidade e excelente perfil de tolerância, a caspofungina tem sido uma boa opção de tratamento para pacientes imunocomprometidos (PARAKH et al., 2008).

Segundo Schilling e colaboradores (2008), casos de osteomielite vertebral causado por *C. krusei* têm sido tratados com posaconazol oral em combinação com caspofungina intravenosa. Esta terapia antifúngica combinada resultou em resposta satisfatória.

A anfotericina B era a droga de escolha para tratar candidíase invasiva em pacientes neutropênicos. Por causa de sua nefrotoxicidade, tem sido substituída por antifúngicos mais novos como o voriconazol, equinocandina para o tratamento de infecções invasivas por *Candida*, particularmente, em pacientes já tratados com drogas nefrotóxicas (FLCKIGER et al., 2006).

Micafungina, como outras equinocandinas, inibe a síntese de 1,3- $\beta$ -D-glucano em células fúngicas e, como resultado, as células são incapazes de manter a sua forma, rigidez e resistência à pressão osmótica, com posterior lise. Micafungina apresenta boa atividade fungicida ou fungistática, *in vitro*, contra um grande número de *Candida* spp. particularmente contra *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. kefyr* (CROSS & SCOTT, 2008).

A absorção oral de micafungina é pequena por causa de seu alto peso molecular, então, só está disponível para administração intravenosa. Micafungina é metabolizado no fígado pela arilsulfatase, catecol-O-metiltransferase e isoenzimas do citocromo P450 (CYP), particularmente por CYP1A2, CYP2B6, CYP2C e CYP3A. A principal via de eliminação da micafungina é a excreção fecal (PFALLER et al., 2008; DANNAOUI et al., 2007).

Segundo Cross & Scott (2008), a micafungina vem emergindo como alternativa para o tratamento de adultos com candidíase esofageal invasiva, apresentando muito boa atividade como agente profilático contra as infecções por *Candida* em pacientes transplantados.

Aminocandina (HMR3270) é uma droga semi-sintética, produto da fermentação do *Aspergillus*, com uma estrutura semelhante à de outros membros da classe equinocandina. Aminocandina tem demonstrado potente atividade contra *Candida* e *Aspergillus* spp. incluindo cepas resistentes ao itraconazol (KRCMERY & KALAVSKY, 2007).

A resistência à equinocandina parece ser um evento raro. Sendo assim, o rápido desenvolvimento de métodos para detectar resistência antifúngica entre espécies de *Candida* tem sido favorecido substancialmente pela alta frequência de infecções causadas por esta levedura, especialmente as formas mucocutâneas (PFALLER et al., 2007; VANDEN BOSSCHE et al., 1998).

#### **2.4 Resposta imune, câncer e a candidíase**

A resposta imune compreende uma série de acontecimentos desencadeado em resposta ao reconhecimento de organismos patogênicos ou danos nos tecidos, envolvendo células e mediadores solúveis, tais como citocinas do sistema imune inata e adaptativa. O objetivo principal desta resposta inflamatória é a remoção do agente estranho e perturbador da homeostase do tecido (MEDZHITOV, 2008). No contexto fisiológico normal, após a reparação dos tecidos ou da eliminação do patógeno, a inflamação é resolvida e o estado homeostático é recuperado (LANDSKRON et al, 2014; NORLING & SERHAN, 2010).

O conceito de que a inflamação crônica inadequadamente resolvida pode aumentar o risco de câncer é amplamente aceito (WANLU LU et al, 2013). Várias patologias podem ilustrar esta ligação, como a endometriose, prostatite crônica, gastrite crônica por *Helicobacter pylori*, doenças inflamatórias intestinais (DII), e infecções primárias do colo como colangite esclerosante. A inflamação pode aumentar o risco de câncer, proporcionando moléculas bioativas a partir de células que se infiltram no microambiente tumoral, incluindo citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas que mantêm sustentada a taxa proliferativa, sinais de sobrevivência celular evitando apoptose, fatores pró-angiogênicos e enzimas que fazem a

modificação da matriz extracelular, tais como as metaloproteinasas que promovem transição epitelial mesenquimal e facilitam outros programas de carcinogênese, como a instabilidade do genoma, a reprogramação do metabolismo energético, e evasão do sistema imune (WANLU LU et al, 2013; HANAHAN & WEINBERG, 2011).

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, que medeiam a comunicação célula-a-célula. Células imunes e estromais, tais como fibroblastos e as células endoteliais, regulam a sua síntese e a sua proliferação, a sua sobrevivência celular, diferenciação, activação das células do sistema imune, a migração de células e sua morte. Dependendo do microambiente tumoral, as citocinas podem modular uma resposta antitumoral, mas durante a inflamação crônica, podem também induzir a transformação celular e sua malignidade (LANDSKRON et al, 2014; ZAMARRON & CHEN, 2011).

O microambiente do tumor é formado por células do estroma, infiltrado de células do sistema imunes e células do tumor que contém fatores que vão promover a carcinogênese. Muitas evidências apontam o envolvimento de citocinas em eventos que levam à iniciação, promoção, invasão e metástases do câncer (LANDSKRON et al, 2014). Em um processo inflamatório crônico, as citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 induzem a geração de radicais livres que podem danificar o DNA, causando mutações que levam a iniciação do tumor. O crescimento do tumor é também favorecido por citocinas pró-inflamatórias que estimulam a proliferação de células e reduzem a apoptose, enquanto que citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ , contribuem para a evasão do tumor. As propriedades invasivas do tumor estão relacionados à ativação do programa de transição epitelial-mesenquimal desencadeada pela TGF- $\beta$  e reforçada por citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$  e IL-6. Citocinas pró-inflamatórias desempenham também um papel importante na angiogênese e metástases. Neste último, quimiocinas tais como IL-8 tem um papel importante na migração celular para outros tecidos (LANDSKRON et al, 2014).

Embora tenha sido observado que muitas citocinas contribuem para a carcinogênese, seus papéis pró ou anti-tumorais dependem dos diferentes mediadores inflamatórios e da fase de desenvolvimento do tumor. Nesta linha, o papel das citocinas tem sido relatado, como um marcador de diagnóstico para o câncer. A determinação dos níveis séricos de citocinas, tais como IL-6 ou IL-10, pode ser associado a um processo tumorigênico ou como um mal prognóstico (HEIKKILÄ et al, 2008; LECH-MARANDA et al, 2006).

A IL-10 é uma citocina multifuncional, que apresenta propriedades imunossupressoras e anti-angiogênicas. Conseqüentemente, IL-10 desempenha um papel controverso na carcinogênese humana, atuando como um fator de promoção e inibição do tumor (MOCELLIN et al, 2005). A informação disponível sobre a produção de IL-10 em tumores humanos, incluindo os carcinomas do ovário, mama, rim, pulmão e pele, incluindo melanoma, foi anteriormente relatada. Em carcinogênese coloretal, a IL-10 promove o crescimento do câncer em vez de inibir, através da sua atividade imunossupressora (STANILOV et al, 2010). Estudos anteriores sugeriram que o aumento da IL-10 pode controlar os níveis de respostas inflamatórias e desenvolvimento de câncer e constituem um fator de risco para a carcinogênese. No entanto, em certos tipos de câncer, baixa expressão de IL-10 pode constituir um fator de risco para a doença ou progressão da doença (WANG et al, 2013).

Estudos anteriores in vitro com células humanas e de carcinoma de células escamosas orais demonstraram que a concentração de certas citocinas pró-inflamatórias e pró-angiogênicas, tais como TNF- $\alpha$  IL-1, IL-6 e IL-8 estão aumentadas. Existem evidências de que estas citocinas estão sendo produzidas de modo desregulado em carcinoma de células escamosas da orofaríngea e que vão ter funções no crescimento celular, invasão, interrupção na supressão tumoral e na resposta imune (SAHEBJAMEE et al, 2008; RHODUS et al, 2005).

A literatura tem evidenciado também que a resposta imune inata e adaptativa estão envolvidas e possuem papel importante frente a infecções por *C. albicans*. Trabalhos envolvendo modelos murinos têm demonstrado que as infecções mucocutâneas estão normalmente associadas a uma resposta imune celular deficiente. Já as infecções sistêmicas estão mais relacionadas a uma imunidade inata caracterizada pela deficiência na função ou no número de neutrófilos (ASHMAN, 2004). Em infecções sistêmicas por *Candida*, no que diz respeito à imunidade inata, tem sido demonstrada a importância das células polimorfonucleares na patogenicidade das candidíases. (CALDERONE et al., 1994; ROMANI et al., 1996). Segundo Peltroche-Llacsahuanga (2000), o processo de fagocitose exercido pelos neutrófilos frente a duas espécies de *Candida* mostrou-se eficiente, evidenciando a importância dessas células frente a esse patógeno. Paralelamente, também tem sido demonstrado que indivíduos que apresentam períodos prolongados de neutropenia são mais susceptíveis ao surgimento de candidíase disseminada (KONTOYIANNIS et al., 2000).

Em infecções orais causadas por *Candida* observa-se uma resposta imune celular deficiente, como por exemplo, crianças que apresentam aplasia tímica (Síndrome DiGeorge), pacientes portadores do vírus da imunodeficiência -HIV e indivíduos submetidos a tratamentos quimioterápicos e radioterápicos seriam susceptíveis a infecções orais por *Candida* (FARAH et al., 2001; REGEZI & SCIUBBA, 1999).

Uma resposta fagocítica efetiva depende do balanço entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas pelos linfócitos T. Estudos utilizando modelos animais infectados com *C. albicans* tem evidenciado o papel protetor dos linfócitos T CD4+ produtores de citocinas tipo 1 frente a essa infecção. Por outro lado, já foi demonstrado um papel supressor da resposta do hospedeiro por meio de linfócitos T CD4+ produtores de citocinas do tipo 2, sendo a citocina IL-12 necessária para a diferenciação dos linfócitos Th1. A produção dessa citocina pelos neutrófilos estaria associada a uma resposta protetora. Além disso, parece que IL-12 desempenha um papel efetivo na resposta protetora do indivíduo susceptível à candidíase acentuando o processo de fagocitose de *C. albicans* pelos neutrófilos (PUC CETTI et al., 1995; ROMANI et al., 1995; ROMANI et al., 1995; ROMANI et al., 1997; MENCACCI et al., 1998; PUC CETTI et al., 1994; TONNETTI et al., 1995).

Os neutrófilos são considerados as células efetoras primárias para a lise de *C. albicans in vivo*, apesar de os macrófagos estarem envolvidos na imunidade celular no controle da infecção. Recentemente verificou-se que os neutrófilos, além de seu papel efetor, desempenham uma função imunorregulatória no desenvolvimento de respostas Th1, pois se encontram em número elevado nos locais de infecção por *C. albicans* e produzem seletivamente citocinas IL-12 e IL-10, sendo assim, importante na determinação do tipo de resposta Th anti *Candida* (BLANCO & GARCIA, 2008).

As citocinas têm um papel fundamental na candidíase, não apenas como mediadores das funções efetoras, mas também como moléculas chave na diferenciação das subpopulações de linfócitos T que atuam na imunidade protetora contra essa micose. Em modelos experimentais murinos verificou-se que o desenvolvimento de resposta anti *Candida* protetoras tipo Th1 requer o efeito conjunto de várias citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12, em um contexto de relativa ausência de citocinas inibitórias Th2 como IL-4 e IL-10 (BLANCO & GARCIA, 2008).

Deficiência em TNF- $\alpha$  e IL-6 aumenta a susceptibilidade de camundongos à infecção por *C. albicans*. Deficiência de IL-12, IL-4 ou IFN- $\gamma$ , apesar de não afetar a resistência a infecções primárias, tornou-os animais suscetíveis a reinfecção. Foi observada produção reduzida de IL-4 e IL-10, assim como produção aumentada de IFN- $\gamma$  e IL-2, em camundongos que resistiam a infecções primárias ou secundárias por *C. albicans*. Ao contrário, altos níveis de IL-4 e IL-10 e baixos níveis de citocinas Th1 foram detectados em animais que não resistiam a infecções primárias ou secundárias por esses fungos (BLANCO & GARCIA, 2008).

Em relação ao papel da citocina IFN- $\gamma$ , ela é necessária para a ativação de células fagocitárias como os macrófagos onde auxilia na indução da resposta imune protetora, e favorece o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th1 (SCHALLER et al., 2004; GOZALBO & GIL, 2009). Lin Lin e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos selvagens deficientes em IFN- $\gamma$ , mas não de IL-17 são mais suscetíveis as infecções por *Staphylococcus aureus* e *C. albicans*. Além disso, estes mesmos autores evidenciaram que camundongos vacinados com a porção aminoterminal recombinante extraído da adesina, mais adjuvante AL (OH<sub>3</sub>) induziram uma imunidade protetora nos animais associados a mecanismos efetores dependentes de linfócitos TCD4+IFN- $\gamma$ +, linfócitos Th-17 e fagocitose funcional. A vacina foi capaz de ativar linfócitos Th1, Th 17 e Th1/17 induzindo a produção de citocinas inflamatórias capaz de favorecer a morte de ambos os microrganismos, por fagocitose, também houve um aumento na migração de neutrófilos para o tecido. Todos esses fatores contribuíram para a diminuição dos microrganismos.

Por outro lado, no que diz respeito às citocinas reguladoras, trabalhos, na literatura têm mostrado que IL-10 inibe a síntese de citocinas por monócitos humanos, suprime a produção de citocinas pró-inflamatória, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ , diminui a atividade fagocítica dos neutrófilos e, reduz a atividade antifúngica dos monócitos humanos frente a pseudohifa e blastoconídio produzidos pela *C. albicans* (CASSATELLA, 1998; ROILIDES et al., 1998; FARAH et al., 2002).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar as leveduras do gênero *Candida* isoladas da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico quanto ao perfil de virulência e de susceptibilidade aos antifúngicos e verificar o perfil imunológico destes indivíduos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Isolar e identificar, por métodos morfofisiológicos e moleculares, leveduras do gênero *Candida* da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico e de indivíduos controles.
2. Avaliar os fatores de virulência das espécies de leveduras isoladas de mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico, avaliando a produção das exoenzimas fosfolipase e proteinase e a capacidade de adesão destas amostras;
3. Avaliar o perfil de susceptibilidade das espécies de leveduras isoladas da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico e de indivíduos controles aos principais antifúngicos de interesse clínico;
4. Avaliar o perfil imunológico dos indivíduos com câncer orogástrico e medir a concentração de citocinas do tipo I e tipo II no plasma destes pacientes e de indivíduos do grupo controle.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Etapa clínica

A etapa clínica teve início após aprovação do projeto e do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos Comitês de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), da Policlínica Municipal e do Núcleo de Especialistas em Oncologia (NEO), da cidade de Governador Valadares, MG.

#### 4.1.1 Cuidados com o paciente

Os pacientes convidados a participar da pesquisa, foram informados dos objetivos da pesquisa e dos métodos de estudo. Ao concordarem em fazer parte da pesquisa eles assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este contato inicial com o paciente se deu individualmente no consultório odontológico do dentista colaborador do projeto e do médico oncologista do NEO, para que não ocorresse nenhum constrangimento. Diante do fato de um procedimento invasivo como coleta de sangue e do fragmento da lesão, eles poderiam apresentar manifestações como resistência ao procedimento por medo, dor e vertigens o que implicaria a realização da coleta em um ambiente adequado como o consultório odontológico, pois apresenta uma cadeira reclinável, dando condições para o paciente permanecer deitado. A coleta de sangue foi realizada por um profissional da área de saúde, enfermeiro habilitado para prestar os primeiros atendimentos, caso o paciente apresentasse algum mal estar. Para a biópsia os pacientes foram anestesiados e, no caso de sinais de reação alérgica o dentista ou o médico responsável tiveram autonomia para prestar os devidos atendimentos de urgência no sentido de preservar a vida deste paciente. Após o efeito do anestésico, o dentista também podia fazer a prescrição do medicamento adequado para aliviar um possível desconforto.

#### 4.1.2 Grupo de estudo

Foram recrutados 108 pacientes com câncer sendo selecionados 59 com câncer orogástrico (grupo teste) de ambos os sexos, com idade acima dos 20 anos. Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico de neoplasia, confirmado por biópsia, que ainda não tinham iniciado o tratamento quimioterápico e portadores de *Candida* na mucosa oral. O diagnóstico de câncer oral foi estabelecido a partir de exame clínico realizado pelo dentista estomatologista colaborador na pesquisa e para os cânceres de esôfago a gástrico pelo médico

gastroenterologista, também colaborador neste trabalho, seguido de biópsia com confirmação histopatológica. Destes foram selecionados somente os que apresentavam a levedura na cavidade oral.

Com relação ao grupo controle, foram avaliados 34 indivíduos sem manifestações clínicas de câncer (controle) também de ambos os sexos, com idade acima dos 20 anos, que não apresentavam nenhum outro tipo de lesão na cavidade oral, possuíam boa higienização, não faziam uso de nenhum antimicrobiano e que consentiram em fazer parte do estudo. Os indivíduos do grupo controle são profissionais que trabalham na Instituição Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE) e que foram selecionados após avaliação do questionário 2 (anexo 2) apresentado ao grupo.

Após avaliação do questionário, sem prejuízo para o acompanhamento dos pacientes, não foram incluídos no estudo indivíduos portadores de alterações sistêmicas e que tinham feito uso de antimicrobianos nos três meses anteriores à data de coleta do material. Os dados dos indivíduos foram registrados em uma ficha, conforme modelo, anexo 1, após a avaliação clínica.

#### **4.1.3 Coleta de espécimes clínicos e diagnóstico**

As coletas foram realizadas na Policlínica Municipal e Núcleo de Especialistas em Oncologia de Governador Valadares, Minas Gerais, pelo dentista estomatologista e patologista bucal Dr. Juan Moisés Zonis e a enfermeira responsável pelo setor.

Os espécimes clínicos para análise microbiológica foram coletados da cavidade oral, na mucosa jugal e língua, utilizando-se swab esterilizado. Os swabs foram introduzidos em tubos contendo caldo Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (0,1 mg/mL) e encaminhados ao Laboratório de Microbiologia da Univale, sendo incubados a 28°C por 72h para os ensaios microbiológicos subsequentes.

Para avaliação da citologia como método de diagnóstico do câncer de boca, cinco amostras foram coletadas por meio de raspagem da superfície da lesão, utilizando-se uma escova (*cytobrush*). O material foi imediatamente transferido para lâmina e fixado em álcool 95%.

Depois de fixadas, as lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (H&E) e analisadas por um patologista.

Para confirmação do diagnóstico clínico foi realizada uma biópsia. Em lesões de até 1 cm foi feita biópsia excisional, enquanto que em lesões com mais de 1 cm o exame foi incisional com a escolha da área mais significativa. O fragmento coletado foi fixado em formol tamponado a 10%. O material foi processado e foram realizados cortes de 5 micra para cada amostra. As lâminas foram coradas com H&E e analisadas por um patologista.

Tanto os fragmentos representativos da lesão quanto às lâminas para citologia foram enviadas ao laboratório de Patologia Clínica do Dr. Daniel Alvarenga, colaborador do projeto, para a realização dos exames histopatológicos e citológicos.

## **4.2 Etapa laboratorial**

### **4.2.1 Identificação preliminar de microrganismos**

Os tubos contendo caldo Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (0,1 mg/mL) foram incubados a 28°C por 72h. Após este período, os tubos que apresentaram turvação, demonstrando crescimento foram semeados em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, Difco) para permitir a visualização das colônias com características macroscópicas compatíveis com aquelas de leveduras do gênero *Candida*. As amostras foram submetidas à coloração pelo método de Gram para a visualização preliminar das leveduras. Com base nestes achados, foram feitos novos repiques em ASD e no meio CRHOMagarCandida das colônias com características sugestivas das leveduras a serem estudadas, para obtenção de cultura pura e subsequente identificação, segundo técnicas preconizadas por VAN DER WALT & YARROW (1984) e KURTZMAN & FELL (1998).

As leveduras foram mantidas em tubos de ensaio, com tampa de rosca, em meio de ASD e estocadas a 4°C, com repiques trimestrais.

### **4.2.2 Identificação fenotípica dos isolados**

Para identificação das leveduras do gênero *Candida* foram utilizadas técnicas de estudo micromorfológico, bem como moleculares. Em todos os testes realizados, foi utilizado um

isolado de *Candida albicans* IC 269, da coleção do laboratório de Micologia do ICB/UFMG, considerada como controle positivo.

As amostras foram cultivadas em placas de Petri em ASD e, após o período de incubação de 48 horas a 35°C, foi realizada a caracterização macroscópica das culturas das amostras orais de todos os pacientes. As colônias foram avaliadas quanto a o aspecto e quanto à pigmentação. Para identificação específica presuntiva foram semeadas no meio de CHROMagar*Candida*. Colônias que apresentavam aspectos cor e/ou tonalidades compatíveis com o crescimento da *Candida* nestes meios foram reisoladas em tubos contendo ASD para posterior identificação específica por técnicas de estudo micromorfológico bem como moleculares.

#### **4.2.2.1 Microcultivo em lâmina**

Um bloco de ágar fubá acrescido de Tween 80 foi colocado sobre uma lâmina de vidro estéril. Após, as leveduras foram semeadas fazendo-se três estrias centrais no bloco de ágar. O inóculo foi coberto com lamínula esterilizada e incubado em placa de Petri esterilizada com um pedaço de algodão embebido em água, a 28°C, por até, sete dias (LACAZ et al., 2002). A leitura do crescimento foi feita após cinco dias de incubação para pesquisa da formação de micélio verdadeiro, pseudomicélio e clamidosporo.

#### **4.2.2.2 Prova de resistência a temperatura**

Todas as leveduras cultivadas em ASD, com 24 a 48 horas de crescimento foram inoculadas em uma nova placa contendo o mesmo meio, e incubadas à temperatura de 42 e 45°C. O crescimento foi observado após um período de 48 horas.

#### **4.2.2.3 Meio de Caldo Sabouraud hipertônico**

Outro teste utilizado na identificação presuntiva de *C. dubliniensis* é o teste de crescimento no Caldo Sabouraud hipertônico. Alves e colaboradores (2002) relataram a utilização deste teste baseado na incapacidade dessa espécie de crescer em caldo Sabouraud suplementado com 6,5% de cloreto de sódio e incubados por 96 horas a 35°C. As leveduras que não crescem sob esta condição são consideradas *C. dubliniensis*. Resumidamente, uma pequena porção de cada

cultura de 48h em ágar Sabouraud foi suspensa em água destilada estéril e, em seguida, espectrofotometricamente ajustada para produzir uma suspensão com transmitância de 85% a 530 nm. Alíquotas de 20µL de cada inóculo foram adicionadas a tubos contendo 1mL de caldo Sabouraud estéril suplementado com 6,5% de cloreto de sódio e, em seguida, foram incubados por 96h a 35°C. Tubos separados contendo inóculos e caldo Sabouraud padrão foram preparados e incubados sob as mesmas condições para confirmar a viabilidade de todos os organismos testados. As culturas foram então examinadas visualmente para a detecção de crescimento de fungos com intervalos de 24h.

#### **4.2.3 Identificação das leveduras por MALDI-TOF MS**

A confirmação das espécies de *Candida* pela Matrix - Laser Assistido pela distorção de ionização - Espectrometria de Massa (MALDI-TOF MS) foi realizada utilizando o sistema VITEK-MS (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França).

As leveduras foram cultivadas em placas contendo Ágar Sabouraud durante 24 h, a 37° C. As células leveduriformes eram inoculadas uma pequena quantidade de uma única colônia que foi transferida diretamente do meio de cultura para a lâmina descartável na posição alvo (bioMérieux, França), colocando uma fina camada da amostra. Em seguida, 1 µl de ácido fórmico a 70% foi adicionado a cada amostra e adicionado 1 µL de α-ciano-4-hidroxicinâmico da solução matriz de ácido na posição alvo e deixadas secar ao ar. Finalmente, o espectro de massa adquirido para cada levedura isoladas foi comparado com a os espectros de massa padrão contidos no banco de dados e dada uma pontuação de confiança quanto mais próximo o espectro adquirido combinava com os que continham no banco de dados. As lâminas resultantes foram então analisados em o instrumento VITEK® MS, utilizando uma base de dados de análise automática dos espectros de massa obtidos dentro software MYLA® (bioMérieux, França) para fornecer a identificação dos isolados.

#### **4.3 Fatores de Virulência**

Para a realização dos testes de virulência foram utilizadas 62 amostras de *Candida* spp. provenientes da cavidade oral de pacientes com câncer oro-gástrico e 21 da mucosa oral dos indivíduos pertencentes ao grupo controle.

#### 4.3.1 Teste de adesão

As leveduras foram inoculadas em ASD e incubadas a 37°C por 24h. Foi preparada uma suspensão de células em tampão fosfato a uma densidade óptica de 1,5 a 520 nm. Dessa suspensão de células, 1 mL foi adicionado a tubos contendo 4 mL de caldo Sabouraud Dextrose (controle) o que proporcionou uma suspensão final de  $10^6$  a  $10^7$  células/mL. Os tubos foram incubados sob agitação a 37°C por uma hora.

O método preconizado por Kimura e Pearsall (1978) modificado, foi utilizado para a preparação das células epiteliais bucais (CEB) para o teste de adesão. Células bucais humanas de adultos jovens saudáveis, não portadores de leveduras do gênero *Candida* na cavidade oral, foram coletadas pela manhã, no mesmo horário do dia, com o auxílio de dois swabs esterilizados, e depositados em 10 mL de tampão fosfato. A suspensão de CEB foi lavada quatro vezes em tampão fosfato esterilizado (3000g por 10 min) para a remoção de microrganismos aderidos. As CEB foram então diluídas a uma concentração de  $10^5$  células/mL, contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer, e utilizadas imediatamente para o teste de adesão.

Para o teste de adesão, 0,5 ml da suspensão de CEB e 0,5mL da suspensão de leveduras foram misturados delicadamente e incubados a 37° C por uma hora. A mistura foi então filtrada em filtro de policarbonato de poros de 12µm. Após a filtragem, este filtrado foi lavado com 100mL de tampão fosfato para remoção de leveduras não aderidas. O filtro foi retirado com o auxílio de uma pinça e pressionado contra uma lâmina de vidro. Após 10s, o filtro foi removido delicadamente, deixando as CEB aderidas à lâmina de vidro. A preparação foi seca, fixada pelo calor e corada com cristal violeta. O número de leveduras aderidas a 50 CEB foi quantificado por microscopia óptica. Células dobradas ou sobrepostas foram excluídas. Após a contagem foi feita a média e o desvio padrão das amostras.

Para verificar a capacidade de adesão das leveduras, foi realizada também uma preparação de células de quatro pacientes diferente sendo um indivíduo com câncer e com a presença de *Candida*, outro com câncer e sem *Candida*, outro sem câncer, porém com *Candida* e o último sem câncer e sem *Candida* diante de uma única espécie de *Candida* que tinha apresentado os fatores de virulência proteinase e fosfolipase.

### 4.3.2 Produção de Proteinase

Os métodos utilizados para determinar a atividade de proteinase foram preconizados por Cassone et al., (1987) e De Bernardis et al., (1999). A secreção de proteinase foi avaliada em meio sólido contendo 11,7g de Yeast Carbon Base (YCB, Difco), 1,0g de extrato de levedura, e 2,0g de albumina de soro bovino (ASB) em 100mL de água. O pH foi ajustado para 5,0, o meio foi esterilizado por filtração e adicionado a uma solução de ágar esterilizada em autoclave (18g de ágar em 900mL de água destilada). O inóculo consistiu de 10 $\mu$ L de uma suspensão de 10<sup>6</sup> células/mL depositados sobre o ágar. As placas foram incubadas por sete dias a 28°C e a proteólise da ASB foi visualizada como um halo transparente após a coloração com negro de amido (negro de amido, 1g, ácido acético glacial, 199mL, água destilada, 100mL). A atividade de proteinase foi classificada como negativa, quando não havia clarificação visível, 1+, quando a proteólise ao redor da colônia era de 1 a 2 mm e 2+, quando a descoloração do ágar chegava a exceder 3-5mm ao redor da colônia. Cada isolado foi testado em duplicata.

### 4.3.3 Produção de Fosfolipase

O teste para verificação da produção de fosfolipase foi realizado segundo o método descrito por Polak (1992) com algumas modificações. Para a detecção foi preparado um meio base contendo: 20 g de glicose, 10 g de peptona, 5 g de extrato de levedura, 58,5 g de cloreto de sódio, 0,55 g de cloreto de cálcio e 20 g de ágar em 840 mL de água destilada. O meio foi autoclavado e, após o resfriamento até 40° C, foram adicionados 160 mL de uma emulsão de gema de ovo (50% gema de ovo, 50% solução salina). O inóculo consistiu de 10  $\mu$ L de uma suspensão 10<sup>6</sup> células/mL depositada sobre este meio. As placas foram incubadas a 37° C por quatro dias. A atividade de fosfolipase (Pz) foi calculada como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação, de acordo com Priceet et al. (1982). Quando  $Pz = 1$ , a amostra é negativa para a produção de fosfolipase. Se  $Pz \leq 1$ , a amostra é considerada positiva (P) e se  $Pz \leq 0,63$  a amostra é considerada fortemente positiva (FP). Cada isolado foi testado em duplicata.

#### 4.4 Perfil de susceptibilidade às drogas antifúngicas

A concentração inibitória mínima (CIM) das drogas antifúngicas foi determinada por meio da técnica de microdiluição em meio líquido, proposta pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), documento M27-A3. Nestes ensaios foram testados os antifúngicos, anfotericina B, voriconazol, isoconazol, cetoconazol e fluconazol. Para o preparo da solução estoque foram pesados 10 mg de cada droga. As soluções estoques de cada droga apresentaram as seguintes concentrações: anfotericina B, 625 µg/mL; fluconazol, voriconazol, isoconazol e cetoconazol, 1250 µg/mL. A anfotericina B foi solubilizada em dimetil sulfoxido (DMSO), na concentração de 1% do volume da solução mãe. Para as demais drogas não foi necessário a utilização do solvente pois as mesmas são solúveis em água. Todas as drogas foram preparadas no momento do teste. A partir destas soluções foram feitas as diluições seriadas em meio sintético RPMI 1640 tamponado (pH 6,9) com tampão MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico). As concentrações testadas correspondem a uma faixa de intervalo referida na literatura como padrão de susceptibilidade de *Candida*. Para anfotericina B e fluconazol as concentrações testadas foram de 0,0312 a 64 µg/mL. Para a técnica de microdiluição foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato, com tampa. Em cada poço foram dispensados 100 µL de cada concentração da droga antifúngica. Cada placa foi utilizada para uma droga e as concentrações foram distribuídas em ordem decrescente. As amostras foram testadas em duplicata.

Para padronização do inóculo das células de leveduras foi empregado o método espectrofotométrico proposto por Pfaller et al., (1988). As leveduras foram cultivadas em tubos contendo ASD e incubadas a 35°C durante 24 horas. A massa de células obtida foi recolhida assepticamente e ressuspensa em tubos contendo 5 mL de salina esterilizada a 0,85%. Após homogeneização em vórtex, a transmitância foi medida em fotocolorímetro a 520 nm, sendo ajustada para 75 a 77%. Para facilitar a padronização do inóculo, após a leitura da transmitância foi utilizado o cartão de Wickerham correspondendo ao padrão 1+.

Para cada amostra foram preparados os inóculos, segundo técnica descrita previamente. Foi feita uma diluição a partir do inóculo inicial denominada “highest test inoculum” correspondendo a uma diluição de 1:50. A diluição foi feita em meio RPMI com MOPS segundo descrito por Espinel-Ingroff et al., (1992). O inóculo do teste correspondeu a uma concentração celular na ordem de  $10^4$  UFC/mL. A cada diluição da droga previamente

distribuída em cada orifício da placa foi adicionado 100 µL do inóculo, perfazendo um volume final de 200 µL. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e a leitura foi feita após 24 e 48 horas de incubação. A leitura foi baseada em escala de turvação visual de um tubo controle representado por: 0 (totalmente claro); 1 (levemente turvo); 2 (turbidez intermediária) referente a 80% da redução do crescimento; 3 (turbidez proeminente) e 4 (totalmente turvo). A CIM de azóis foi traduzida pela concentração na qual ocorreu aproximadamente 80% de redução no crescimento, enquanto para a anfotericina B, a CIM foi aquela que apresentou completa ausência de crescimento (PFALLER & BARRY, 1994). Os resultados definitivos dos valores da CIM correspondem à leitura de 48 horas segundo técnica anteriormente descrita.

#### **4.5 Caracterização das citocinas no soro dos pacientes**

Nos ensaios para a caracterização de amostras de soro de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer orogástrico foram quantificadas as citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17. Os níveis dos analitos avaliados foram quantificados utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD, Pharmingen, E.U.A.) que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as analitos de interesse, que são detectados nos canais FL3/FL4. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de até vinte analitos em um mesmo ensaio, empregando-se um pequeno volume de amostra (50 µl). Alíquotas de 25 µL dos padrões de citocinas foram submetidos à diluição seriada com diluente G (solução diluente tamponada), "Padrão sem diluição" – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL e 25 µL de diluente G apenas (controle negativo). As amostras e os padrões foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 ml. A cada tubo foi adicionado 15 µL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17) mais 18 µL do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas conjugados com ficoeritrina - PE (reagente B) e incubados por 3 horas, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µl da solução F (Tampão fosfato salínico) e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos a 18° C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, E.U.A.).

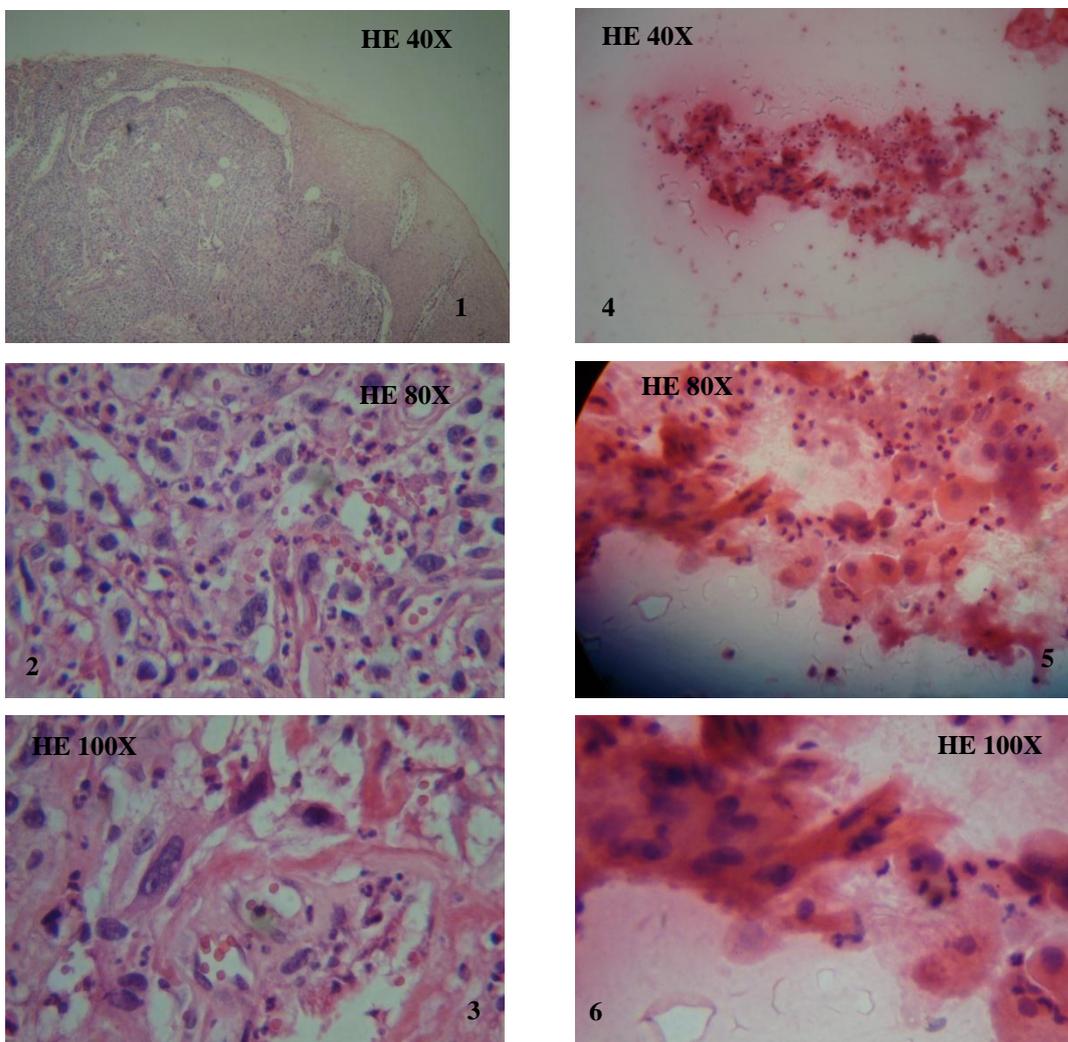
#### **4.6 Análise Estatística**

Para a análise dos dados gerados pelos experimentos os resultados foram analisados estatisticamente usando Windows SPSS versão 11.0. Fazendo a comparação entre as médias, foi feita a análise de variância (*one way analysis of variance*), utilizando-se do processo de Diferença Mínima Significativa (DMS) e Teste t- Student para avaliar a diferença estatística entre as leveduras isoladas do grupo controle e dos indivíduos com câncer oro gástrico quanto à produção dos fatores de virulência. Kruskal-Wallis para avaliar o perfil de resposta imune através da avaliação das médias entre os valores obtidos para as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17. Os valores de *P* menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa EPISTAT (T.L. Gustafson, Round Rock, USA). Para todos os métodos realizados neste trabalho, foram utilizados experimentos em triplicata.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Diagnóstico do câncer

O teste histológico considerado “padrão ouro” para o diagnóstico do carcinoma de células escamosas oral, nos resultados preliminares, para os seis indivíduos investigados, demonstram que este método obteve uma sensibilidade de 100%. Tanto o exame histopatológico mais utilizado para a análise de lesões suspeitas de malignidade, quanto o exame citopatológico, considerado uma forma de diagnóstico alternativo, demonstraram sensibilidade de 100% em todas as amostras analisadas, conforme demonstrado na Figura 1 e 2.



**Figura 1.** Revestimento normal à DIREITA e erodido à ESQUERDA, com proliferação de células neoplásicas para baixo da mucosa normal, evidenciando invasão. Imagens 2 e 3. Cortes histológicos contendo células escamosas soltas, exibindo núcleos pleomórficos, hipercrômicos e até bizarros, com cromatina irregular e nucléolos por vezes evidentes. Imagens 4, 5 e 6: Esfregaços contendo células escamosas atípicas soltas, exibindo núcleos pleomórficos e hipercrômicos, com cromatina irregular e nucléolos por vezes evidentes. O citoplasma é eosinofílico.

## 5.2 Grupo de estudo

Para o isolamento das leveduras da mucosa oral dos indivíduos foi utilizado um *swab*. Este foi passado na cavidade oral de 108 indivíduos com diagnóstico confirmado de câncer (grupo teste) e 34 indivíduos sem câncer, como grupo controle. Para fazer parte do grupo teste foram selecionados somente os indivíduos que apresentaram o câncer oro gástrico sendo um total de 59 pacientes. Desses que faziam parte do grupo de estudo, 50 (85%) apresentaram a levedura na cavidade oral, sendo que em oito destes pacientes foram isoladas duas espécies distintas de *Candida* e em dois foram isoladas três espécies diferentes somando um total de 62 leveduras isoladas. Quanto ao grupo controle, dos trinta e quatro indivíduos coletados, 20 foram positivos quanto à presença de *Candida* (59%), um indivíduo apresentou duas espécies na cavidade oral somando 21 isolados (Figura 3). Após análise estatística, foi observado que, quanto à presença de *Candida* entre os indivíduos que fizeram parte do estudo, o valor de  $p < 0,0239$ , apresentando assim diferença estatística.

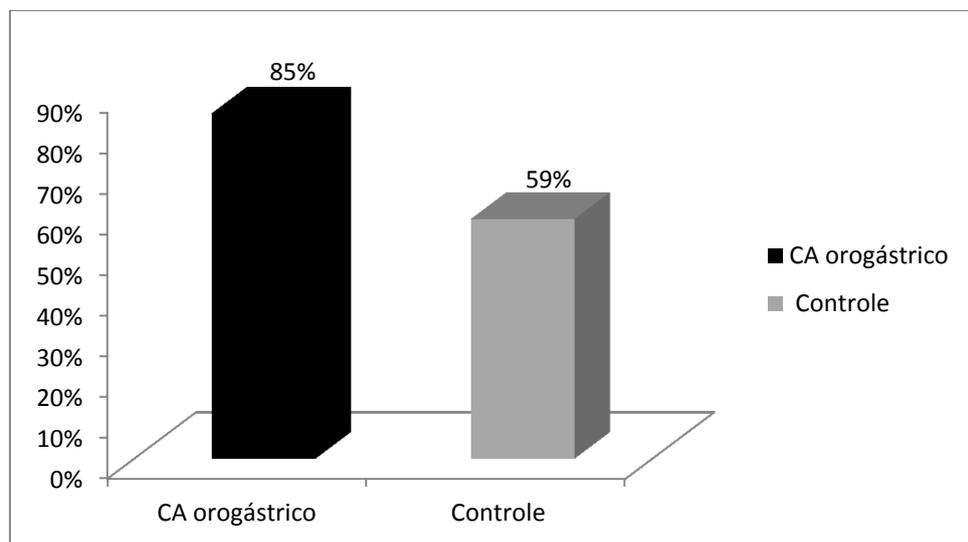


Figura 2. Frequência de indivíduos positivos para a presença de *Candida* spp. Na cavidade bucal.

Dos 50 indivíduos do grupo com câncer orogástrico, tem-se 21 (42%) com câncer de boca, 14 (28%) de esôfago, 2 (4%) de pescoço, 7 (14%) de estômago e 6 (12%) de laringe como mostra a Figura 4.

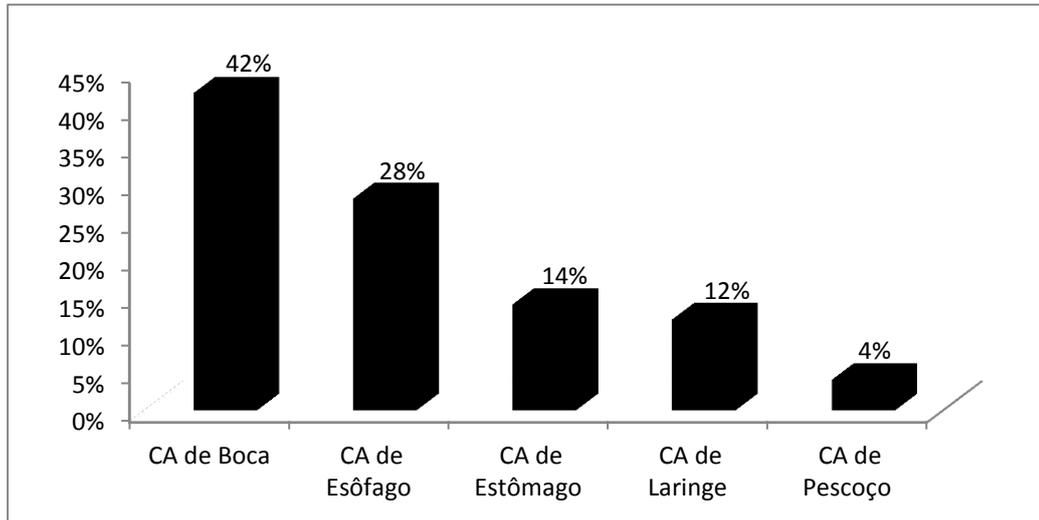


Figura 3. Distribuição percentual dos casos de câncer orogástrico por sítio anatômico. CA = câncer.

### 5.3 Identificação das amostras de *Candida*

Neste estudo, as amostras de leveduras do gênero *Candida* recuperadas da cavidade oral de pacientes com câncer e de indivíduos sem câncer (grupo controle) foram identificadas de acordo com suas características morfológicas, fisiológicas e moleculares, pela espectrometria de massa MALDI-TOF. Os resultados obtidos estão expressos na tabela 3. Nos indivíduos com câncer 30 (48,3%) amostras foram identificadas como *C. albicans*, 6 (9,7%) como *C. tropicalis*, 9 (14,5%) como *C. glabrata*, 4 (6,4%) como *C. krusei*, 8 (13%) como *C. parapsilosis* e 5 (8,1%) como *C. lusitaniae*. Para o grupo controle 14 (66,7%) foram identificadas como *C. albicans*, 5 (23,8%) como *C. parapsilosis*, 1 (4,8%) como *C. krusei* e 1 (4,8%) como *C. glabrata*. Para as amostras de *C. albicans* identificadas, foi observada a produção de clamidosporo. Nas amostras de *C. tropicalis*, foram observados clamidiosporos em forma de “lágrima” (Figuras 6 e 7). A distribuição das espécies de *Candida* está ilustrada na Figura 5.

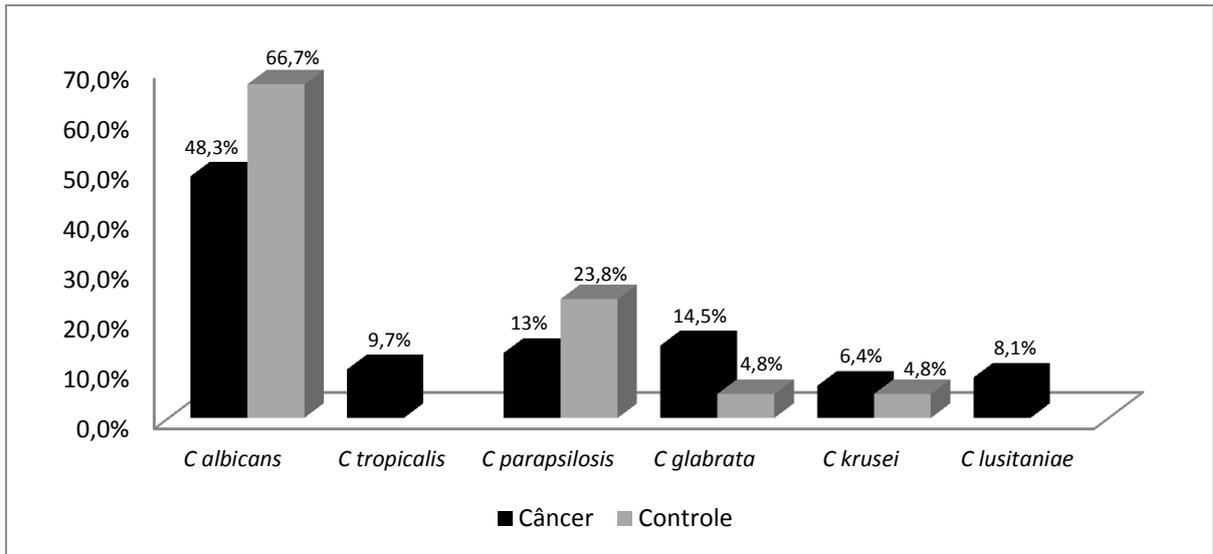


Figura 4. Distribuição percentual das espécies de leveduras do gênero *Candida*, isoladas da mucosa oral de indivíduos com câncer orogástrico e de indivíduos do grupo controle identificados por técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares.

Tabela 3: Distribuição das espécies de *Candida* isoladas dos indivíduos com câncer orogástrico e indivíduos do grupo controle por métodos morfo fisiológicos e moleculares.

Métodos de identificação			
Código	Microcultivo	MALDI-TOF	Espécie
YCa1	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa2	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa3	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa4	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa5	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa6	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa8	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa9	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa10	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa11	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa12	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa13	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa14	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
YCa15	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>

---

YCa16	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
YCa17	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa18	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa19	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa20	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa21	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa22	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa23	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
YCa24	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa25	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
YCa26	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
YCa27	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa28	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa29	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
YCa30	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa31	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa32	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa33	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa34	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa35	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
YCa36	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa37	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa38	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa39	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>
YCa40	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa41	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
YCa42	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa43	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
YCa44	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa45	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa46	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa47	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa48	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa49	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa50	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
YCa51	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>

---

YCa52	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa53	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa54	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa55	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCa56	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
YCa57	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCa58	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa59	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. lusitaniae</i>
YCa60	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa61	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCa62	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCo2	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCo3	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCo4	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCo5	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCo7	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCo11	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCo13	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
YCo16	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
YCo17	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
YCo9	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo23	<i>C. parapsilosis</i>	Não Amplificado	<i>C. parapsilosis</i>
YCo26	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo28	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo33	<i>C. parapsilosis</i>	Não Amplificado	<i>C. parapsilosis</i>
YCo35	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo36	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo37	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo39	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo42a	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>
YCo42b	<i>C. krusei</i>	Não Amplificado	<i>C. krusei</i>
YCo43	<i>C. albicans</i>	Não Amplificado	<i>C. albicans</i>

YCa – Leveduras dos pacientes com câncer; YCo – Leveduras grupo controle; a,b e c diferentes amostras do mesmo paciente.

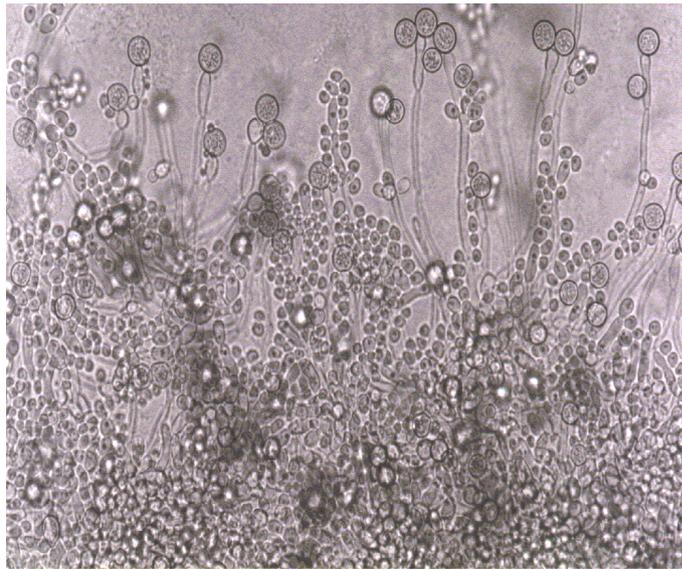


Figura 5. Condição característica de *Candida albicans*. Formação de clamidósporos globosos. Microcultivo em meio de Ágar Fubá a 35°C por 7 dias (400x).

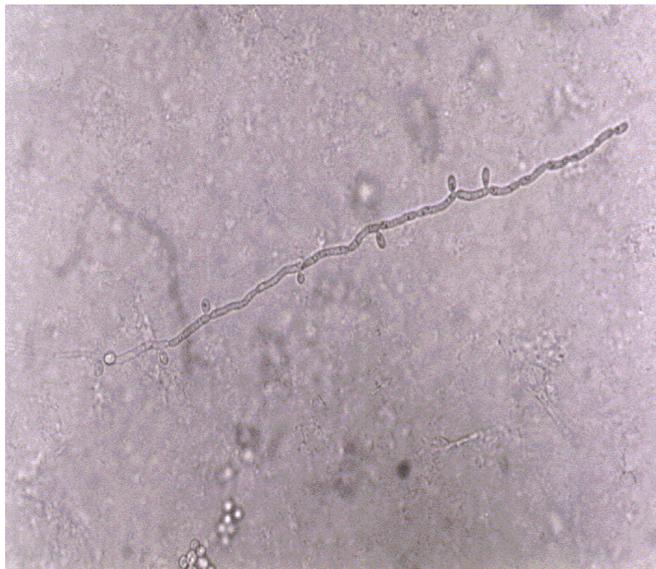


Figura 6. Condição característica de *Candida tropicalis*. Clamidósporo em forma de lágrima. Microcultivo em meio de Ágar Fubá a 35°C por 7 dias (400x).

#### 5.4 Fatores de virulência

As amostras de *Candida* recuperados da cavidade oral dos indivíduos com câncer foram mais aderentes às CEBs do que aquelas da cavidade oral de pessoas sem alteração da mucosa oral ( $p=0,05$ ). A mediana do número de leveduras aderidas a células epiteliais bucais foi igual a 2 nas amostras oriundas dos pacientes com câncer. Nas amostras *Candida* obtidas de indivíduos

que apresentavam mucosa oral normal (grupo controle) este valor foi de 1. Os valores mínimos foram zero para os dois grupos e os valores máximos foram 21 e 18 para grupo com câncer e controle, respectivamente. O teste estatístico para amostras não paramétricas (Wilcoxon Signed Ranks Test) mostrou diferenças entre os dois grupos ( $p=0,05$ ).

Ao realizar o teste de aderência com apenas um isolado, que apresentava os demais fatores de virulência, proteinase e fosfolipase, diante de quatro tipos de células, esta se apresentou com o mesmo perfil de aderência para os quatro tipos de células, sem apresentar diferença estatística.

A produção de fosfolipase foi detectada em 32 amostras de *Candida* (51,6%) recuperadas da cavidade oral dos pacientes com câncer e em treze isolados de *Candida* (61,9%) recuperadas do grupo controle. A atividade de fosfolipase (Pz) foi calculada como a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação, de acordo com Price *et al.* (1982). Quando  $Pz = 1$ , a amostra é negativa para a produção de fosfolipase. Se  $Pz \leq 1$ , a amostra é considerada positiva (P) e se  $Pz \leq 0,63$  a amostra é considerada fortemente positiva (FP). Cada isolado foi testado em duplicata. Os valores de Pz das leveduras obtidas variaram de 0,8 a 0,35. Trinta e uma (96, 87%) leveduras apresentaram um valor de  $Pz \leq 0,63$  (super positivos – SP) e uma amostra apresentou valor de  $pz \geq 0,63$  (positivos – P). Os valores de Pz das leveduras do grupo controle variaram de 0,48 a 0,38 (Tabela 4). O teste estatístico demonstrou que não houve diferença quanto a produção de fosfolipase entre as amostras do grupo controle e do grupo com câncer com valor de  $p < 0,489$ .

Entre as amostras de *Candida* obtidos da cavidade oral de pacientes com câncer orogástrico, 26 (41,9%) apresentaram produção de proteinase em meio sólido. Destas amostras, 21 (33,8%) foram considerados 2+, super positivo (SP) e cinco (8,1%) foram considerados 1+, positivo (P) para a produção de proteinase em meio sólido. Entre as amostras de *Candida* obtidos de indivíduos do grupo controle com a mucosa oral normal, apenas um (4,8%) dos isolados foi considerado 2+, (Tabela 4). Apenas 11 (17,7%) das leveduras recuperadas do grupo de pacientes com câncer orogástrico e uma amostra do grupo controle produziram tanto a fosfolipase como a proteinase. As demais amostras de leveduras, para os dois grupos, produziram uma ou outra, ou não produziram nenhuma destas enzimas (Tabela 4 e Figura 9). Para a proteinase, o teste estatístico mostrou que houve diferença entre as amostras isoladas do grupo controle e do grupo com câncer com valor de  $p < 0,007$ .

Tabela 4: Características fisiológicas das amostras de *Candida* spp. provenientes de pacientes com câncer orogástrico e grupo controle

Código	Microcultivo	42° C	45° C	Hipertônico	Fosfolipase	Proteinase
YCa1	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa2	<i>C. parapsilosis</i>	+	-	N	N	N
YCa3	<i>C. parapsilosis</i>	+	-	P	SP	N
YCa4	<i>C. glabrata</i>	+	+	N	SP	SP
YCa5	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa6	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa7	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa8	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa9	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	SP
YCa10	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa11	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa12	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa13	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa14	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	PO
YCa15	<i>C. tropicalis</i>	+	-	P	SP	SP
YCa16	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	SP
YCa17	<i>C. glabrata</i>	-	-	N	SP	SP
YCa18	<i>C. albicans</i>	+	+	P	P	N
YCa19	<i>C. glabrata</i>	-	-	N	N	P
YCa20	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa21	<i>C. glabrata</i>	-	-	N	N	P
YCa22	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa23	<i>C. krusei</i>	+	-	N	SP	SP
YCa24	<i>C. albicans</i>	+	+	P	N	N
YCa25	<i>C. tropicalis</i>	+	+	P	SP	P
YCa26	<i>C. krusei</i>	+	-	N	N	N
YCa27	<i>C. glabrata</i>	-	-	P	N	SP
YCa28	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	P	SP	SP
YCa29	<i>C. tropicalis</i>	-	-	P	N	N
YCa30	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa31	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	SP

---

YCa32	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	P	SP	SP
YCa33	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa34	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa35	<i>C. tropicalis</i>	-	-	P	N	N
YCa36	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa37	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	P	N	N
YCa38	<i>C. glabrata</i>	-	-	P	N	SP
YCa39	<i>C. krusei</i>	-	-	N	N	SP
YCa40	<i>C. glabrata</i>	-	-	P	N	SP
YCa41	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	P	N	SP
YCa42	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa43	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	P	N	P
YCa44	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa45	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	N	N	SP
YCa46	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa47	<i>C. glabrata</i>	-	-	P	N	SP
YCa48	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa49	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	P	N	SP
YCa50	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	P	N	N
YCa51	<i>C. krusei</i>	-	-	N	N	SP
YCa52	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa53	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa54	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCa55	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	N	SP	SP
YCa56	<i>C. lusitaneae</i>	-	-	N	N	SP
YCa57	<i>C. glabrata</i>	-	-	P	N	SP
YCa58	<i>C. albicans</i>	-	-	N	N	N
YCa59	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	P	N	N
YCa60	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCa61	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCa62	<i>C. albicans</i>	+	-	N	SP	N
YCo2	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo3	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	P	N	N
YCo4	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	N	N	N
YCo5	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo7	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N

---

YCo11	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCo13	<i>C. albicans</i>	+	-	N	N	N
YCo16	<i>C. glabrata</i>	-	-	P	N	N
YCo17	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	P	N	N
YCo9	<i>C. albicans</i>	+	+	P	SP	N
YCo23	<i>C. para</i>	-	-	N	N	N
YCo26	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo28	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo33	<i>C. para</i>	-	-	N	N	N
YCo35	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo36	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo37	<i>C. albicans</i>	-	-	N	SP	N
YCo39	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	SP
YCo42a	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N
YCo42b	<i>C. krusei</i>	-	-	N	N	N
YCo43	<i>C. albicans</i>	+	+	N	SP	N

YCa= Levedura dos pacientes com câncer; YCo= Leveduras do grupo controle; SP= Super positivo; P= Positivo; N= Negativo. Para “+” crescimento positivo; para “-“ crescimento negativo.

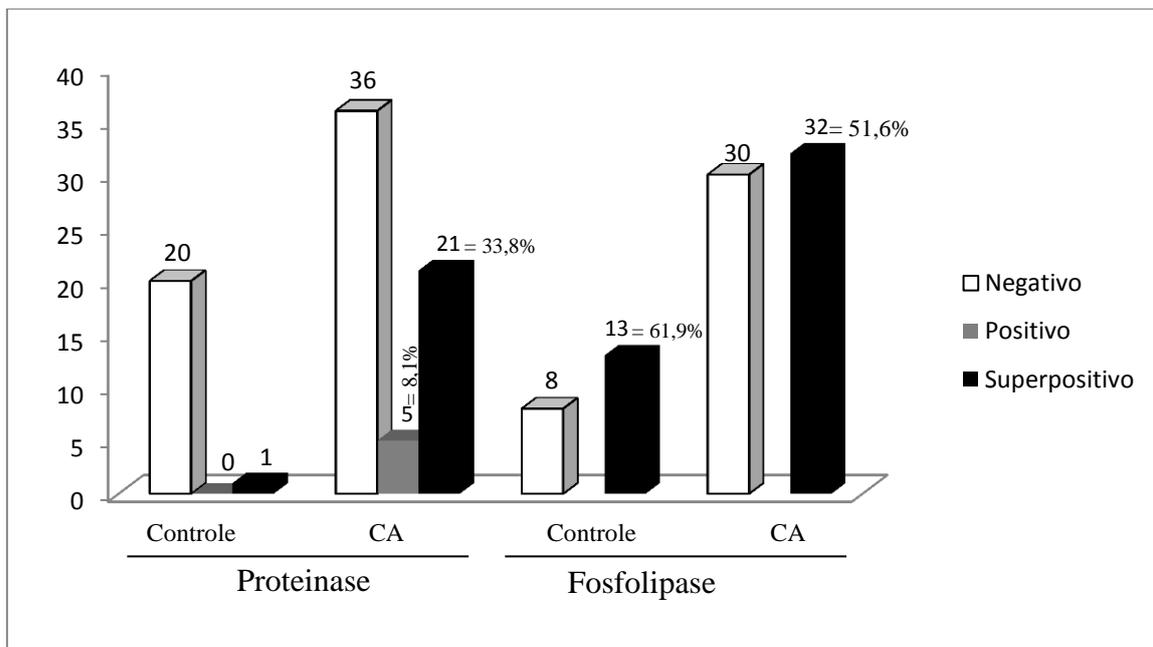


Figura 9. Produção de proteinase e fosfolipase por leveduras do gênero *Candida* spp. isoladas da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) e grupo controle.

## 5.5 Caracterização dos indivíduos

### 5.5.1 Faixa etária

Com relação a faixa etária dos pacientes que apresentaram câncer orogástrico a idade média observada foi de 61,7 anos com desvio padrão de  $\pm 12,8$ , variando de 21 a 88 anos. Já para os indivíduos controle foi observada a seguinte distribuição: a idade média foi de 49,1 anos com desvio padrão de  $\pm 8,9$  e variou entre 30 e 61 anos (Tabela 5).

Tabela 5: Caracterização dos pacientes com câncer orogástrico e indivíduos controle

<b>Código</b>	<b>Tipo de Câncer</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Etilismo</b>	<b>Tabagismo</b>
YCa1	CA de Língua	64	M	SIM	SIM
YCa2	Assoalho de Boca	53	M	SIM	SIM
YCa3	CA base da Língua	70	M	SIM	SIM
YCa4	CA base da Língua	67	M	SIM	SIM
YCa5	CA base da Língua	49	M	SIM	SIM
YCa6	CA base da língua	77	F	NÃO	NÃO
YCa7	CA lateral de língua	59	M	SIM	SIM
YCa8	CA da língua	73	M	NÃO	NÃO
YCa9	CA de língua	61	M	SIM	SIM
YCa10	CA de Esôfago	47	M	SIM	SIM
YCa11	CA de Esôfago	40	M	SIM	SIM
YCa12	CA de Esôfago	72	M	NÃO	SIM
YCa13	CA de Esôfago	59	M	SIM	SIM
YCa14	CA de estômago	50	M	SIM	SIM
YCa15	CA de Esôfago	48	M	SIM	SIM
YCa16	CA de Esôfago	56	M	SIM	SIM
YCa17	CA de Esôfago	58	M	NÃO	SIM
YCa18	CA de Esôfago	62	M	SIM	SIM
YCa19	CA de Esôfago	72	F	NÃO	NÃO
YCa20	CA de Esôfago	83	F	NÃO	NÃO
YCa21	CA de estômago	80	M	NÃO	NÃO
YCa22	CA de estômago	59	M	SIM	SIM
YCa23	CA de estômago	59	M	SIM	SIM
YCa24	CA de Estômago	53	M	SIM	SIM

---

YCa25	CA de estômago	51	M	SIM	SIM
YCa26	CA de estômago	48	M	SIM	SIM
YCa27	CA de Laringe	64	M	SIM	SIM
YCa28	CA de Esôfago	64	F	NÃO	NÃO
YCa29	CA de Esôfago	55	M	SIM	SIM
YCa30	CA de Laringe	69	M	SIM	SIM
YCa31	CA de Língua	88	M	SIM	SIM
YCa32	CA de Orofaringe	79	F	SIM	SIM
YCa33	CA de Língua	54	M	SIM	SIM
YCa34	CA de Laringe	87	F	NÃO	NÃO
YCa35	CA de Laringe	74	M	SIM	SIM
YCa36	CA de Palato	72	M	NÃO	NÃO
YCa37	CA de Palato	72	M	NÃO	NÃO
YCa38	CA de Palato	72	M	NÃO	NÃO
YCa39	CA de Palato	54	M	SIM	NÃO
YCa40	CA de Orofaringe	67	M	SIM	NÃO
YCa41	CA de Orofaringe	67	M	SIM	NÃO
YCa42	CA de Nasofaringe	46	M	SIM	NÃO
YCa43	CA de Nasofaringe	46	M	SIM	NÃO
YCa44	CA de Laringe	65	M	SIM	SIM
YCa45	CA de Laringe	65	M	SIM	SIM
YCa46	CA de Hipofaringe	68	M	NÃO	NÃO
YCa47	CA de Hipofaringe	68	M	NÃO	NÃO
YCa48	Ca de Língua	60	M	SIM	NÃO
YCa49	CA de Língua	60	M	SIM	NÃO
YCa50	CA de Língua	60	M	SIM	NÃO
YCa51	CA de Esôfago	60	M	SIM	NÃO
YCa52	CA de Hipofaringe	72	M	SIM	SIM
YCa53	CA de Língua	61	M	SIM	SIM
YCa54	CA de Esôfago	73	M	SIM	NÃO
YCa55	CA de Esôfago	73	M	SIM	NÃO
YCa56	CA de Laringe	51	M	SIM	NÃO
YCa57	CA de Laringe	51	M	SIM	NÃO
YCa58	CA de pescoço	55	M	SIM	SIM
YCa59	CA de pescoço	55	M	SIM	SIM
YCa60	CA de Orofaringe	45	M	SIM	SIM

---

YCa61	CA de Lábio inferior	70	M	SIM	SIM
YCa62	CA de Orofaringe	21	M	NÃO	NÃO
YCo2	Controle	42	F	-	-
YCo3	Controle	48	F	-	-
YCo4	Controle	52	F	-	-
YCo5	Controle	47	M	-	-
YCo7	Controle	51	F	-	-
YCo9	Controle	40	M	-	-
YCo11	Controle	60	M	-	-
YCo13	Controle	54	M	-	-
YCo16	Controle	61	M	-	-
YCo17	Controle	70	M	-	-
YCo23	Controle	30	F	-	-
YCo26	Controle	50	F	-	-
YCo28	Controle	35	F	-	-
YCo33	Controle	51	F	-	-
YCo35	Controle	52	F	-	-
YCo36	Controle	48	F	-	-
YCo37	Controle	41	F	-	-
YCo39	Controle	48	F	-	-
YCo42a	Controle	50	F	-	-
YCo42b	Controle	50	F	-	-
YCo43	Controle	52	F	-	-

### 5.5.2 Sexo, etilismo e tabagismo

Do total dos indivíduos com câncer orogástrico positivos para *Candida* spp. 44 eram do sexo masculino (88%) e apenas seis eram do sexo feminino (12%). Este grupo de indivíduos também apresentou um número elevado de etilistas (76%). Neste mesmo grupo de indivíduos, 12 (24%) não apresentavam este costume. Dos que apresentavam o hábito do etilismo apenas 2,6% (N=1) era do sexo feminino e os demais pertencentes ao sexo masculino. A média de idade entre os que não bebiam era de 68,9 (N=12) anos  $\pm$ 17. Para os que utilizavam o álcool constantemente a média de idade era de 59,4 (N=38) anos  $\pm$ 10,3.

Dos 59 indivíduos que estavam acometidos com câncer orogástrico, 33 (66%) apresentavam o hábito de fumar. Dezesete (34%) deles não possuíam este costume, sendo que dentre estes dezessete, cinco (29,4%) eram mulheres e 12 (70,6%) eram do sexo masculino. A média de idade entre os homens que não fumavam era de 60,3 anos (N=12)  $\pm$ 16. Já em relação a este mesmo grupo de indivíduos, mas que possuíam o hábito de fumar, a média de idade foi de 59,3.

Foi verificado que a média de idade entre os indivíduos que bebiam e fumavam era de 59,6  $\pm$ 10,7 e entre os que não bebiam e nem fumavam era de 69,7  $\pm$ 18,4. Após a realização do teste estatístico t de Student foi verificado que o valor de  $p=0,0113$ . Este valor demonstra que para as pessoas que possuíam o hábito do etilismo e tabagismo a idade média para o surgimento do câncer era menor, ou seja, o aparecimento do tumor ocorria mais cedo nestes pacientes com estes costumes (Tabela 10).

Tabela 10: Média de idade dos pacientes com câncer orogástrico, etilistas e tabagistas

Etilista	Tabagista	Média Idade/ Desvio Padrão
+	+	59,6 $\pm$ 10,7
-	-	69,7 $\pm$ 18,4

+ Pessoas que apresentavam o hábito de fumar e de beber; - pessoas que não possuíam o hábito de fumar e beber.

### 5.6 Avaliação do perfil de suscetibilidade a agentes antifúngicos das amostras de *Candida spp.*

Os resultados dos testes de suscetibilidade estão apresentados na tabela 11. Os valores de CIM foram determinados após 24h de incubação, pois a maioria das amostras apresentarem um aumento dramático de CIM, das 24 para as 48 horas, apresentando um crescimento elevado, denominado efeito *trailing*.

Os critérios de interpretação para a suscetibilidade ao fluconazol e isoconazol foram aqueles publicados por Espinel-Ingroff et al. (1998), Rex et al. (2001) e Fothergill (2012). Um isolado foi considerado suscetível quando a concentração inibitória mínima encontrada foi de  $\leq$  8,0 $\mu$ g/mL para estes agentes. Para o novo triazólico, voriconazol, os critérios de interpretação

da suscetibilidade foram aqueles publicados pelo CLSI (2008). Considerou-se um isolado suscetível quando este obteve uma concentração inibitória mínima  $\leq 1,0\mu\text{g/ml}$  para esse agente. Critérios de interpretação para anfotericina B e cetoconazol foram determinados seguindo os padrões adotados pelo CLSI (2008) em que os isolados inibidos pela concentração  $\leq 1,0 \mu\text{g/mL}$  foram considerados suscetíveis.

Os valores de intervalos adotados para a realização dos testes foram para anfotericina B foram de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$ ; para o cetoconazol de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$ ; para o fluconazol de 0,125 a 64  $\mu\text{g/mL}$  e para os novos triazólicos de 0.0313 a 16  $\mu\text{g/mL}$ . Para as amostras de *C. albicans*, os resultados de CIM para as drogas antifúngicas variaram de 0,125 a 32  $\mu\text{g/ml}$  para anfotericina B, fluconazol, isoconazol e voriconazol. Para o cetoconazol as CIMs oscilaram de 0,06255 a 32 $\mu\text{g/mL}$ . As leituras foram realizadas com 24 horas de incubação para as leveduras dos pacientes com câncer orogástrico e para os indivíduos do grupo controle. Para as amostras obtidas dos indivíduos do grupo controle o maior valor de CIM para a anfotericina B e fluconazol foram de 0,5 $\mu\text{g/mL}$  e 32 $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Já para o voriconazol os valores variaram de 0,125 a 2 $\mu\text{g/mL}$ . Os valores obtidos para o isoconazol foram de 0,125 a 32 $\mu\text{g/mL}$  e para o cetoconazol o valor encontrado foi de 0,125 $\mu\text{g/mL}$ . Para as amostras de *C. albicans*, após a realização dos testes, 96,7% das leveduras isoladas dos pacientes com câncer orogástrico e 100% daquelas isoladas do grupo controle apresentaram sensibilidade a anfotericina B. Para o fluconazol 73,7% das amostras provenientes dos indivíduos com câncer orogástrico apresentaram sensibilidade. Já para o grupo controle 100% das amostras de leveduras foram sensíveis a este antifúngico. Para o isoconazol, o número de amostras sensíveis foi de 60% e para o voriconazol 63,3% para as amostras isoladas dos indivíduos com câncer. Já para o grupo controle 92,3% e 84,6% das amostras de leveduras apresentaram sensibilidade para o isoconazol e voriconazol respectivamente. Em relação ao cetoconazol, 100% das amostras de *C. albicans* isoladas de indivíduos do grupo controle e 73,3% das leveduras isoladas dos indivíduos com câncer oro-gástrico foram sensíveis a esta droga (Figura 10).

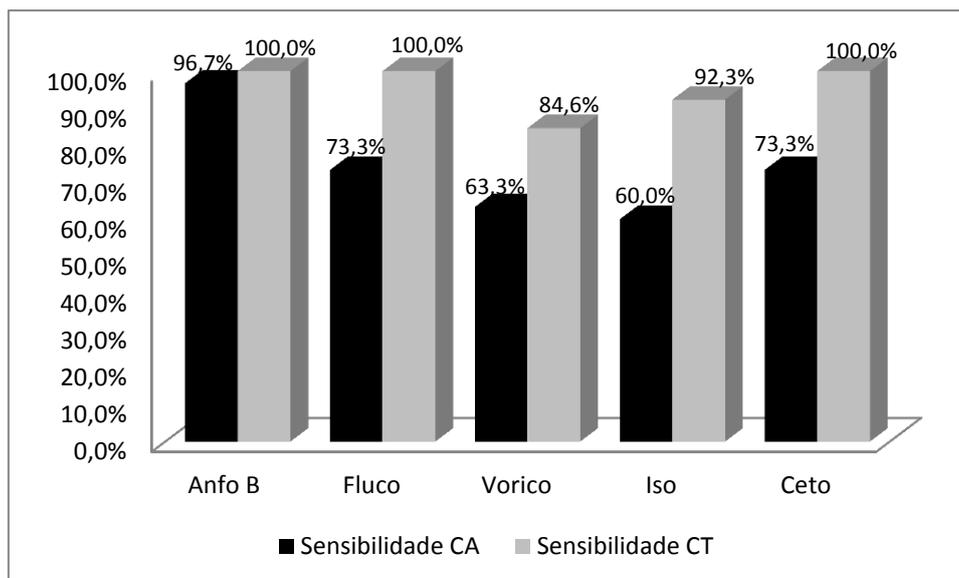


Figura 10. Perfil de sensibilidade das amostras de *Candida albicans* provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=29) e de indivíduos controle (CT) (N=13). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Para as amostras de *C. tropicalis* provenientes dos pacientes com câncer orogástrico, os valores de CIM para as drogas antifúngicas foram os seguintes: de 0,125 a 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para anfotericina B, de 1 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o fluconazol, de 0,125 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o isoconazol, de 0,25 a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o voriconazol e de 0,25 a 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o cetoconal. Nos testes de susceptibilidade, 100% das amostras de *C. tropicalis* apresentaram sensibilidade a anfotericina B. Para o fluconazol 33% das amostras foram sensíveis a esta droga. Para o voriconazol, 50% e 83% dos isolados apresentaram sensibilidade ao voriconazol e ao isoconazol respectivamente. Frente ao cetoconazol o número de amostras sensíveis foi de 67% (Figura 11). No grupo controle não houve isolamento de *C. tropicalis*.

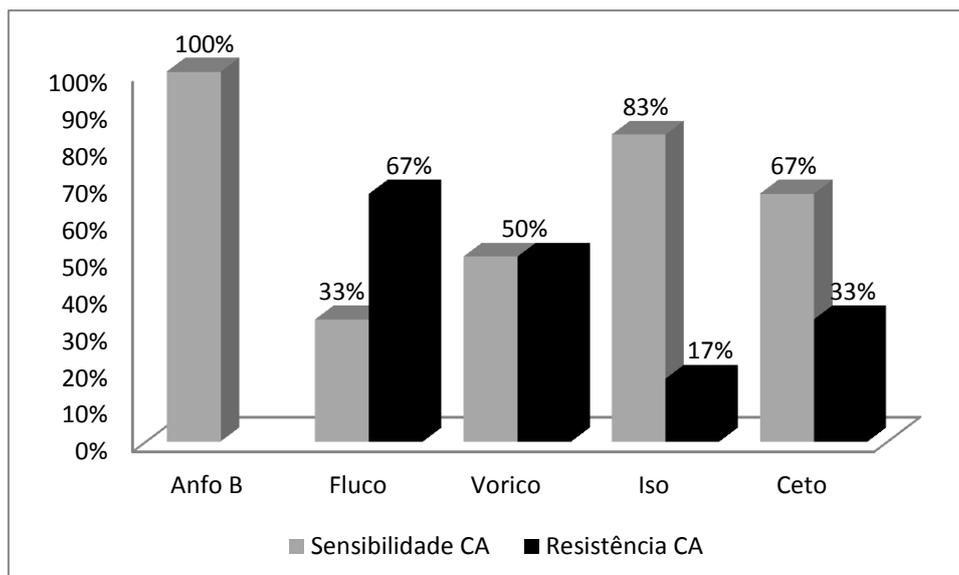


Figura 11. Perfil de sensibilidade e resistência das amostras de *Candida tropicalis* provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=6), e de indivíduos controle (CT) (N=0). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Para as nove amostras de *C. glabrata* obtidos de pacientes com câncer orogástrico e apenas uma amostra do grupo controle, os valores de CIM encontrados para anfotericina B foram de 0,25 a 0,5 $\mu$ g/mL e para o fluconazol variaram de 0,5 a 32 $\mu$ g/mL. Os valores de CIM obtidos para o isoconazol variaram de 0,25 a 4 $\mu$ g/mL, para o voriconazol de 0,25 a 2 $\mu$ g/mL, e para o cetoconazol foi de 0,125 a 1 $\mu$ g/mL. Para *C. glabrata* isolada do grupo controle, 100% apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados. Nos isolados provenientes do grupo teste, 100% apresentaram sensibilidade a anfotericina B, fluconazol, isoconazol e cetoconazol. Para o voriconazol, 80% mostraram-se sensíveis a este antifúngico como mostrado na Figura 12.

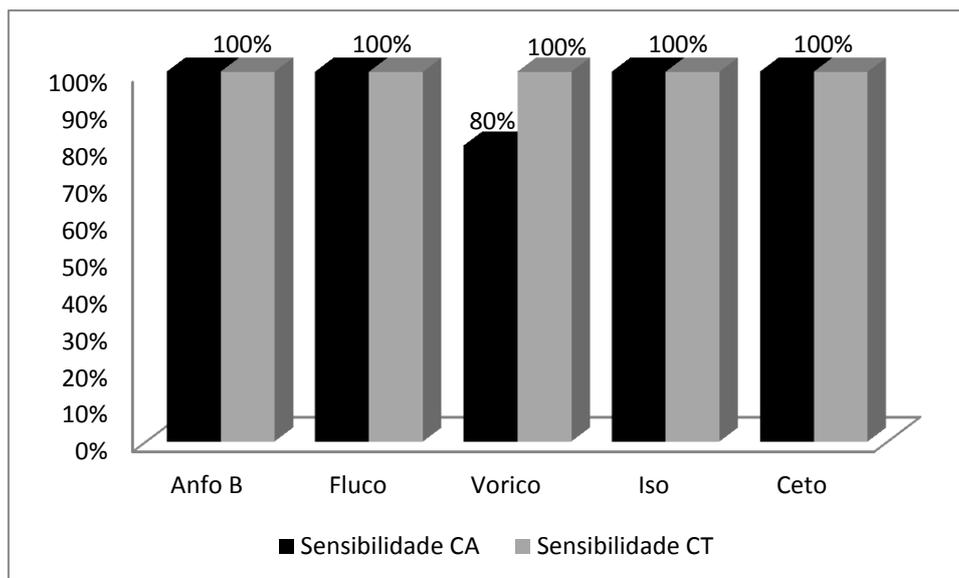


Figura 12. Perfil de sensibilidade das amostras de *Candida glabrata* provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=9) e de indivíduos controle (CT) (N=1). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Para as quatro amostras de *C. krusei* provenientes de indivíduos com câncer orogástrico, os valores de CIM para a anfotericina B foram  $\leq 32 \mu\text{g/mL}$ . Já para isoconazol, cetoconazol e fluconazol os valores de CIM variaram de 0,25 a  $32 \mu\text{g/mL}$  sendo que para o voriconazol, este valor foi de  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ . Neste grupo de isolados, 80% (4) deles foram sensíveis aos antifúngicos anfotericina B, isoconazol e cetoconazol e 60% (3) apresentaram sensibilidade ao fluconazol e voriconazol. Para a única amostra isolada do grupo controle, a mesma apresentou-se sensível também a todos os antifúngicos testados como representado na Figura 13.

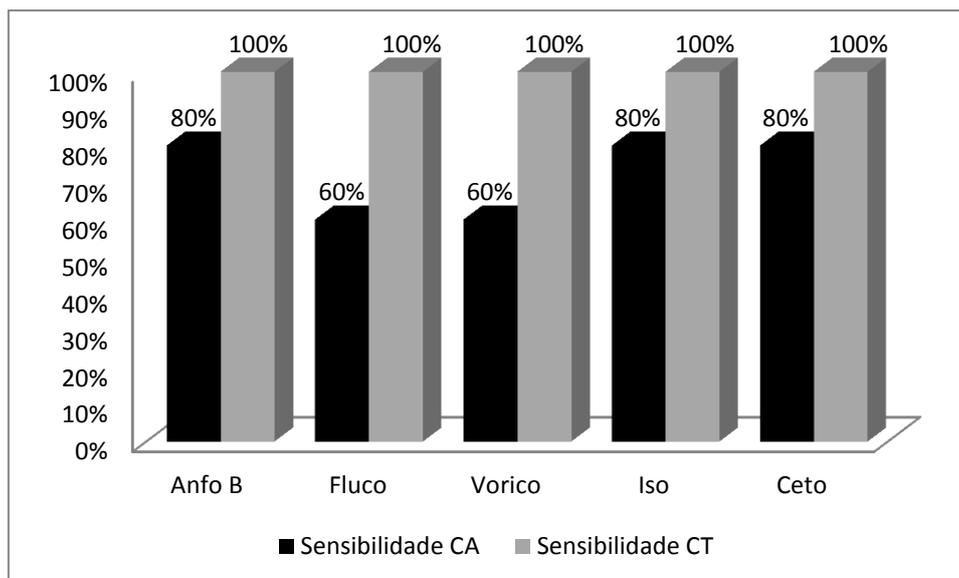


Figura 13. Perfil de sensibilidade das amostras de *Candida krusei* provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=4) e de indivíduos controle (CT) (N=1). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Para as amostras de *C. parapsilosis* provenientes dos indivíduos com câncer orogástrico os valores de CIM obtidos para anfotericina B foram  $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ , para o fluconazol de  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ , para o voriconazol de  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ , para o isoconazol de  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$  e para o cetoconazol de  $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ . Das leveduras isoladas do grupo controle, 100% apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados. Para os pacientes com câncer orogástrico 100% (6) das leveduras isoladas foram sensíveis a anfotericina B, voriconazol, isoconazol e cetoconazol. Já para o fluconazol 83,3% (5) das amostras de *Candida* apresentaram sensibilidade a esta droga (Figura 14).

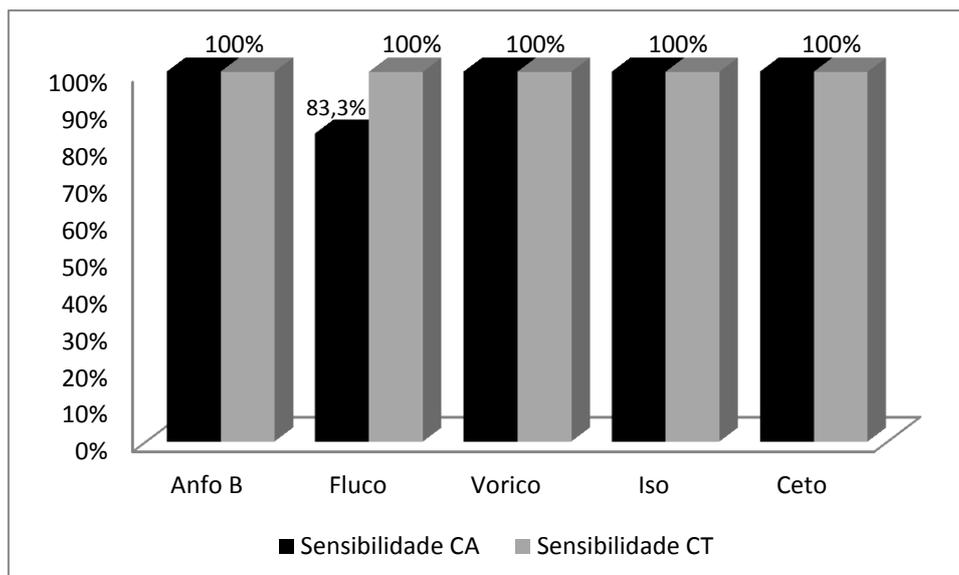


Figura 14. Perfil de sensibilidade das amostras de *Candida parapsilosis* provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=8) e de indivíduos controle (CT) (N=5). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Para as amostras de *C. lusitaniae* pertencentes aos indivíduos com câncer orogástrico o valor de CIM obtido para anfotericina B foi de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para o fluconazol  $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ , para o voriconazol  $\leq 0$  a 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para o isoconazol  $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  e para o cetoconazol  $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Para as leveduras isoladas dos pacientes com câncer orogástrico, 100% (5) dos isolados foram sensíveis a anfotericina B, fluconazol e isoconazol. Em relação ao voriconazol e cetoconazol 60% (3) e 80% (4) das amostras de *C. lusitaniae* foram sensíveis a estes antifúngicos, respectivamente (Figura 15). Neste estudo, não foi isolada nenhuma amostras de *C. lusitaniae* da cavidade oral dos indivíduos do grupo controle.

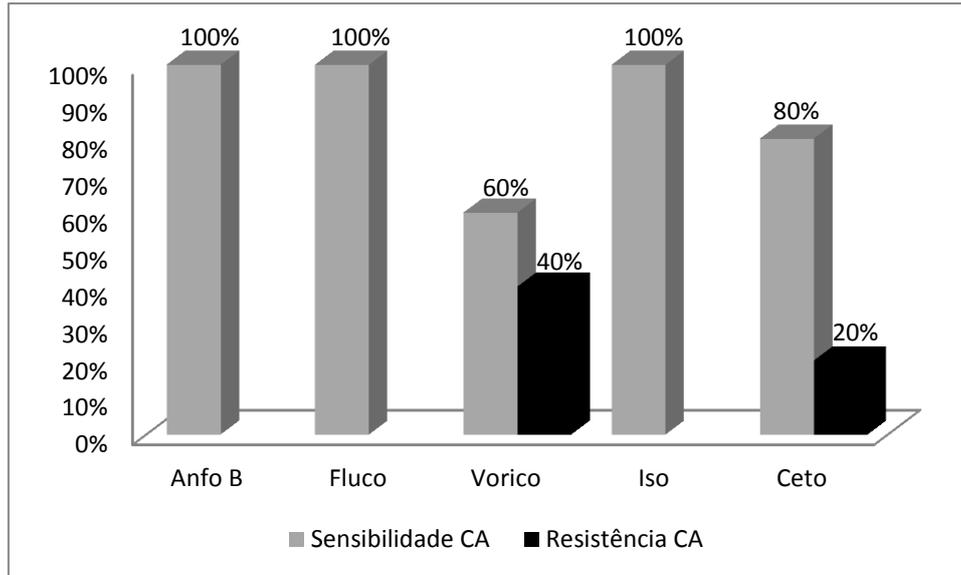


Figura 15. Perfil de sensibilidade das amostras de *Candida lusitanae* provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=5). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Para todos os antifúngicos testados, as amostras do grupo controle apresentaram maior sensibilidade dos que aqueles isolados dos pacientes com câncer (Figura 16).

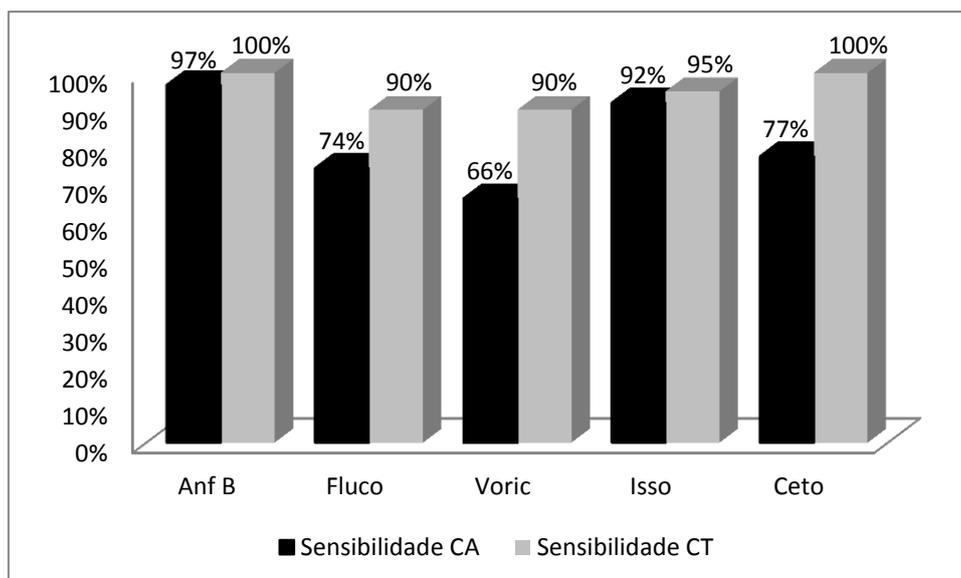


Figura 16: Perfil de sensibilidade das amostras de *Candida* spp. provenientes da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico (CA) (N=62) e de indivíduos controle (CT) (N=21). Anf B: anfotericina B, Fluco: fluconazol, Vorico: voriconazol, Iso: isoconazol, Ceto: cetoconazol.

Na tabela 11 estão representados os resultados da variação entre os valores mínimos e máximos da CIM para cada espécie, tanto para os isolados provenientes dos indivíduos do grupo teste como para dos controles. Os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> representam as concentrações dos antifúngicos que inibiram o crescimento de 50% e 90% dos isolados.

Os valores de CIM 50% e 90% obtidos, para as amostras de *C. albicans* para anfotericina B foram de 0,25 e 0,5 µg/mL respectivamente, fluconazol de 1 e 32 µg/mL, para o isoconazol de 0,125 e 8 µg/mL, voriconazol de 0,25 e 64 µg/mL e cetoconazol de 0,0625 e 32 µg/mL. Já para as amostras de *C. albicans* provenientes do grupo controle os valores de CIM que inibiram 50% e 90% das amostras para anfotericina B foram de 0,5 µg/mL para ambos os valores, para o fluconazol de 0,5 e 32 µg/mL respectivamente, para o voriconazol de 0,125 e 2 µg/mL, para o isoconazol 0,125 e 4 µg/mL e para o cetoconazol de 0 e 0,125 µg/mL.

Para as amostras de *C. tropicalis* provenientes dos pacientes com câncer orogástrico os valores de CIM 50% e 90% foram de 0,25 e 0,5 µg/mL para anfotericina B, para o fluconazol de 32 e 64 µg/mL, para o isoconazol de 2 e 4 µg/mL e para o voriconazol de 0,5 e 32 µg/mL e para o cetoconazol de 0 e 4 µg/mL. Não foram isoladas leveduras de *C. tropicalis* dos indivíduos controle.

Com relação às amostras de *C. krusei* provenientes dos indivíduos com câncer orogástrico o valor de CIM 50% e 90% para anfotericina B foram de 0 e 0,5 µg/mL, para o fluconazol de 0,5 e 4 µg/mL e para o isoconazol, voriconazol e cetoconazol de 0µg/mL, não havendo crescimento em nenhuma diluição. Para as amostras de *C. krusei* isoladas do grupo controle o valor de CIM 50% e 90% para anfotericina B foi de 0,5 µg/mL tanto para o CIM<sub>50</sub> quanto para o CIM<sub>90</sub>, fluconazol 0,25 µg/mL também para ambas as concentrações e para o isoconazol, voriconazol e cetoconazol foi de 0µg/mL, não havendo crescimento em nenhuma diluição, como também foi observado para as leveduras isoladas dos indivíduos com câncer orogástrico.

Para *C. parapsilosis* isoladas do grupo teste observou-se os seguintes resultados de CIM 50 e 90: para anfotericina B 0,25 e 0,5 µg/mL, fluconazol 4 e 8µg/mL, para o voriconazol o valor foi de 0,5 e 2 µg/mL, para isoconazol 0,0625 e 1 µg/mL e para o cetoconazol de 0,125 e 0,5 µg/mL. Para as amostras de *C. parapsilosis* provenientes dos indivíduos saudáveis foram

encontrados os valores para a anfotericina B de 0,25 µg/mL tanto para CIM<sub>50</sub> como para o CIM<sub>90</sub>, para o fluconazol 0,5 e 1 µg/mL, para o voriconazol e cetoconazol 0 e 0,125 µg/mL, e para o isoconazol 1 e 2 µg/mL.

Para as amostras de *C. glabrata* do grupo de pacientes com câncer orogástrico, os valores para a anfotericina B foram de 0,5 µg/mL para CIM<sub>50</sub> como para o CIM<sub>90</sub>, para fluconazol os valores foram de 4 a 8 µg/mL, para o isoconazol foram de 0,25 a 0,5 µg/mL, para o voriconazol 0,5 e 2 µg/mL e para o cetoconazol de 0,125 e 0,5 µg/ml respectivamente. Para as amostras de *C. glabrata* provenientes dos indivíduos saudáveis os valores de CIM 50% e 90% para a anfotericina B, isoconazol, voriconazol e cetoconazol foram de 0µg/mL para ambas as concentrações, não havendo crescimento em nenhuma das diluições. Para o fluconazol foi de 0,25 µg/mL para as duas concentrações.

As amostras de *C. lusitaniae* os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para anfotericina B foi de 0,5 µg/ml, para o fluconazol foi 4 e 8 µg/ml. Já para o voriconazol os valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foi de 1 µg/ml e para o cetoconazol foi de 0,5 µg/ml. Em relação ao isoconazol não houve crescimento das amostras em nenhuma diluição.

Tabela 11. Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml do Fluconazol, Isoconazol, Voriconazol, Anfotericina B e Cetoconazol para as espécies de *Candida* isoladas da mucosa oral de pacientes com câncer orogástrico.

Agente antifúngico	Espécies CA orogástrico	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação de	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação de
		24h	24h	CIM 24h	48h	48h	CIM 48h
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	1,0 µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	0,125-32	64µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	1 - 64
	<i>C. glabrata</i>	4,0µg/ml <sup>d</sup>	8µg/ml <sup>d</sup>	0,5- 32	32µg/ml <sup>d</sup>	64 µg/ml <sup>d</sup>	8 - 64
	<i>C. parapsilosis</i>	4µg/ml <sup>a</sup>	8µg/ml <sup>a</sup>	0,5-16	16µg/ml <sup>d</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	8-64
	<i>C. krusei</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	4 µg/ml <sup>a</sup>	0,5-32	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>a</sup>	0,25-64
	<i>C. tropicalis</i>	32 µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	1-64	64µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	32-64
	<i>C. lusitaniae</i>	4 µg/ml <sup>a</sup>	8 µg/ml <sup>a</sup>	4-8	64 µg/ml <sup>d</sup>	64 µg/ml <sup>d</sup>	64
Isoconazol	<i>C. albicans</i>	0,125µg/ml <sup>a</sup>	8µg/ml <sup>a</sup>	0,0625-32	16µg/ml <sup>d</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	0,25-64
	<i>C. glabrata</i>	0,25µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,25-4	4µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	1- 32
	<i>C. parapsilosis</i>	0,0625µg/ml <sup>a</sup>	1µg/ml <sup>a</sup>	0,0625-1	2µg/ml <sup>a</sup>	4µg/ml <sup>a</sup>	0,5-8
	<i>C. krusei</i>	0	0	0-32	4 µg/ml <sup>a</sup>	8 µg/ml <sup>a</sup>	0-32
	<i>C. tropicalis</i>	2 µg/ml <sup>a</sup>	4 µg/ml <sup>a</sup>	0,125-16	8 µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	2-32
	<i>C. lusitaniae</i>	0	0	0-2	8 µg/ml <sup>a</sup>	8 µg/ml <sup>a</sup>	1-16
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	0,25µg/ml <sup>a</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	0,0625-64	64µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	0,0625-64
	<i>C. glabrata</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	2,0µg/ml <sup>d</sup>	0,25-2,0	4µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	4 - 64
	<i>C. parapsilosis</i>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	2µg/ml <sup>d</sup>	0,25-2	4µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	1-64
	<i>C. krusei</i>	0	0	0-8	2 µg/ml <sup>d</sup>	4 µg/ml <sup>d</sup>	0-16
	<i>C. tropicalis</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	0,5-64	64µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	32-64
	<i>C. lusitaniae</i>	1 µg/ml <sup>a</sup>	1 µg/ml <sup>a</sup>	0-16	16 µg/ml <sup>d</sup>	64 µg/ml <sup>d</sup>	1-64
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	0,25µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,125-32,0	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,125-32
	<i>C. glabrata</i>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,25- 0,5	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,25-1
	<i>C. parapsilosis</i>	0,25µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,0625-0,5	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,0625-0,5
	<i>C. krusei</i>	0	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0-32	0,25µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,25-32
	<i>C. tropicalis</i>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,25-0,5	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	1 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-1
	<i>C. lusitaniae</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5
Cetoconazol	<i>C. albicans</i>	0,0625µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	0,0625-32	32µg/ml <sup>d</sup>	64µg/ml <sup>d</sup>	0,125-64
	<i>C. glabrata</i>	0,125µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,125-1,0	2µg/ml <sup>a</sup>	8,0µg/ml <sup>a</sup>	0,25-64
	<i>C. parapsilosis</i>	0,125µg/ml <sup>a</sup>	0,5µg/ml <sup>a</sup>	0,125-0,5	1µg/ml <sup>a</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	0,5-32
	<i>C. krusei</i>	0	0	0-32	0	2 µg/ml <sup>d</sup>	0-32
	<i>C. tropicalis</i>	0	4 µg/ml <sup>d</sup>	0-16	2 µg/ml <sup>d</sup>	32µg/ml <sup>d</sup>	2-64
	<i>C. lusitaniae</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0-1	4 µg/ml <sup>d</sup>	16 µg/ml <sup>d</sup>	0-32

<sup>a</sup> Suscetível, <sup>b</sup> Suscetível dose-dependente, <sup>c</sup> Intermediário, <sup>d</sup> resistente (Espinel-Ingroff *et al.*, 1998 e CLSI, 2008); CIM<sub>50</sub> = Inibição de 50% dos isolados; CIM<sub>90</sub> = Inibição de 90% dos isolados; 0=amostras que não apresentaram crescimento em nenhuma diluição.

Tabela 11. Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml do Fluconazol, Isoconazol, Voriconazol, Anfotericina B e Cetoconazol para as espécies de *Candida* isoladas da mucosa oral de indivíduos controle (Continuação).

Agente antifúngico	Espécies	Grupo Controle					
		CIM <sub>50</sub> 24h	CIM <sub>90</sub> 24h	Varição de CIM 24h	CIM <sub>50</sub> 48h	CIM <sub>90</sub> 48h	Varição de CIM 48h
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	32 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-32	32 µg/ml <sup>d</sup>	64 µg/ml <sup>d</sup>	0,5-64
	<i>C. glabrata</i>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25	2 µg/ml <sup>a</sup>	2 µg/ml <sup>a</sup>	2
	<i>C. parapsilosis</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	1 µg/ml <sup>a</sup>	0,5-4	4 µg/ml <sup>a</sup>	8 µg/ml <sup>a</sup>	0,5-32
	<i>C. krusei</i>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	-
Isoconazol	<i>C. albicans</i>	0,125 µg/ml <sup>a</sup>	4 µg/ml <sup>a</sup>	0,125 -32	16 µg/ml <sup>d</sup>	32 µg/ml <sup>d</sup>	0,25-64
	<i>C. glabrata</i>	0	0	0	2 µg/ml <sup>a</sup>	2 µg/ml <sup>a</sup>	2
	<i>C. parapsilosis</i>	1 µg/ml <sup>a</sup>	2 µg/ml <sup>a</sup>	0,5-2	8 µg/ml <sup>a</sup>	8 µg/ml <sup>a</sup>	1-32
	<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	-
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	0,125 µg/ml <sup>a</sup>	2 µg/ml <sup>d</sup>	0,125-2	64 µg/ml <sup>d</sup>	64 µg/ml <sup>d</sup>	0,25-64
	<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25
	<i>C. parapsilosis</i>	0	0,125 µg/ml <sup>a</sup>	0-0,5	1 µg/ml <sup>a</sup>	2 µg/ml <sup>d</sup>	0,25-64
	<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	-
Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-0,5	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-0,5
	<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25
	<i>C. parapsilosis</i>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-0,5	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-0,5
	<i>C. krusei</i>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	0,5
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	-
Cetoconazol	<i>C. albicans</i>	0	0,125 µg/ml <sup>a</sup>	0-0,125	32 µg/ml <sup>d</sup>	64 µg/ml <sup>d</sup>	0,25-64
	<i>C. glabrata</i>	0	0	0	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25 µg/ml <sup>a</sup>	0,25
	<i>C. parapsilosis</i>	0	0,125 µg/ml <sup>a</sup>	0-0,5	0,5 µg/ml <sup>a</sup>	1 µg/ml <sup>a</sup>	0,25-4
	<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0
	<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Suscetível, <sup>b</sup> Suscetível dose-dependente, <sup>c</sup> Intermediário, <sup>d</sup> resistente (Espinel-Ingroff *et al.*, 1998 e CLSI, 2008); CIM<sub>50</sub> = Inibição de 50% dos isolados; CIM<sub>90</sub> = Inibição de 90% dos isolados; 0=amostras que não apresentaram crescimento em nenhuma diluição.

### 5.7 Caracterização das citocinas no soro dos pacientes

Foi observado o aumento estatisticamente significativo de IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 nos pacientes com câncer em relação aos indivíduos do grupo controle (saudáveis). Por outro lado, não foi observado diferenças significativas em relação às citocinas, IL-4 e IL-6, entre os grupos, quando analisadas a média do valor da produção dessas citocinas. Entretanto, para o grupo controle observou-se um leve aumento das citocinas IL-4, IL-6 e IL-10 e praticamente nenhuma expressão para TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 (Figura 17).

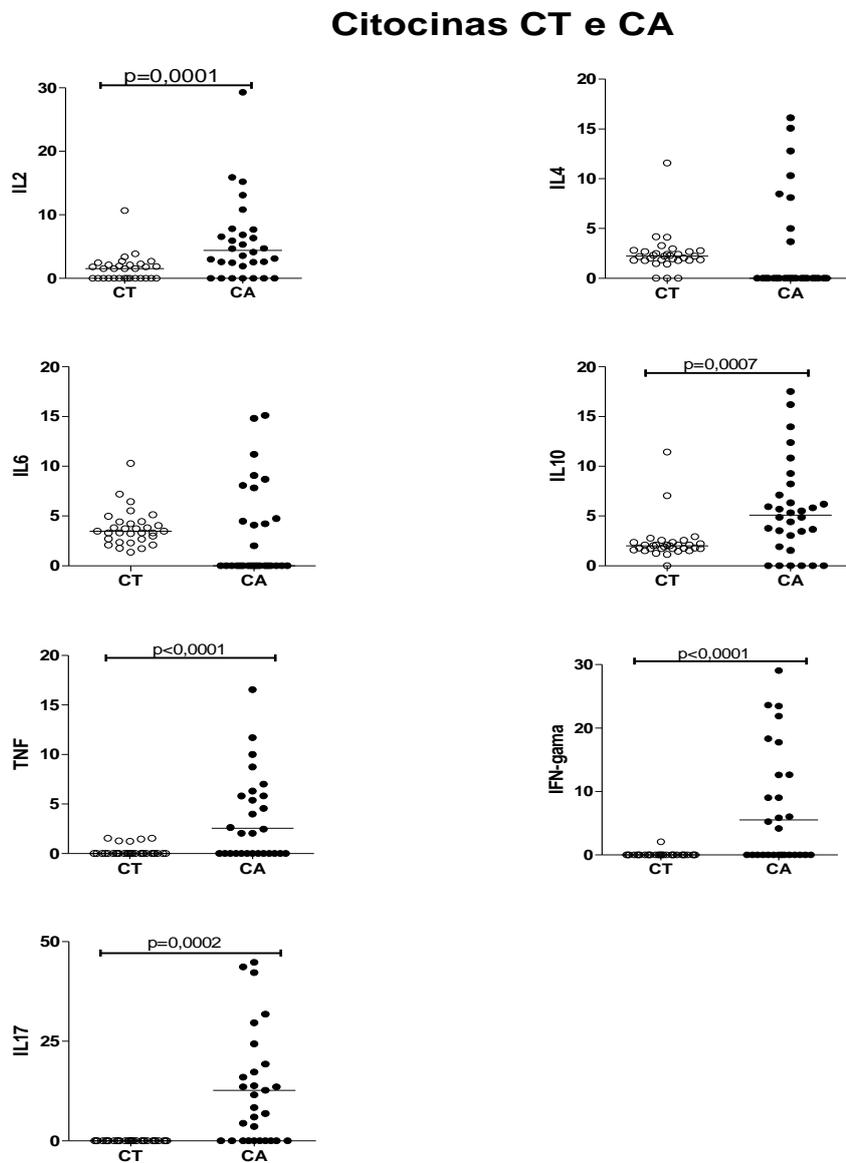


Figura 17. Painel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos controle (CT=31) e pacientes com câncer (CA=33). Média entre os valores existentes. IL-2 p=0,0001, IL-10 p=0,0007, TNF p=0,0001, IFN- $\gamma$  p=0,0001 e IL-17 p=0,0002

A figura 18 mostra o perfil de produção de citocinas de indivíduos com câncer com relação à localização do tumor. Em relação às citocinas avaliadas não foi visualizado diferença estatística entre os grupos com câncer de boca, estômago e pescoço. Embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, pode ser observado um leve aumento para a IL2, IL10, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL17 nos pacientes com câncer de pescoço em relação aos pacientes com câncer de boca e estômago.

### Citocinas e Tipo de Câncer

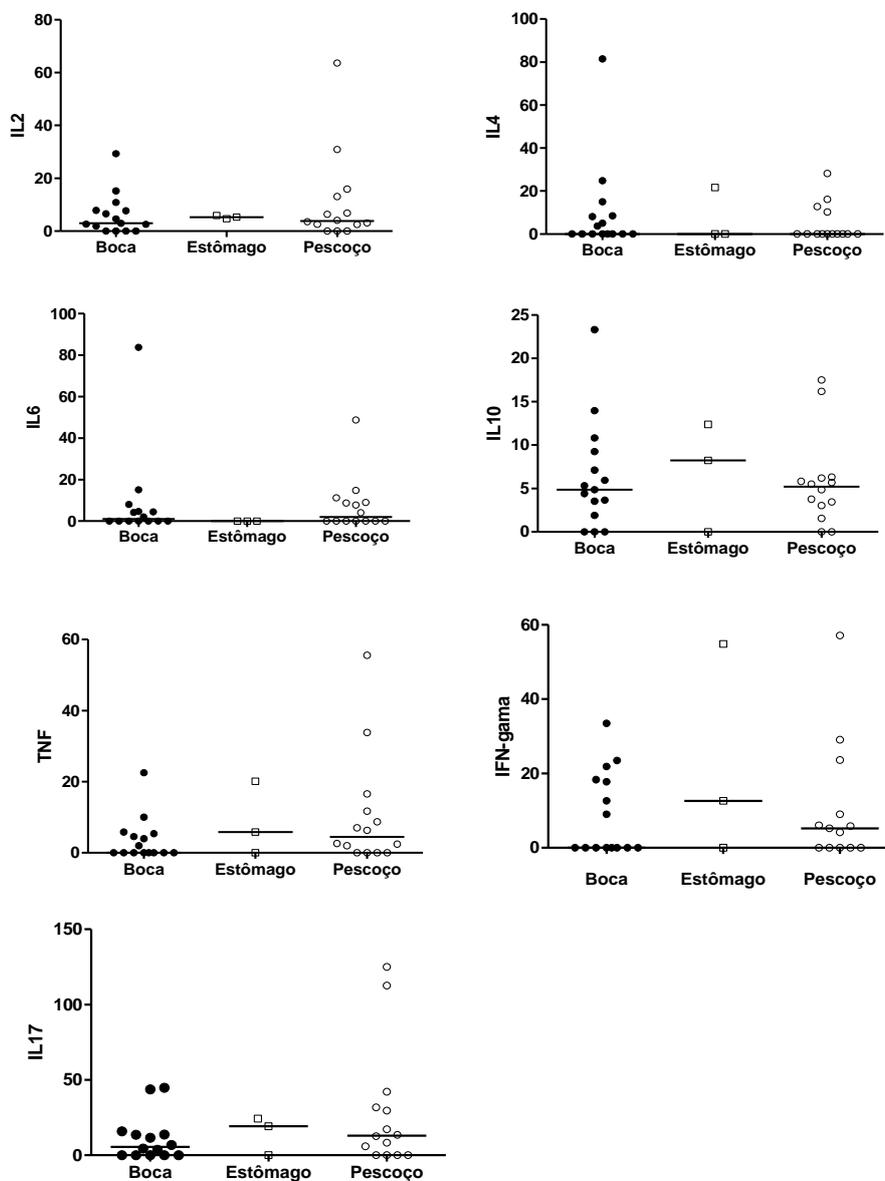


Figura 18. Painel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos com câncer de boca (N=15), estômago (N=3) e pescoço (N=15). Média entre os valores existentes.

Na figura 19 pode ser observado o perfil de citocinas de indivíduos com câncer com relação ao estadiamento do tumor. Observou-se diferença estatística significativa entre os grupos T1/T2 e T3/T4 somente para a IL10. Entretanto, pode-se observar um leve aumento para a IFN- $\gamma$  e IL-17 nos pacientes classificados como T1/T2 em relação aos pacientes classificados como T3/T4.

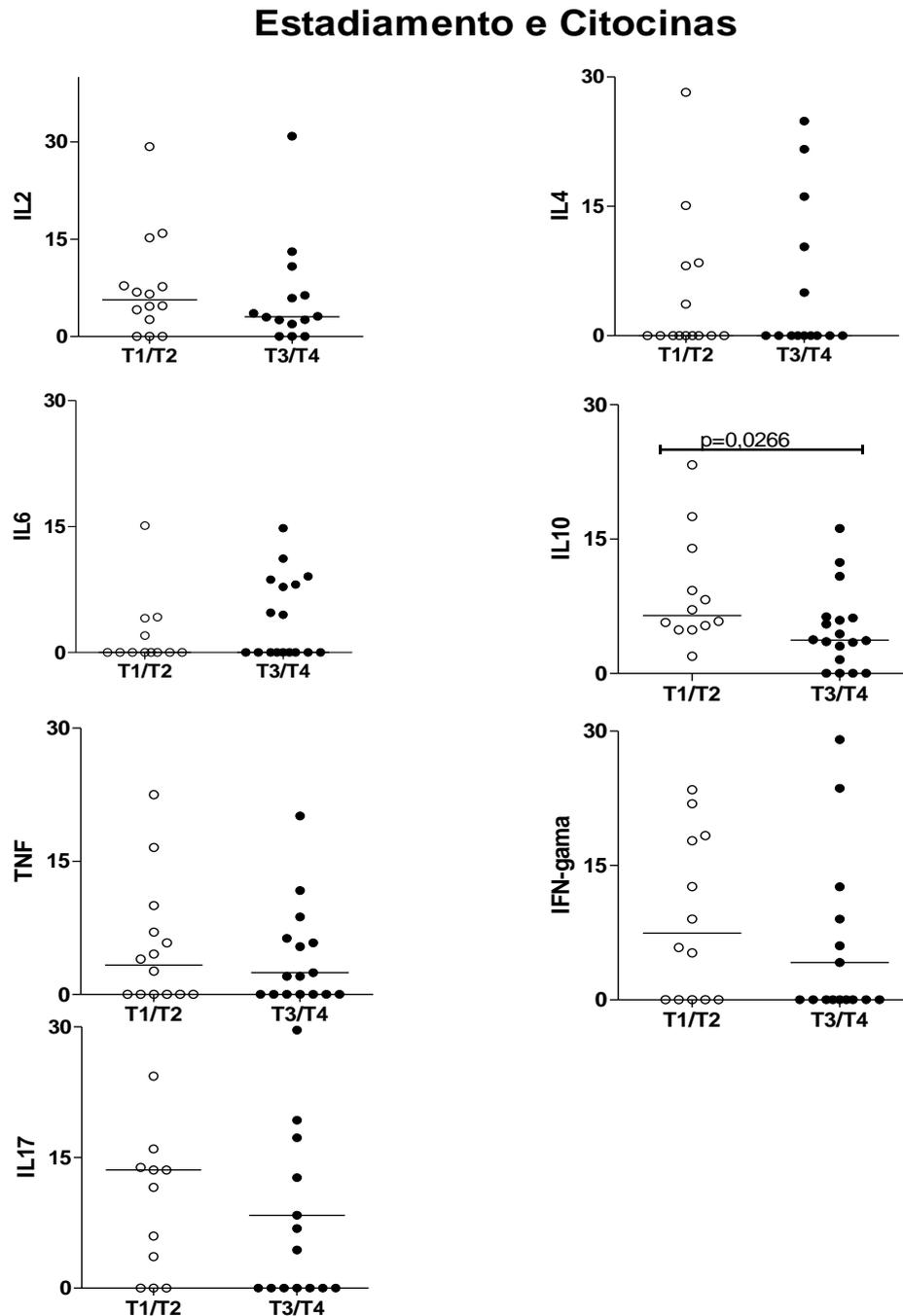


Figura 19. Paineil de citocinas dosadas no soro dos indivíduos com câncer T1/T2 (N=17) e T3/T4 (N=16). T1/T2 representa indivíduos com câncer na fase inicial e, T3/T4 pacientes com estado de câncer mais avançado. Média entre os valores existentes. IL-10  $p=0,0266$ .

Na figura 20 pode ser avaliado o perfil de citocinas nos indivíduos com câncer que possuíam o hábito de fumar ou não. Não foi possível visualizar diferença estatística quando analisadas a média dos valores entre os grupos de tabagistas e não tabagistas. Mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos, pode ser observado um leve aumento no nível de IL-2 e IL-17 nos pacientes classificados como tabagistas em relação aos não tabagistas.

### Tabagismo e Citocinas

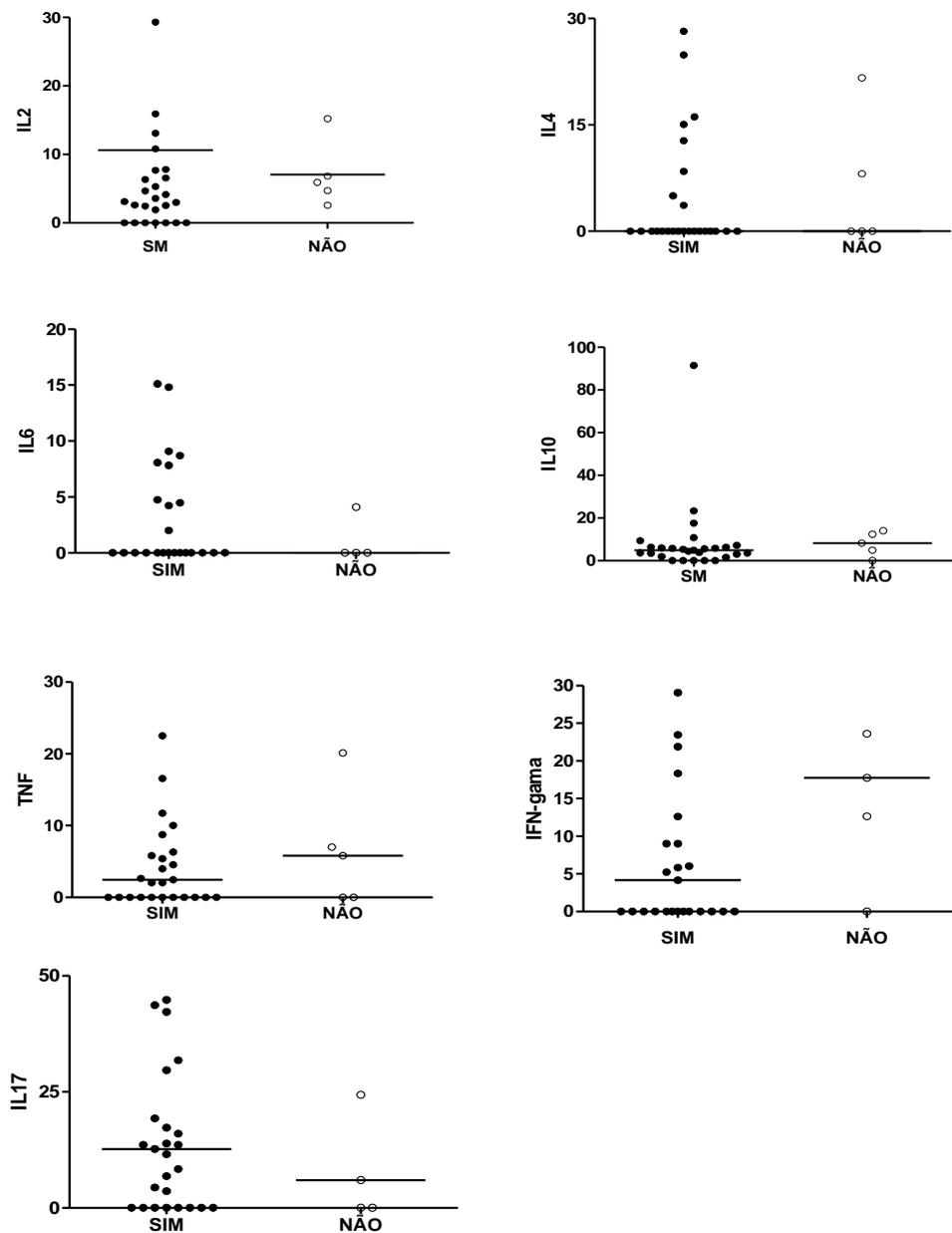


Figura 20. Painel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos com câncer tabagistas (SIM=27) e não tabagistas (NÃO=6). Média entre os valores existentes.

De acordo com os resultados da figura 21, foi observado o aumento de IFN- $\gamma$  no grupo que não apresentava etilismo. Paralelamente, não foi observado diferenças estatisticamente significativas em relação às citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-17, entre os grupos etilista e não etilista, quando analisadas a média do valor da produção dessas citocinas. Entretanto, para o grupo não etilista, observou-se um leve aumento das citocinas IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e, pequena redução para IL-17.

### Etilismo e Citocinas

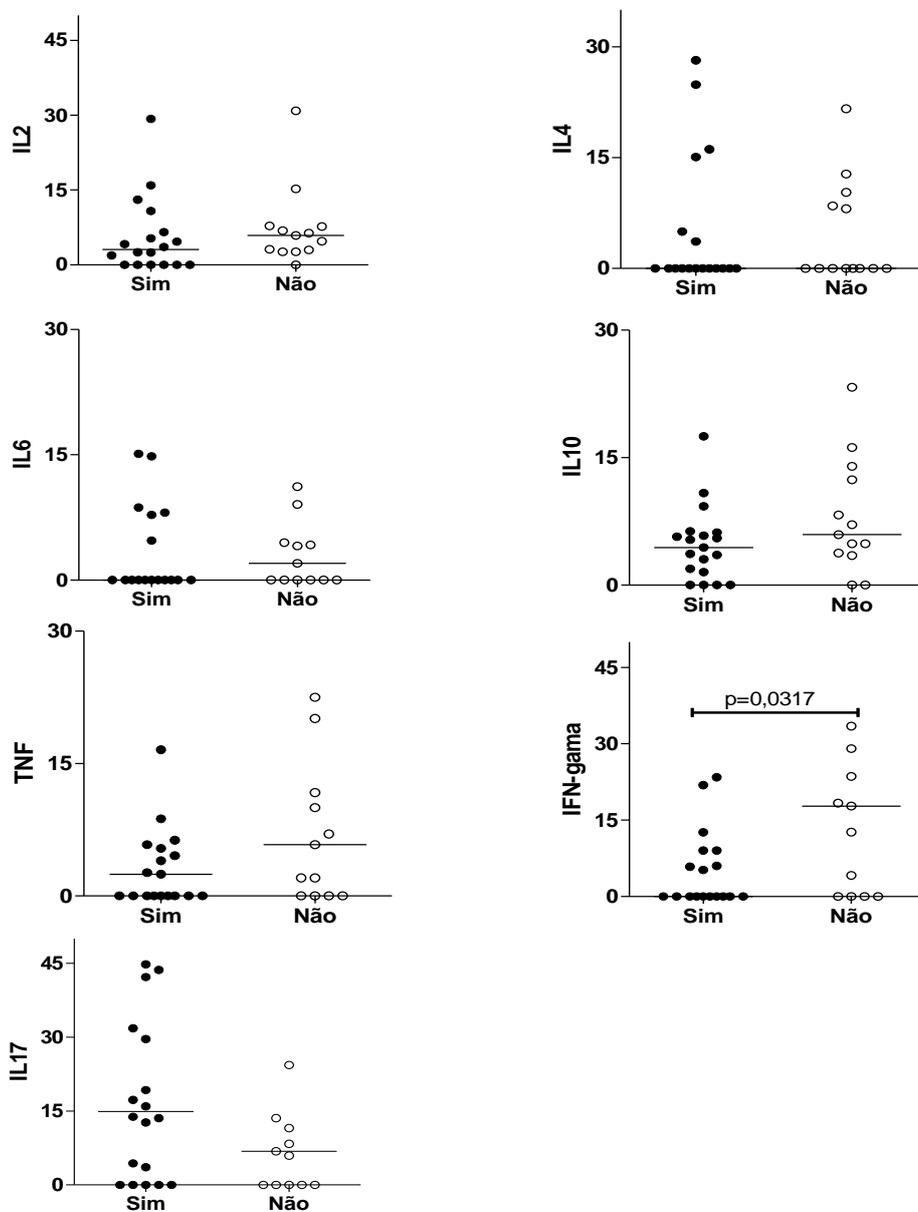


Figura 21. Pannel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos com câncer etilista (SIM=20) e não etilista (NÃO=13). Média entre os valores existentes. IFN- $\gamma$  p=0,0317.

Com relação ao sexo, não foi visualizada diferença estatística na produção das citocinas estudadas nos indivíduos com câncer, quando analisadas a média do valor (Figura 22). Embora para o sexo feminino tenha sido observado um leve aumento das citocinas IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-17, este achado não foi expressivo estatisticamente devido ao número de indivíduos do sexo feminino ser bem menor (N=4) em relação ao sexo masculino.

### Sexo Femino/Masculino CA X Citocinas

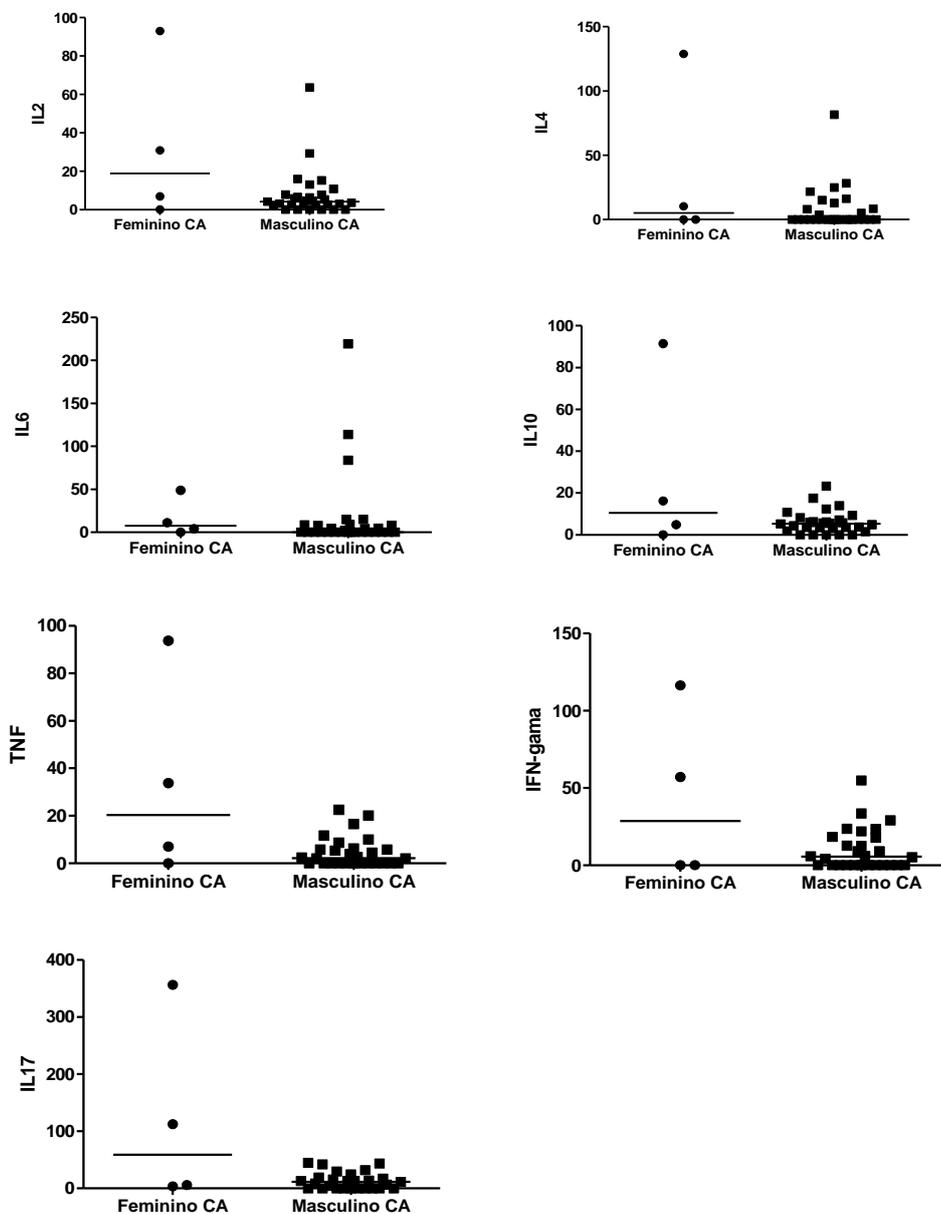


Figura 22. Paineis de citocinas dosadas no soro dos pacientes com câncer (CA) com relação ao sexo. Feminino (N=4) e Masculino (N=29). Média entre os valores existentes.

Já com relação ao sexo feminino nos indivíduos controle (CT=19) e os pacientes com câncer orogástrico (CA=4), na figura 23 é possível observar uma diferença estatística entre as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  estudadas quando analisadas a média do valor. Embora ainda para as mulheres com câncer tenha sido observado um leve aumento das citocinas IL-6, IL-10 e IL-17, este aumento não foi expressivo estatisticamente.

### Sexo Feminino CT e CA

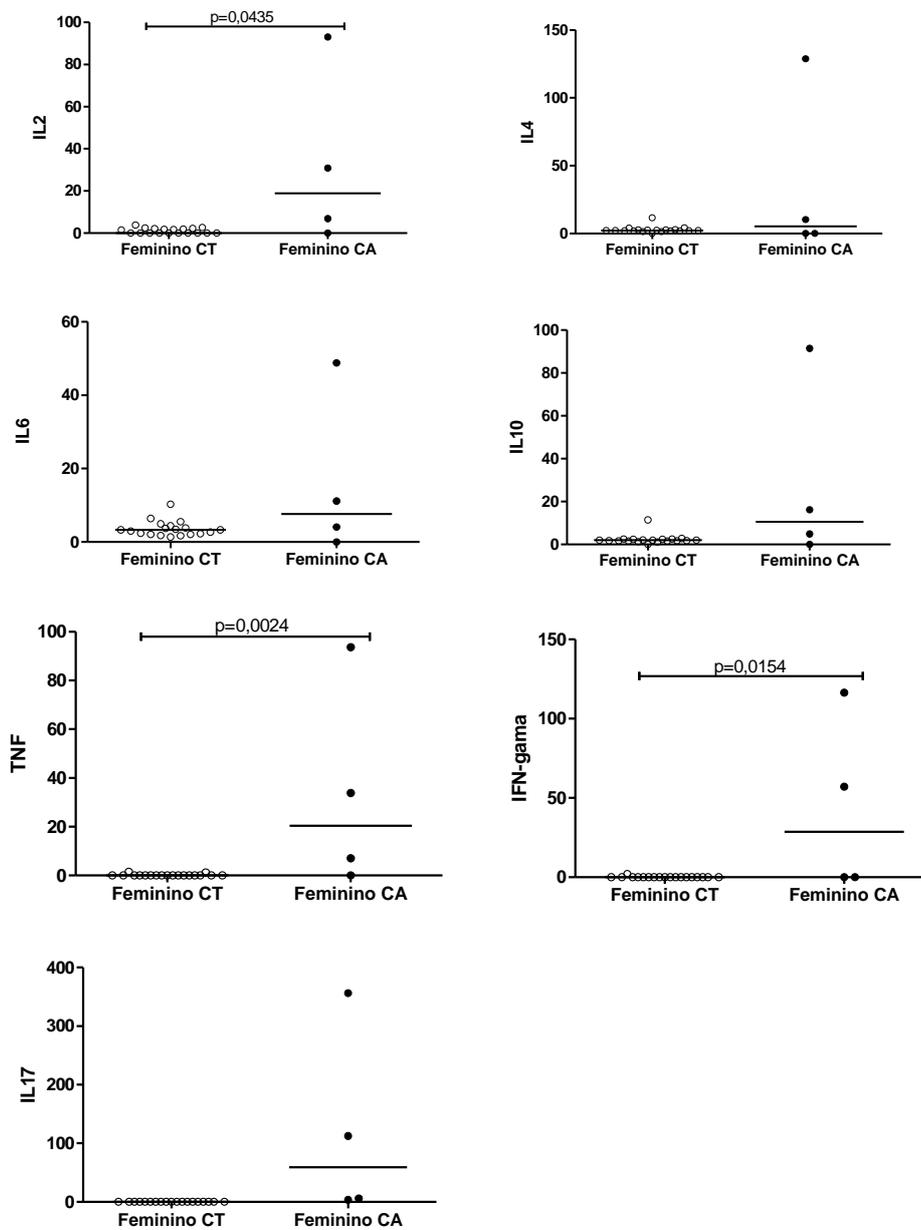


Figura 23. Painel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos do sexo feminino do grupo controle (CT=19) e pacientes com câncer (CA=4). Média entre os valores existentes. IL-2 p=0,0435, TNF p=0,0024 e IFN- $\gamma$  p=0,0154

A figura 24 mostra o perfil de citocinas estudadas com relação ao sexo masculino entre os indivíduos do grupo controle (CT= 12) e os pacientes com câncer (CA=29). Neste painel pode ser observado que houve uma diferença estatisticamente significativa quando analisada a média do valor para os pacientes com câncer frente à maioria das citocinas quantificadas que foram: IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17.

### Sexo Masculino CT e CA

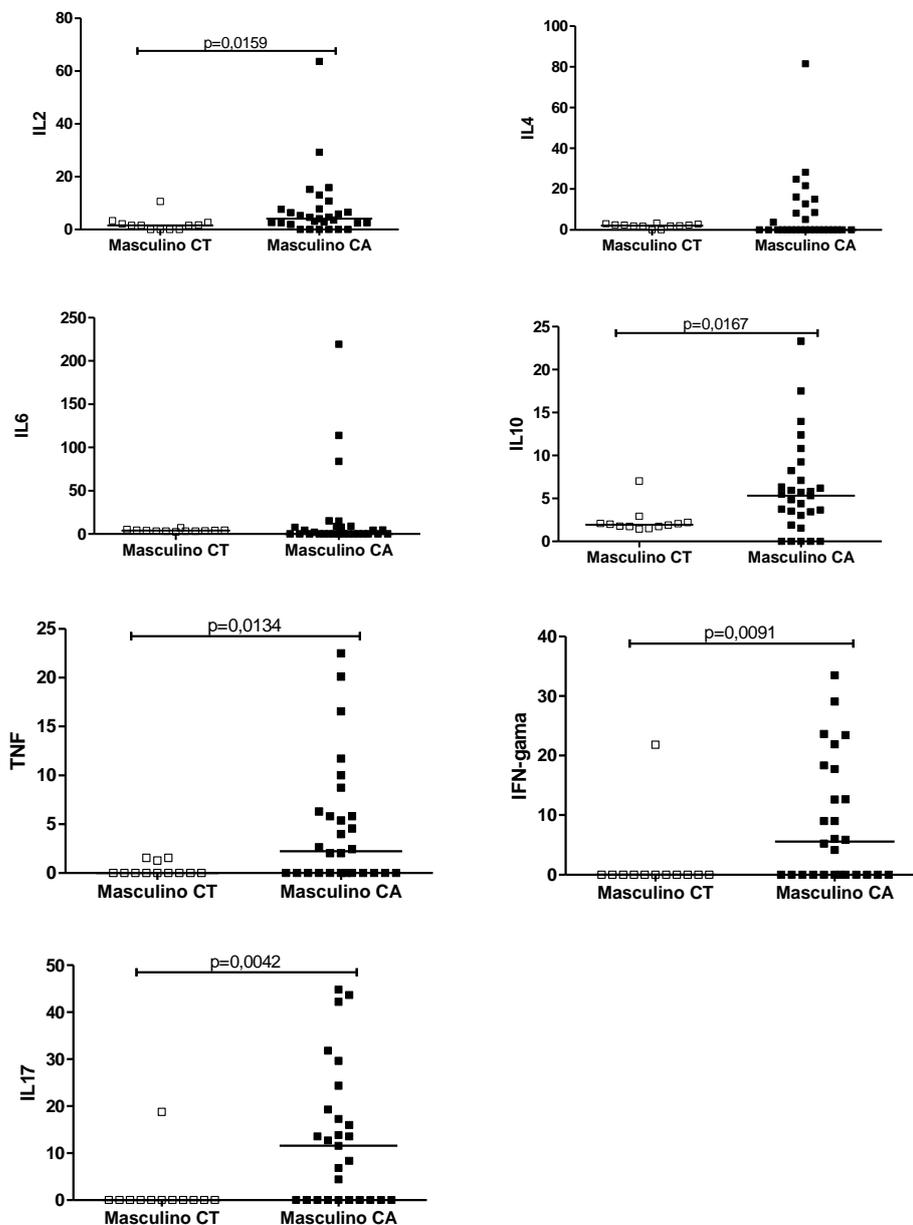


Figura 24. Painel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos do sexo masculino do grupo controle (CT=12) e pacientes com câncer (CA=29). Média entre os valores existentes. IL-2  $p=0,0159$ , IL-10  $p=0,0167$ , TNF  $p=0,0134$ , IFN-g  $p=0,0091$  e IL-17  $p=0,0042$ .

De acordo com o estado nutricional dos pacientes com câncer orogástrico (Figura 25), não foi observado aumento estatisticamente significativo para as citocinas estudadas quando analisadas a média do valor para estas citocinas. Entretanto, pode-se visualizar um leve aumento para as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  entre os indivíduos do grupo desnutrido quando comparado com o grupo moderadamente desnutrido e nutrido (Anexo 3).

### Citocinas e Estado Nutricional

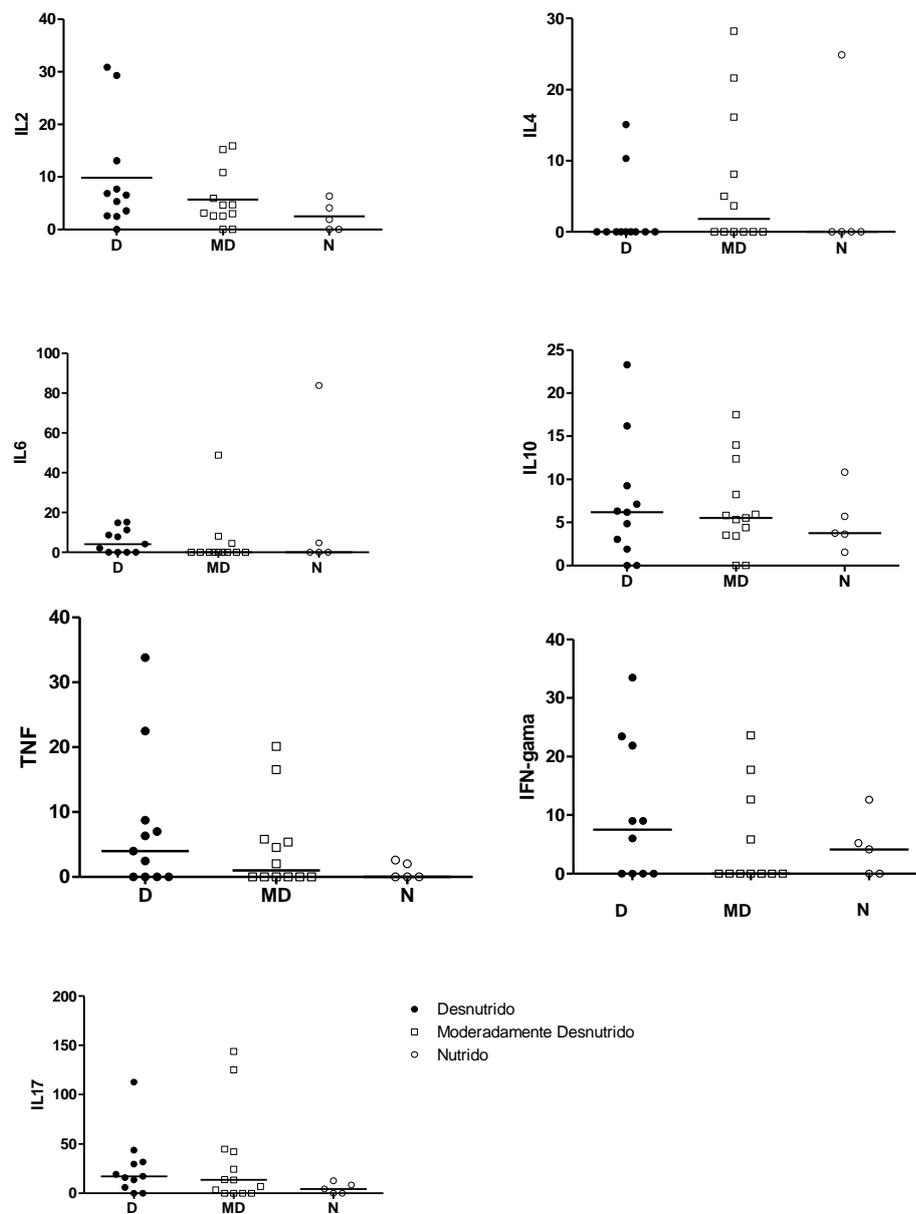


Figura 25. Painel de citocinas dosadas no soro dos indivíduos com câncer (CA) desnutrido (D=11), moderadamente desnutrido (MD=14) e nutrido (N=5). Média entre os valores existentes.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Diagnóstico do câncer

Anualmente, são diagnosticados cerca de 6,4 milhões de casos de tumores malignos no mundo, sendo o câncer oral responsável por 10% dos casos (STEWART & KLEIHUE, 2003). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que será válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide (INCA, 2014).

A detecção precoce do câncer oral é um dos mais eficientes meios para reduzir a elevada mortalidade desta doença. A detecção precoce pode minimizar a morbidade da doença e do tratamento. O câncer está muito associado com uma perda grave da função, deformação, depressão e má qualidade de vida (MEHROTRA & GUPTA, 2011).

A citopatologia é uma técnica bem conhecida e utilizada há aproximadamente, 50 anos, sendo empregada com sucesso na prevenção e no diagnóstico de câncer do colo do útero, assim como de outras doenças (HAYAMA et al, 2005). Atualmente, a citologia convencional, pode ser completada por técnicas especiais como análise de imagem imunohistoquímica, e biologia molecular (GARCIA et al, 2008).

Em um estudo feito por Carneiro e colaboradores (2006), utilizou-se a citologia para verificar a presença de leveduras em secreção vaginal e o método se mostrou eficiente para detecção deste microrganismo. Segundo García, a citologia urinária pode ser defendida como método padrão ouro ("Gold") utilizado para a triagem do carcinoma vesical (GARCIA et al, 2008).

A citologia tem sido utilizada também como uma forma de diagnóstico para o câncer oral. Rahman e colaboradores (2012), em um trabalho para avaliar a eficácia do azul de toluidina e citologia na detecção de câncer de boca e lesões displásicas, teve a inclusão de 86 participantes com suspeita de lesões pré-malignas orais ou carcinoma epidermóide oral. Os resultados deste estudo sugeriram que o azul de toluidina a 1% e a citologia possuem alta sensibilidade, especificidade e uma precisão na detecção de lesões orais pré-malignas e

carcinoma de células escamosas orais podendo ser utilizada como um adjuvante na detecção precoce de tais lesões.

No presente trabalho, após avaliação de seis pacientes, todos eles apresentaram resultado em concordância com a histopatologia (Figura 1). O mesmo foi observado por Fontes e colaboradores (2008). Após avaliação de 50 pacientes, os resultados mostraram que a citopatologia pode ser utilizada rotineiramente como método diagnóstico de carcinoma de células escamosas oral. Os autores concluíram que este método apresenta elevada concordância diagnóstica com o exame histopatológico (padrão-ouro) nos diagnósticos de positividade para carcinoma de células escamosas, e negatividade para malignidade (FONTES et al, 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho vêm apontar que o teste citológico é um método promissor no diagnóstico do carcinoma de células escamosas oral podendo vir a ser utilizado como possível teste de diagnóstico.

## **6.2 Aspectos epidemiológicos e fatores de risco para o câncer orogástrico**

O câncer é um dos mais graves problemas de saúde enfrentados por muitas pessoas no curso de sua vida segundo Ramirez-Garcia e colaboradores (2014). À medida que a doença progride, há um crescimento celular descontrolado, a invasão de tecidos, e no pior dos casos, a metástase. Entre as principais causas de morte no mundo está o câncer representando cerca de 8,2 milhões de mortes em 2012, sendo a metástases a principal causa de morte (RAMIREZ et al, 2014). *C. albicans* é um fungo dimórfico que geralmente ocorre como um microrganismo comensal na mucosa de seres humanos. Ele pode ser encontrado no trato intestinal, urogenital e na cavidade bucal de indivíduos saudáveis (FENG-YAN BAI, 2014). A presença da *Candida* é quase universal, pois é frequentemente isolada de várias superfícies mucosas em indivíduos saudáveis (AL-ABEID et al, 2004; PRAGATI et al, 2013). Indivíduos que apresentam a levedura na cavidade oral e não apresentam sintomas são veículos destes microrganismos. A prevalência de 3 a 48% de *Candida* na boca de adultos saudáveis tem sido relatada (SCULLY et al, 1994; PRAGATI et al, 2013). No presente trabalho foi observado que 59% dos indivíduos que fizeram parte do grupo controle eram portadores da levedura na cavidade oral. Segundo Mendonça e colaboradores (2012), estes microrganismos podem ser isolados no interior da cavidade oral de 20% a 80% de indivíduos saudáveis. Em outro estudo

realizado por Samaranayake e MacFarlane, 1990 (SANJAYA et al, 2011) foi observado que no grupo de estudo com indivíduos saudáveis, 50% apresentavam *Candida* na cavidade oral. Estes resultados concordam com os obtidos no presente estudo.

A possível associação entre *Candida* spp. e neoplasia oral foi relatada pela primeira vez na década de 1960 (CAWSON, 1969; WILLIAMSON, 1969), com relatos posteriores sugerindo uma ligação entre a presença de *C. albicans* na cavidade oral e o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de boca (CEB). Em um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (1998), foi observado que 56% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentavam levedura do gênero *Candida* na cavidade oral. Em outro estudo realizado por Mokaddas e colaboradores (2010), em crianças com câncer, foi observado que 55,5% destes pacientes apresentavam *Candida* na cavidade oral. No presente trabalho, dos pacientes com câncer orogástrico e que fizeram parte da pesquisa, 85% apresentaram a levedura na cavidade oral. Segundo Tang e colaboradores (2014), em um trabalho feito para verificar a epidemiologia e os fatores prognósticos de candidemia em pacientes com câncer, foi possível isolar a levedura em 84,7% dos indivíduos com câncer de cabeça e pescoço, gastrointestinal, pulmão e hematológico. Esses resultados concordam com os dados encontrados no presente trabalho e outros da literatura.

No Brasil, a incidência de neoplasias malignas da cavidade oral difere substancialmente nas diferentes regiões, e esse fato se deve às diferenças locais na prevalência dos fatores de risco, como tabagismo, alcoolismo, infecções por microrganismos, dietas, herança genética e o sexo (TESTINO, 2011). Fontes e colaboradores em 2008 observaram que 60% dos indivíduos com câncer de boca investigados eram do sexo masculino e 40% do sexo feminino. Em outro estudo realizado por Maio e colaboradores (2009), em indivíduos que apresentavam câncer oral e orofaringe, 77% eram do sexo masculino e 23% do sexo feminino. Teixeira e colaboradores, 2009, também observaram que entre indivíduos que possuíam câncer oral, 69,6% eram do sexo masculino e 30% do sexo feminino. Silva e colaboradores (2009) observaram que 86,5% dos indivíduos que apresentaram câncer oral eram do sexo masculino e somente 13,5% do sexo feminino. Borges e colaboradores (2008), realizando um estudo nos anos de 2005 e 2006 com indivíduos com câncer de boca, verificaram que no ano de 2006, 71,8% dos participantes eram do sexo masculino. Em um estudo feito por Somi e colaboradores (2014), na Província do Azerbaijão foi demonstrado que 70% dos indivíduos que possuíam câncer de estômago e esôfago pertenciam ao sexo masculino. Os resultados

encontrados no presente estudo mostram alta frequência de câncer orogástrico nos indivíduos do sexo masculino, 88%, contra apenas 12% no sexo feminino. Na literatura este tipo de câncer demonstra maior ocorrência no sexo masculino e tem sido associado ao uso do tabaco e do álcool, à predisposição genética, como os principais fatores de riscos para o CEC de boca. Há também evidências de que hábitos alimentares com baixos padrões nutricionais associados ao estilo de vida podem ser fatores coadjuvantes na etiologia do câncer orogástrico (TEIXEIRA et al, 2009).

Com relação à faixa etária dos pacientes com câncer orogástrico foi observado por Fontes e colaboradores (2008) que a idade destes pacientes variava entre 40 a 70 anos. Já para o grupo de indivíduos que fizeram parte da pesquisa de Silva e colaboradores, 2009, a maioria dos participantes, 78,4%, possuía a faixa etária superior a 50 anos. Em outro estudo feito por Maio e colaboradores (2009), dos 48 pacientes que fizeram parte do estudo a faixa etária foi de 39 a 77 anos, sendo a média de 56 anos de idade e a maioria, 67%, tinha idade superior a 50 anos. No trabalho desenvolvido por Teixeira e colaboradores (2009), a idade dos indivíduos variou de 26 a 98 sendo que 79,9% apresentaram idade acima de 50 anos. Em outro trabalho desenvolvido por Somi e colaboradores (2014), a idade média no momento do diagnóstico foi de  $66,1 \pm 12,6$  anos para os indivíduos com câncer gástrico e  $66,0 \pm 12,3$  anos para os que apresentavam câncer de esôfago. No presente trabalho a faixa etária entre os pacientes com câncer orogástrico variou de 21 a 88 anos de idade sendo que 79% apresentaram idade superior a 50 anos demonstrando concordância com os dados obtidos na literatura.

O câncer de cabeça e pescoço, incluindo aqueles da orofaringe, tem sido fortemente associado a pacientes que têm uma longa história de tabagismo e consumo de álcool (LEE et al, 2013). O álcool é o maior fator de risco reconhecido para os tipos de câncer oral, faringe e de laringe, juntamente com o consumo de tabaco, sendo este considerado um grande fator de risco para a maioria dos casos de câncer oral em países desenvolvidos representando 75% dos casos (TESTINO, 2011). Ainda segundo Testino, 50-75% dos casos de câncer de esôfago, tanto em homens quanto em mulheres, são atribuídos ao consumo de álcool. Na Coreia, 55-71% dos cânceres da cavidade oral, laringe e esôfago e 32% dos de estômago foram atribuídos ao tabagismo (PARCK et al, 2014). Em um grupo de indivíduos que possuíam câncer oral, 83,8% eram tabagistas e 94,6% eram etilistas crônicos (SILVA et al, 2009). No presente estudo 52% dos indivíduos que apresentaram câncer oral eram tabagistas e etilistas crônicos.

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e tem variação entre os diferentes sítios (cavidade oral, orofaringe, laringe ou hipofaringe) em muitas características, incluindo idade, sexo, etnia, grau histológico, modalidade de tratamento e prognóstico (MAGIĆ et al, 2013; DURAY et al, 2012). CECP é fortemente relacionado ao tabagismo sendo um dos tumores malignos mais agressivos na população humana. O carcinoma epidermóide oral representa 50% dos cânceres de cabeça e pescoço comumente diagnosticados (MAGIĆ et al, 2013; HAMIDI et al, 2014).

Para o ano de 2014 o câncer oral será o quarto mais frequente, enquanto os de esôfago e estômago serão o quinto mais frequente (INCA, 2014). Na Província do Azerbaijão, o atual relatório da base de patologia, atualizada sobre a incidência de cânceres gastrointestinais mostra que o câncer gástrico e de esôfago são os mais comuns em relação aos outros tipos e são mais prevalentes no sexo masculino (SOMI et al, 2014). Neste estudo, o câncer de boca foi o mais prevalente, 42%, seguido do câncer de esôfago com 28% e o de estômago com 14%.

### **6.3 Identificação dos isolados de *Candida***

O nosso sistema imunológico é normalmente preparado para manter um equilíbrio com a microbiota normal do nosso corpo e para combater as invasões microbianas. Em contraste, em indivíduos que apresentam um estado imunossuprimido, em decorrência dos tratamentos de câncer ou de outros fatores, essas funções ficam prejudicadas e os pacientes têm um risco aumentado de desenvolvimento de infecção endógena (RAMIREZ-GARCIA et al, 2014). As infecções causadas pela *Candida* são muito comuns em pacientes com câncer e tem aumentado enormemente nos últimos anos (TANG et al, 2014; ROUTH et al, 2013; KOFTERIDIS et al, 2010; MOKADDAS et al, 2010; PAUW, 2004).

Segundo Mañas e colaboradores (2012), a candidíase orofaríngea é a infecção fúngica mais comum que afeta pacientes oncológicos. A candidíase oral representa um problema grave para crianças com câncer. A taxa de mortalidade decorrente desta infecção tem aumentado muito devido a septicemia fúngica, associada a uma infecção bucal primária (GONZÁLEZ-GRAVINA et al, 2007). Em um trabalho desenvolvido por Wille e colaboradores, 2014, para verificar as tendências históricas na epidemiologia da candidemia sendo feita uma análise no período de 11 anos em um hospital terciário no Brasil, foi visto que 31,7% dos pacientes que

tinham câncer desenvolveram candidemia. Neste estudo feito por Wille e colaboradores (2014), a espécie *C. albicans* foi a mais prevalente representando 42,4% dos isolados seguido por *C. tropicalis* com 27,3%, *C. parapsilosis* representando 21,9% dos isolados e *C. glabrata* e *C. krusei* com somente 4,4% e 1% dos casos, respectivamente. Em outro estudo realizado por Gallè e colaboradores (2013) foram isoladas leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral de 31% dos pacientes com lesões de câncer na cavidade bucal, sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente (43,7%), seguida por *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Já em outro estudo realizado por Freitas e colaboradores (2013), ao avaliar os pacientes com câncer de cabeça e pescoço, foi observado que 58,6% dos indivíduos apresentavam a levedura na cavidade oral sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente com 45%, seguida por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Hebbar e colaboradores (2013), ao desenvolverem um estudo micológico e histológico em lesões da mucosa oral verificaram que 44,4% dos indivíduos que apresentavam câncer oral possuíam *Candida* na boca. Em um trabalho desenvolvido por com crianças e adolescentes que apresentavam câncer, González-Gravina (2007), relatou 69,35% de casos positivos para candidíase oral, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente (42,55%), seguida de *C. parapsilosis* (14,89%), *C. tropicalis* (12,77%), *C. krusei* (4,26%), *C. glabrata* (2,13%) e *C. lusitaniae* (2,13%). Em alguns casos, foi isolado mais de uma espécie (9,30%).

Segundo Mañas e colaboradores (2012) *Candida albicans* também foi a levedura dominante (69%) em 49 pacientes que apresentavam câncer de cabeça e pescoço, enquanto *Candida* não-*albicans* só foram encontradas em 15 pacientes (31%).

Em um grupo de 25 pacientes que apresentavam cânceres distintos como mama, intestino e pulmão, foi possível isolar a *Candida* de 40% destes sendo que 100% dos isolados foram identificados como *C. albicans* (AVRELLA & GOULART, 2008).

Vários relatos têm sugerido uma associação entre candidíase mucocutânea crônica e carcinomas de células escamosas orais (BOCKLE et al, 2010) e carcinomas de esôfago. A candidíase é frequente em pacientes com carcinoma de esôfago (DELSING et al, 2012). Um estudo sobre a frequência de candidíase gastro-esofágico em 465 pacientes que foram submetidos a endoscopia, mostrou que a candidíase foi mais frequente em pacientes com

carcinoma de esôfago (27%) do que em pacientes com outras formas de lesão da mucosa abordados, como esofagite (15%) (SCOTT & JENKINS, 1982).

No presente trabalho, 85% dos indivíduos com câncer orogástrico apresentaram esta levedura na cavidade oral mostrando uma alta prevalência deste microrganismo nos pacientes com câncer. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente representando 51,6% dos isolados seguido por *C. glabrata* com 14,5%, *C. parapsilosis* 12,9%, *C. lusitaniae* 8% e *C. tropicalis* e *C. krusei* ambos representaram um percentual de 6,5% dos isolados. Para o grupo controle, 59% dos indivíduos apresentaram a levedura na cavidade oral, sendo que 14 (66,7%) foram identificadas como *C. albicans*, 5 (23,8%) como *C. parapsilosis*, 1 (4,8%) como *C. krusei* e 1 (4,8%) como *C. glabrata*.

A identificação de leveduras através do método micro-morfológico é realizada baseando-se nas características singulares de cada espécie. De acordo com Konemann e colaboradores (2011) este teste exige um microbiologista com vasta experiência na área de identificação morfológica, visto que este processo é basicamente visual e por isso necessita de um profissional com excelente conhecimento nas estruturas das leveduras em questão.

No presente estudo, a identificação morfológica por meio do microcultivo relatou a existência de 6 espécies, sendo elas *C. albicans* (48,3%), *C. tropicalis* (9,7%), *C. parapsilosis* (13%), *C. glabrata* (14,5%), *C. krusei* (6,4%) e *C. lusitaniae* (8,1%) para os isolados recuperados dos pacientes com câncer orogástrico. Para os indivíduos do grupo controle foram identificadas 4 espécies sendo *C. albicans* (66,7%), *C. parapsilosis* (23,8%), *C. krusei* (4,8%) e *C. glabrata* (4,8%).

Os testes tradicionais são mais difundidos entre os laboratórios (BRASIL, 2007b), porém, a detecção, diferenciação e identificação de microrganismos pode se apresentar ambígua (SETTANNI & CORSETTI, 2007). Diante disso, provas moleculares representam uma ferramenta alternativa, pois além de aumentarem a sensibilidade e especificidade no processo de identificação, reduzem a subjetividade inerente aos métodos morfológicos e bioquímicos (ROSSELLÓ-MORA & AMANN, 2001). Existem hoje muitos protocolos para PCR, utilizando diferentes métodos de extração, sítios de amplificação e formas de detecção de amplicons (VOLLMER et al., 2008). Quando validada para uma determinada espécie de microrganismo, a técnica de identificação por PCR é considerada uma metodologia

extremamente confiável (SETTANNI et al., 2005). Para as leveduras de interesse clínico, a PCR tem sido a ferramenta molecular empregada na detecção de DNA (BOSCO-BORGEAT et al., 2011; SAMARANAYAKE et al., 2003).

Vários autores têm relatado os resultados da utilização da PCR-Multiplex na identificação de *Candida* spp. e de outros agentes de origem fúngica de espécimens clínicos (BOSCO-BORGEAT et al., 2011). A seleção de *primers* é, provavelmente, o parâmetro crítico para o sucesso da PCR-Multiplex. O desenho dos *primers* tem influência na especificidade e eficiência de amplificação, principalmente, em relação a propriedades que são específicas para cada sistema, tais como: composição de bases (%G+C), comprimento, modificações químicas sofridas e pureza (POWER, 1996). Nesta investigação, foi utilizado combinadamente os *primers* levedura-específicos *UNI1* e *UNI2* descritos por Trost e colaboradores (2004) e os *primers* espécies-específicos *Calb*, *Cgla*, *Ckru*, *Ctro*, *Cpar*, *Cgui*, *Clus* e *Cdub* descritos por Carvalho e colaboradores (2007) que amplificam as regiões ITS1 e ITS2 da maioria das espécies de *Candida* de importância médica. As diferenças na sequência destas regiões têm mostrado ser de grande valor na identificação de fungos potencialmente patogênicos (CHEN et al., 2001).

No presente estudo foi possível verificar concordância entre os resultados obtidos pelo microcultivo versus MALDI-TOF. Para as 26 amostras recuperadas dos pacientes com câncer e os nove amostras recuperados dos indivíduos do grupo controle apresentaram a mesma identificação no microcultivo e na MALDI-TOF. Em estudo realizado por Mähns e colaboradores (2005) foram comparados diferentes métodos fenotípicos para identificação de *Candida* spp., entre eles o microcultivo, utilizando como padrão leveduras previamente identificadas por PCR. Estes autores concluíram que não existe um único método capaz de diferenciar todas as espécies, principalmente quando elas possuem características semelhantes, como é o caso de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (CIRAK et al., 2003).

#### **6.4 Fatores de Virulência**

A expressão de fatores de virulência como a formação do tubo germinativo, adesinas, variabilidade fenotípica, formação de biofilme e a produção de enzimas hidrolíticas contribuem para a patogênese desenvolvida por leveduras do gênero *Candida* (MATTEI et al, 2013; SARDI et al, 2013).

A versatilidade do potencial patogênico de *C. albicans* é o resultado da sua capacidade de se adaptar ao ambiente do hospedeiro, por meio da regulação dos determinantes de virulência, principalmente das proteases aspárticas secretadas (SAPS), envolvidas na degradação tecidual e invasão (MEILLER et al, 2009).

A secreção de aspartil proteases (Sap1 - Sap10) é um importante determinante de virulência de *C. albicans* (NAGLIK et al, 1999; HUBE et al, 2001.; MONOD et al., 2002). Saps facilitam a invasão e colonização dos tecidos do hospedeiro pela ruptura das membranas mucosas (RUCHEL et al., 1992) e por importante degradação imunológica da defesa estrutural da proteínas (PICHOVÁ et al., 2001). Em relação a *C. glabrata*, apenas um único estudo demonstrou que esta espécie é capaz de produzir protease, mas o tipo de proteinase não foi especificada (CHAKRABARTI et al., 1991). Além disso, quando comparado com *C. albicans*, *C. parapsilosis*, tem uma baixa actividade de SAP (KOBAYASHI et al., 2004). Apenas três genes SAP têm sido identificados em *C. parapsilosis* (SAP 1-3), dois dos quais permanecem largamente descaracterizados (MERKEROVA et al., 2006). A isoenzima SAP1 no entanto foi caracterizada bioquimicamente (Fusek et al, 1994;. et Pichová al, 2001.; Dostal et al., 2005) e SAP2, produz uma proteinase funcional que constitui cerca de 20% da SAP isolados de sobrenadante de cultura (FUSEK et al., 1993). Nenhum estudo analisou ou caracterizou SAP2 ou SAP3. No entanto, há uma tendência relacionada à produção da SAP e local de isolamento, uma vez que tanto isolados de *C. parapsilosis* de origem vaginal e de pele exibem maior actividade na SAP in vitro do que os isolados de sangue (CASSONE et al, 1995.; DAGDEVIREN et al., 2005). Tal como acontece com *C. albicans*, estudos *in vitro* revelam que *C. tropicalis* é capaz de secretar níveis elevados de SAPs em um meio contendo albumina de soro bovino (BSA) como única fonte de nitrogênio.

A produção de fosfolipases e proteases, bem como a capacidade de adesão do microrganismo às superfícies celulares são considerados fatores importantes de virulência, que facilitam o estabelecimento de infecção, principalmente por fungos oportunistas (YANG et al, 2003). Segundo alguns autores, proteases e fosfolipase são produzidos em taxas elevadas por espécies de *C. albicans*, enquanto as espécies de *Candida* não-*albicans* em geral, apresentam baixos níveis destas enzimas (GOKCE et al 2007). Koga-Ito colaboradores (2006), mostraram um aumento da produção de proteinase e fosfolipase em linhagens de *C. albicans* isoladas de pacientes com candidíase oral quando comparado com aquelas isoladas de indivíduos controle. No nosso trabalho, proteinases e fosfolipases foram detectadas em *C. albicans* em

frequência de 6,4% e 37,1% respectivamente; em espécies não-*albicans*, ocorrência foi de 33,8% e 14,5%, respectivamente. Avrella & Goulart (2008), mostraram que 100% das amostras de *C. albicans* obtidos da cavidade oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico, produziram fosfolipase apresentando uma alta atividade enzimática.

Deorukhkar e colaboradores (2014), ao avaliar as amostras de *C. tropicalis* recuperadas de diferentes espécimes clínicos, verificaram que 72 (57,6%) das amostras apresentaram atividade de fosfolipase. Esta produção foi mais elevada em *C. tropicalis* recuperadas de swab vaginal e sangue. A atividade de proteínase que foi demonstrada em 65 (52%) isolados. A produção de proteinase foi elevada em *C. tropicalis* isolado da secreção vaginal e amostras de orofaringe.

Em um trabalho semelhante, Mattei e colaboradores (2013) verificaram que a atividade de fosfolipase foi detectada em 78% (120/153) das amostras de *C. albicans* e a atividade de protease foi detectada em 97% (148/153) dos isolados. Também, foi verificado que a maioria das amostras de *C. albicans* apresentou alta atividade enzimática para protease e menor atividade fosfolipase. Destes isolados estudados, 73% produziram tanto fosfolipase quanto proteinase.

Em um estudo desenvolvido por Mohan & Ballal (2011), verificou-se que a atividade de proteinase foi detectada em 89 (80,18%) das amostras e a atividade fosfolipase foi detectada em 49 (44,14%) sendo que esta produção enzimática foi visualizada em um maior número de amostras de *C. albicans* seguido de *C. krusei* e *C. tropicalis*. Em outra pesquisa desenvolvida por estes autores no ano de 2008, para verificar a atividade de proteinase e fosfolipase como fatores de virulência em espécies de *Candida* isoladas do sangue, pode ser observado que a percentagem de amostras que produziram quantidades detectáveis de proteinase e fosfolipase foi 74,56% e 44,73% respectivamente.

Mahmoudabadi e colaboradores (2010), ao verificar a atividade de fosfolipase de *C. albicans* a partir de amostras provenientes da mucosa vaginal e urina desmonstraram que 100% das amostras foram positivas para a produção extracelular de fosfolipase.

A aderência é outro fator de virulência considerado extremamente importante em leveduras porque a colonização e infecção dos tecidos bucais estão diretamente relacionadas à sua

capacidade de aderência (LIN et al, 2014; MACHADO et al, 2011; BARRETT-BEE et al, 1985). A atividade de fosfolipase mais elevada está relacionada com uma aderência mais forte às células epiteliais e maior patogenicidade (BARRETT-BEE et al, 1985). No presente estudo, as amostras que apresentaram maior atividade de fosfolipase, foram as amostras que também apresentaram uma maior capacidade de adesão.

Segundo Sardi e colaboradores (2013), o principal fator de colonização fúngica humana nos tecidos é a adesão à superfícies; este processo é controlado e induzido por várias cascatas de sinalização celular entre o fungo e o meio ambiente. Além disso, espécies de *Candida* podem aderir às superfícies formando biofilmes (LI et al., 2003). O fenômeno da adesão é exibido por proteínas de superfície especializadas, denominados adesinas, que especificamente se ligam a aminoácidos e açúcares na superfície de outras células ou promovem a aderência a superfícies abióticas (VERSTREPEN & KLIS, 2006).

No presente trabalho, as amostras isoladas da cavidade oral dos indivíduos com câncer foram mais aderentes que aquelas isoladas do grupo controle. O mesmo foi relatado por Machado e colaboradores (2011), em amostras de *Candida* recuperadas de pacientes com periodontite crônica.

Em outra pesquisa desenvolvida por Deorukhkar e colaboradores (2014), foi possível observar que 42,4% das amostras de *C. tropicalis* provenientes de amostras de urina e sangue possuíam alta capacidade de aderir formando biofilme.

### **6.5 Avaliação do perfil de suscetibilidade a agentes antifúngicos das amostras de *Candida* spp.**

No presente trabalho 96,7% das amostras de *C. albicans* provenientes dos indivíduos com câncer, foram sensíveis à anfotericina B, 73,3% ao fluconazol e cetoconazol, 63,3% ao voriconazol e 60% ao isoconazol. Para as amostras de *C. albicans* provenientes de indivíduos do grupo controle, 100% foram sensíveis à anfotericina B, fluconazol e cetoconazol, 84,6% ao voriconazol, e para o isoconazol 92% apresentaram sensibilidade. Estes isolados de indivíduos hígidos também apresentaram um grau elevado de sensibilidade conforme observado na literatura.

Numerosos estudos a respeito da determinação do CIM para as amostras de *Candida* spp. são encontrados na literatura nos últimos anos, devido a incidência de candidíases invasivas que aumentou dramaticamente (SAGHROUNI et al., 2011), juntamente com um aumento no isolamento de espécies resistentes aos medicamentos comumente usados em terapêutica. Os pacientes submetidos a radioterapia por apresentarem câncer de cabeça e pescoço representam um sério desafio em relação às complicações orais pós-tratamento derivadas de radioterapia (LALLA et al., 2010).

Em estudo desenvolvido por Güzel e colaboradores (2013), todos isolados de *C. krusei* provenientes de mulheres turcas com vaginite foram sensíveis a anfotericina B, caspofungina, cetoconazol e miconazol. Resistência ao fluconazol foi de 57,1% dos isolados. Sensibilidade ao itraconazol e voriconazol foi detectada em 42,9% e 67,9% dos isolados, respectivamente. Segundo Deorukhkar e colaboradores (2014), a resistência a anfotericina B foi vista em 22 (17,6%) das amostras de *C. tropicalis* isoladas da urina, mucosa vaginal, orofaringe e sangue.

Em outro estudo, desenvolvido por Corzo-Leon e colaboradores (2014), fazendo um levantamento de infecções por *Candida* spp. na corrente sanguínea em dois hospitais mexicanos, observaram que 100% das amostras de *C. albicans*, *C. Tropicalis* e *C. parapsilosis* foram sensíveis à anfotericina B e aos Azólicos. Onze por cento dos isolados de *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol, posaconazol e voriconazol. Em outra pesquisa realizada por Dolande Franco e colaboradores (2008), observou-se que dentre os isolados de *Candida* provenientes de seis centros de saúde na Venezuela, 100% das amostras de *C. albicans* apresentaram sensibilidade à anfotericina B e voriconazol e 92,6% ao fluconazol e 97,4% ao isoconazol.

*C. tropicalis* só foi isolada dos indivíduos com câncer e 100% foram sensíveis à anfotericina B, 33% ao fluconazol, 50% ao voriconazol, 83% ao isoconazol e 67% ao cetoconazol, mostrando que a maioria das amostras apresentou sensibilidade aos antifúngicos testados, com exceção do fluconazol que apresentou um percentual baixo. O mesmo foi observado por Deorukhkar e colaboradores (2014), ao verificar o perfil de sensibilidade a antifúngicos de amostras de *C. tropicalis*, demonstraram que 71,2% apresentaram resistência ao fluconazol seguido pelo cetoconazol com 68%. No presente estudo, 67% das *C. tropicalis* isoladas dos pacientes com câncer apresentaram resistência a este mesmo antifúngico, o que difere das amostras isoladas de candidíase vulvovaginal estudadas por Ragunathan e colaboradores

(2014), que mostraram 35 (87,5%) das amostras sensíveis ao fluconazol, 3 (7,5%) moderadamente sensíveis e apenas 2 (2,5%) resistentes.

No trabalho desenvolvido por Katsuragi e colaboradores (2014), foi relatado que 100% das amostras de *C. albicans* foram sensíveis a todos os antifúngicos testados. Todas as amostras de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* foram sensíveis à anfotericina B. Neste mesmo trabalho, 5,6% das amostras de *C. parapsilosis* foram resistentes ao fluconazol e 25% ao itraconazol. *C. glabrata* apresentou resistência ao fluconazol (19,1%), itraconazol (100%) e voriconazol (14,3%). *C. tropicalis* apresentou resistência ao fluconazol e itraconazol em 36,4%, e 72,7% das amostras, respectivamente.

WILLE e colaboradores (2014), em um levantamento epidemiológico de candidemia em um hospital no Brasil, verificaram que a resistência ao fluconazol foi encontrada em 2,47% (8/323) das espécies. As espécies que mais apresentaram resistência a esta droga foram *C. krusei* (2/3, 66,7%) e *C. glabrata* (2/15, 13,3%).

Os azólicos e anfotericina B continuam sendo as drogas mais comuns para o tratamento de infecções fúngicas (SCHWARZMÜLLER et al, 2014). A reduzida suscetibilidade aos azólicos na maioria dos isolados clínicos de *C. glabrata*, é considerada um dos principais contribuintes para o aumento da prevalência clínica deste patógeno (PFALLER et al, 2012). No presente trabalho, com relação as amostras de *C. glabrata* provenientes dos pacientes com câncer 100% das amostras apresentaram sensibilidade anfotericina B, fluconazol, isoconazol e cetoconazol e para o voriconazol 80%. Para o grupo controle, 100% das amostras apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos testados, demonstrando elevada sensibilidade das leveduras às drogas utilizadas. Em um estudo desenvolvido por Mishra e colaboradores (2014), no intuito de verificar o perfil de susceptibilidade das leveduras isoladas do trato urinário de pacientes cateterizados, foi demonstrado que 100% das amostras de *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol, 23% ao cetoconazol e apenas 7,60% foram resistentes a anfotericina B.

No presente trabalho, foi observado que 80% das amostras de *C. krusei* provenientes dos pacientes com câncer, apresentaram sensibilidade a anfotericina B, isoconazol e cetoconazol e 60% para o fluconazol e voriconazol. Já para as leveduras do grupo controle, foi observado que 100% das amostras apresentaram sensibilidade aos antifúngicos. Ao verificar esta mesma

espécie em um estudo desenvolvido por Mishra e colaboradores (2014), 100% das amostras apresentaram resistência ao fluconazol, porém somente 12,5% apresentaram resistência a anfotericina B. Em um estudo desenvolvido por Dolande Franco e colaboradores (2008), ao verificar a susceptibilidade de amostras de *Candida* em seis centros de saúde na Venezuela, foi possível determinar que a espécie que apresentou maior resistência aos antifúngicos testados foi *C. krusei* com 96% de resistência para o fluconazol e 94% ao isoconazol. Para anfotericina-B, 100% destas mesmas amostras apresentaram sensibilidade.

No presente trabalho, 100% das amostras de *C. parapsilosis* provenientes dos indivíduos com câncer apresentaram sensibilidade a anfotericina B, voriconazol, isoconazol e cetoconazol e 83,3% para o fluconazol. Mesmo havendo algumas amostras resistentes, foi possível verificar um índice elevado de sensibilidade nas leveduras isoladas. Todas as amostras do grupo controle do presente estudo foram sensíveis aos antifúngicos testados.

Estes dados podem ser comparados com os encontrados por Premkumar e colaboradores (2014), que ao investigarem a diversidade de espécies de *Candida* na cavidade oral, colonização e suscetibilidade antifúngica, observaram que 100% das amostras de *C. parapsilosis* recuperados de indivíduos diabéticos adultos apresentaram sensibilidade ao fluconazol. Em um estudo desenvolvido por Dharmik e colaboradores (2014), em mulheres com vulvovaginite na Índia causada por diferentes espécies de *Candida* 97,2% das amostras foram sensíveis ao fluconazol, sendo esta a droga que apresentou maior índice de sensibilidade.

Vijaya e colaboradores (2014), ao verificar a candidíase vulvovaginal em mulheres no período de novembro de 2011 a outubro de 2012 na Índia, observaram que 100% das amostras de *C. parapsilosis* foram resistentes ao fluconazol, porém para estas mesmas leveduras 100% apresentaram sensibilidade ao voriconazol. A espécie *C. albicans* apresentou 91,4% de sensibilidade ao fluconazol e ao voriconazol.

No presente estudo, *C. lusitaniae* só foi isolada dos pacientes com câncer. Estas leveduras apresentaram 100% de sensibilidade a anfotericina B, fluconazol e isoconazol. Para o voriconazol e cetoconazol 60% e 80% foram sensíveis respectivamente. O mesmo pode ser observado por Pfaller e colaboradores (2012), ao determinar as distribuições da CIM para anfotericina B, flucitosina, e itraconazol em isolados de *Candida* spp., observaram que 100%

das linhagens de *C. lusitaniae* apresentaram sensibilidade à anfotericina B, 95,3% a flucitosina e 95,8% ao itraconazol, mostrando uma sensibilidade elevada desses isolados aos antifúngicos testados. Em amostras de *C. lusitaniae* provenientes de pacientes HIV positivo em uma pesquisa desenvolvida por Junqueira e colaboradores (2012), verificou-se que todas as amostras apresentaram sensibilidade para anfotericina B e ao fluconazol também demonstrando concordância com os resultados apresentados no presente trabalho.

Segundo Yashavanth e colaboradores (2013), ao observarem a prevalência de candidúria e a susceptibilidade antifúngica em amostras de *Candida* em pacientes hospitalizados, verificaram que as amostras eram mais susceptíveis a anfotericina B (91%) comparada com voriconazol (72,72%) e fluconazol (66,66%). Sandoval-Denis e colaboradores (2014), ao avaliar a atividade de antifúngicos, verificaram que a anfotericina B mostrou atividade fungicida *in vitro*, enquanto que o fluconazol e caspofungina exerceram atividade fungistática em infecção murina por *C. lusitaniae*.

## **6.6 Caracterização das citocinas no soro dos pacientes**

A inflamação aguda é uma resposta a uma alteração induzida por um agente patogênico ou de uma agressão física ou química, a qual funciona eliminando a fonte do dano e restaurando a homeostase do tecido afectado. No entanto, a inflamação crônica provoca eventos celulares que podem promover a transformação maligna de células e de carcinogênese. Diversos mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ , e IL-10 têm sido mostrados como participantes tanto na iniciação como na progressão do câncer (LANDSKRON et al., 2014).

O desenvolvimento e o reaparecimento de tumores são considerados como sendo o resultado da resistência à terapia e evasão a partir da reação imunológica do hospedeiro (DRANOFF, 2002). As células inflamatórias e citocinas estabelecem um microambiente inflamatório do tumor, o qual é um componente essencial de todos os tumores e está envolvido em progressão tumoral, através da promoção da proliferação, sobrevivência, migração e evasão do sistema imune (WHITESIDE, 2008). As células do sistema imunológico e moléculas secretadas por estas células dentro do microambiente do tumor têm dois papéis decisivos na imunidade antitumoral e evasão imune (MOORE et al., 2010). Embora essa resposta inflamatória possa suprimir tumores, também podem facilitar o desenvolvimento do câncer e evasão através de

múltiplos caminhos de sinalização. Estudos anteriores demonstraram que a maioria das citocinas inflamatórias promove a proliferação de células tumorais (GERMANO et al., 2008).

Trabalhos na literatura demonstram que a interleucina IL-10 está envolvida na formação de tumor (ZHOU et al., 2014). As células tumorais também podem secretar IL-10, como os macrófagos tumorais infiltrantes (COSTA et al., 2013). Quando a IL-10 se liga ao seu receptor de tirosina, Jak1 e Tyk2 quinases fosforilam um domínio intracelular de IL-10R, permitindo a sua interação com STAT1, STAT3, STAT5 e, favorecendo a translocação STAT para o núcleo e a indução da expressão do gene. Já a citocina pró-inflamatória interleucina 17 (IL-17) é considerada importante para desempenhar um papel crucial em diversos tumores humanos; no entanto, o seu papel na progressão da doença permanece controverso. Embora o mecanismo exato ainda não esteja claro, esse paradoxo pode ser explicado pela concentração de IL-17 ou a natureza e a quantidade de células que expressam IL-17 (WANG et al., 2013).

Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) é um mediador inflamatório, que tem sido implicado na carcinogênese, devido a sua participação nas doenças inflamatórias crônicas (POPA et al, 2007). Os efeitos de TNF- $\alpha$  parecem ser mais importante nos estágios iniciais da carcinogênese, incluindo a angiogênese e invasão, e contra a progressão da carcinogênese (SZLOSAREK et al, 2006). Há controvérsia, no entanto, sobre o papel do TNF- $\alpha$  no câncer; concentrações elevadas dessa citocina pode induzir uma resposta antitumoral em um modelo murino de sarcoma. Em contrapartida, baixos níveis de produção, pode induzir um fenótipo tumoral. Um estudo realizado por Kwong e colaboradores (2009) investigando TNF- $\alpha$  associado à tumorigênese usando células epiteliais de ovário humano normal expostas a uma dose prolongada deste fator demonstrou a geração de um fenótipo pré-canceroso com alterações estruturais e funcionais, tais como desorganização do tecido, perda de polaridade epitelial, invasão celular, e superexpressão de marcadores de câncer (KWONG et al., 2009).

Há também evidências de que a exposição prolongada ao TNF- $\alpha$  pode aumentar a proporção de células estaminais do câncer em carcinoma epidermóide de boca, aumentando a sua esfera de capacidade na formação do tumor, células-tronco, fator de expressão da transcrição e tumorigenicidade (LEE et al, 2012).

No presente trabalho foi observado que os pacientes com câncer apresentaram uma elevada produção das citocinas inflamatórias IL2, IL10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL17 em relação ao grupo

controle. Segundo Wang e colaboradores, (2013), algumas evidências indicam que não é a inflamação em si, mas o contexto inflamatório que determina a capacidade de fatores pró-inflamatórios em facilitar ou impedir o crescimento do tumor. Recentemente, foi demonstrado que, em carcinoma hepatocelular, as células que expressam IL-17 estão predominantemente aumentados na região do estroma peritumoral, onde eles promovem a progressão da doença através do recrutamento de neutrófilos e estimulando a angiogênese na borda da invasão adjacente dos tumores. Os resultados descritos por Wang e colaboradores (2013), indicam que a maioria das células que expressam IL-17 em tecidos indiferenciados *in situ* são mastócitos (WANG et al., 2013).

Os resultados do presente trabalho demonstram que em pacientes com câncer orogástrico, as citocinas inflamatórias apresentaram valores de concentração no soro estatisticamente significativos em relação aos valores detectados para o grupo controle, o que demonstra concordância com a literatura (Figura 19). Segundo Eiró et al, 2012 e Wanlu et al., 2013, o desenvolvimento do câncer a partir da inflamação pode ser um processo conduzido por células inflamatórias, bem como uma variedade de mediadores químicos. O papel da inflamação no desenvolvimento do câncer foi descrito em 1863, por Rudolf Virchow. Suas observações mostraram que as células inflamatórias infiltrando os tumores originou a hipótese de que o câncer surge a partir de sítios inflamatórios. Mais recentemente, a inflamação tem se mostrado ser um componente crítico na progressão do tumor (BALKWILL and MANTOVANI, 2001; LANDSKRON et al., 2014) provocando eventos celulares que podem promover a transformação maligna de células e de carcinogênese. Embora não tenhamos analisado o fenótipo das células produtoras dessas citocinas, como, por exemplo, células inflamatórias, este microambiente inflamatório poderia ser um fator primordial para o desenvolvimento do câncer. Além disso, em vários tipos de câncer o seu surgimento tem sido observado a partir de locais de infecção e inflamação (HUSSAIN et al, 2007; LANDSKRON, 2014). As células do sistema imunológico e moléculas secretadas por estas células dentro do microambiente do tumor têm dois papéis decisivos na imunidade antitumoral e evasão do sistema imune (MOORE et al., 2010; WANLU et al., 2013). As células inflamatórias e citocinas estabelecem um microambiente inflamatório no tumor, o qual é um componente essencial em todos os tumores e está envolvido na progressão tumoral, através da promoção da proliferação, sobrevivência, migração e evasão do sistema imune (DEMARIA et al., 2010; WANLU et al., 2013).

Estudos anteriores *in vitro* com células humanas, bem como carcinoma de células escamosas (CCE) demonstraram que a concentração de certas citocinas pró-inflamatórias, citocinas proangiogênicas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina IL-1, IL-6 e IL-8 estão aumentadas. Há evidências de que as citocinas são produzidas de um modo desregulado em câncer orofaríngeo (CCE) e que têm funções no crescimento celular, invasão, interrupção na supressão do tumor e no estado imune (RHODUS et al, 2005; SAHEBJAMEE 2008). Neste estudo, os indivíduos com câncer orogástrico (CCE) também apresentaram níveis elevados de TNF- $\alpha$ , mostrando uma relação íntima com estes tipos de tumores, o que diferencia dos indivíduos controle.

Foi visualizado no presente estudo, que os indivíduos com câncer orogástrico também apresentaram um elevado nível de IL-10 no soro em relação ao grupo controle, apresentando concordância com dados obtidos na literatura (Figura 19). Outros autores tem demonstrado que a IL-10 desempenha um papel na carcinogênese considerado controverso, sendo um factor de promoção e inibição de tumores (MOCELLIN et al, 2005). Em carcinogênese colorretal, a IL-10 promove o crescimento do câncer, em vez de inibir, através da sua atividade imunossupressora (STANILOV et al, 2010; WANG et al., 2013). Estudos anteriores sugeriram que o aumento da IL-10 pode controlar respostas inflamatórias e desenvolvimento de câncer (CARUSO et al, 2009; WANG et al., 2013) e constituem um fator de risco para a carcinogênese. No entanto, em certos tipos de câncer, a baixa expressão de IL-10 pode constituir um fator de risco para a doença ou progressão da doença. A baixa produção da IL-10 está associado com um maior risco de adenocarcinoma gástrico, o que pode estar relacionado com o papel da IL-10 como uma citoquina anti-inflamatória que regula negativamente a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que são citocina pró-inflamatória (WANG et al., 2013).

A citocina pró-inflamatória IL-17 recentemente, foi identificada como um mediador importante na patogênese de diversos tumores humanos e é capaz de ser pró ou antitumorgênico (MURUGAIYAN 2009; WANG et al., 2013). Já a IL-17 tem a função de estimular a proliferação e recrutamento de neutrófilos (YANG et al, 2008; STEWART 2014), que são mediadores críticos da angiogênese, remodelação para o tecido, e pode promover um dano no DNA através da produção de radicais de oxigênio. No entanto, a célula Th17 é encontrada em frequência elevada em muitos cânceres humanos e sua presença ou a expressão de IL-17A está associada com mau prognóstico no carcinoma hepatocelular (HCC), câncer

colorretal, câncer de mama e câncer de pâncreas (MARTIN et al, 2012; STEWART 2014). Segundo Piva et al (2013), o controle destes mediadores inflamatórios podem prevenir a transformação maligna na cavidade oral. No presente estudo também foi quantificado a IL-17 no soro dos indivíduos com câncer em relação ao grupo controle e a mesma apresentou-se elevada, com valores estatisticamente significativos.

Dois conceitos importantes nos últimos anos tiveram um impacto significativo sobre a compreensão da imunidade fúngica. Em primeiro lugar, a descoberta de receptores de lectina do tipo C (CLRs) como elementos fúngicos que são reconhecidos pelos mecanismos de resposta imune inata. Em segundo lugar, a descoberta de células Th17 como uma população de células T helper, revelando um papel fundamental na imunidade antifúngica (HERNANDEZ-SANTOS & GAFFEN, 2012). O sistema imune inato proporciona a primeira linha de defesa contra patógenos fúngicos através da fagocitose e morte de patógenos invasores, bem como através da ativação da imunidade adaptativa, através da apresentação de antígenos e secreção de citocinas pró-inflamatórias. A imunidade adaptativa estimula a respostas do hospedeiro, através da produção de citocinas por células Th1, tais como IFN- $\gamma$  e resposta humoral Th2 que podem ter efeitos negativos, anti-inflamatórios pela liberação de interleucina IL-4 e IL-10. A interação entre Th1 e Th2 para combater a infecção por *Candida* é complexa, mas fundamental para a resposta a esta patógeno. Estudos anteriores demonstraram que respostas do tipo Th1 são essenciais para a erradicação de *Candida* (JOHNSON et al, 2012). Gasparoto e colaboradores (2012), em um estudo realizado com indivíduos idosos, demonstraram que a citocina imunorreguladora IL-10, tem a capacidade de inibir a IL-12 e IFN- $\gamma$ , favorecendo uma resposta imune tipo II e mostrando que este tipo de resposta (Th2) está associado com a susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *C. albicans* (GASPAROTO, 2012). Segundo JINGBO XIONG et al, 2000, espécies de *Candida* apresentam como fator de virulência a capacidade de induzir seletivamente um aumento de IL-10, com a inibição simultânea de IL-12, de células T e IFN- $\gamma$  permitindo uma susceptibilidade maior do indivíduo a candidíase (JINGBO XIONG et al, 2000). Os indivíduos com câncer que fizeram parte do estudo, apresentaram os níveis para as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-10 elevados apresentando uma resposta tanto Th1 como Th2.

Já com relação à produção de citocinas e ao tipo de tumor, no presente estudo não foi possível visualizar diferença estatística entre eles embora para o câncer de estômago para as citocinas IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17 foi apresentado um leve aumento.

Pesquisa desenvolvida por Ferri e colaboradores (2013), mostrou que os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8, IL-1b, TNF- $\alpha$  foram significativamente maiores em pacientes com câncer colorretal comparado com doadores saudáveis e que tais diferenças aumentam progressivamente com o estágio do tumor. Com relação ao grupo com câncer colorretal em fase precoce (I-II) comparado ao avançado (III-IV), todas as citocinas estudadas apresentaram um aumento significativo nos indivíduos que apresentavam o tumor em estágio mais avançado, com exceção do TNF- $\alpha$ . No presente estudo foi observado que o perfil de citocinas obtidos nos indivíduos com câncer orogástrico, relacionando ao seu estadiamento, para os indivíduos que foram classificados no estadiamento T3/T4 apresentou diferença estatística somente para a citocina IL-10 em relação aos que apresentavam o tumor no estágio T1/T2. Schoof e colaboradores (2013) verificaram que os níveis elevados de IL-10 estão associados a um mau prognóstico em indivíduos que apresentam linfoma de Hodgkin, mostrando correlação com o encontrado no trabalho atual.

Embora o tabagismo seja considerado um fator de risco para os indivíduos com câncer orogástrico, em se tratando de resposta imune e este fator de risco, no presente estudo não foi possível visualizar diferença estatística quando analisados a média dos valores entre os grupos tabagistas e não tabagistas. Já com relação ao hábito do etilismo, foi observado o aumento de IFN- $\gamma$  no grupo que não apresentava este hábito.

Há mais de trinta anos atrás, Doll e Peto (1981) descreveram o papel da contribuição do estilo de vida, dieta, em particular, sobre a incidência de câncer. Eles estimaram que um terço de todos os casos de câncer poderiam ser evitados por uma alimentação mais saudável (WICKI & HAGMANN, 2011; DOLL & PETO, 1981).

Desde o final de 1950, já foi levantado a hipótese de uma dieta rica em gordura estar contribuindo para a carcinogênese e a promoção de um resultado ruim em pacientes com câncer (HIRSCH et al, 2010).

Alguns autores têm demonstrado a importância da nutrição para os indivíduos com câncer. Segundo Al-Wahab e colaboradores (2014), um excesso calórico, responde como um factor de promoção do tumor, enquanto que a diminuição na ingestão de energia através de restrição calórica tem mostrado retardar a progressão do câncer. O efeito da ingestão de energia na progressão do câncer de ovário foi investigado em modelos de camundongos imunocompetentes para o câncer epitelial e de ovário, mantido em um regime de dieta regular, dieta de alta energia e dieta com calorias restrita. Avaliação do tumor revelou que os camundongos do grupo com dieta apresentando alto valor energético exibiram a formação de tumores mais extenso, acompanhado de um aumento dos níveis de insulina, leptina, e a IL-6. Por outro lado, o grupo de camundongos com dieta calórica restrita exibiu menos da carga tumoral associada com uma redução significativa nos níveis de insulina, leptina e IL-6. Enquanto o papel de uma dieta rica em energia para o câncer de ovário não foi confirmada na literatura, os resultados atuais permitem investigar o impacto potencial da dieta sendo utilizado como complemento a outras terapias anticâncer e como possível estratégia de tratamento individualizado do câncer de ovário (AL-WAHAB et al, 2014).

No presente estudo, observando o estado nutricional dos pacientes com câncer, não foi observado diferença estatisticamente significativa para as citocinas estudadas, apesar de ter sido possível visualizar um leve aumento para as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  entre os indivíduos do grupo desnutrido quando comparado com o grupo moderadamente desnutrido e nutrido.

Enquanto o progresso tem sido feito para que haja compreensão dos mecanismos de ação destas citocinas no processo tumorigênico, estabelecer uma relação entre a expressão de citocinas e a progressão da doença, a sobrevivência, e a resposta à terapia continua a ser um grande desafio ((LANDSKRON et al, 2014).

## 7 CONCLUSÕES

1. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas dos pacientes com câncer. O estado de portador de *Candida* encontrado nos pacientes com câncer orogástrico foi de 85%. Para o grupo controle o número de indivíduos portadores de *Candida* foi de 59%;
2. As técnicas fenotípicas utilizadas para identificação de leveduras se mostraram eficientes podendo chegar ao nível de espécie com segurança;
3. A espécie *C. albicans* foi a espécie mais prevalente na maioria das amostras recuperados dos pacientes com câncer orogástrico com 48,3%, em segundo lugar *C. glabrata* com 14,5%, em terceiro lugar *C. parapsilosis* representando 13%, *C. tropicalis* em quarto com 9,7%, *C. lusitaniae* com 8,1% e por último *C. krusei* com 6,4%;
4. Para o grupo controle, a espécie *C. albicans* também foi a mais prevalente representando 66,7% dos isolados, seguido de *C. parapsilosis* com 23,8% e *C. glabrata* e *C. krusei* com 4,8% cada;
5. Quanto aos fatores de virulência, as amostras de *Candida* obtidas da cavidade oral dos indivíduos com câncer orogástrico, foram mais aderentes do que aquelas obtidas da cavidade oral de pessoas sem alteração (grupo controle) da mucosa oral;
6. Quanto à produção de fosfolipase pelas amostras de *Candida* isoladas do grupo teste, 51,6% foram considerados positivos na liberação desta enzima enquanto que para o grupo controle, das amostras identificadas 61,9% foram positivas. Das amostras de pacientes com câncer, a produção da enzima proteinase foi visualizada em 41,9% destas amostras, sendo um número bem maior do que as isoladas do grupo controle, que foi apenas de 4,8%;
7. A concentração inibitória mínima (CIM) determinada pela técnica de microdiluição padronizada pelo CLSI mostrou ser um método eficiente para determinar a susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados de *Candida* spp. testados;
8. Os resultados gerados pelo CIM mostram ocorrência de sensibilidade entre os isolados para todos os antifúngicos testados;

9. As drogas antifúngicas as quais as amostras apresentaram maior susceptibilidade foram anfotericina B, isoconazol e cetoconazol;
10. Os pacientes com câncer orogástrico apresentaram um aumento estatisticamente significativo nos níveis de citocinas IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 em relação aos indivíduos do grupo controle (saudáveis);
11. Com relação à localização do tumor não foi visualizado diferença estatística entre os níveis de citocinas retiradas do grupo com câncer de boca, estômago e pescoço;
12. Para as citocinas observadas com relação ao estadiamento do tumor, foi possível observar diferença estatística entre os grupos T1/T2 e T3/T4 somente para a citocina IL10;
13. Diante do hábito de fumar, não foi possível visualizar diferença estatística quando analisadas a média dos valores entre os grupos tabagistas e não tabagistas;
14. Entre os indivíduos com câncer orogástrico que apresentavam o hábito de beber ou não, foi observado o aumento de IFN- $\gamma$  no grupo que não apresentava etilismo;
15. Com relação ao sexo, não foi visualizada diferença estatística na produção das citocinas estudadas nos indivíduos com câncer orogástrico;
16. Com relação ao sexo feminino nos indivíduos controle e os pacientes com câncer orogástrico, foi possível observar uma diferença estatística entre as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  estudadas quando analisadas a média do valor;
17. Para os indivíduos do sexo masculino, houve uma diferença estatisticamente significativa quando analisada a média do valor para os pacientes com câncer orogástrico em relação ao grupo controle, frente à maioria das citocinas quantificadas, IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17;

18. De acordo com o estado nutricional dos pacientes com câncer orogástrico, não foi observado aumento estatisticamente significativo para as citocinas estudadas quando analisadas a média do valor para estas citocinas.

19. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas dos pacientes com câncer. O número de portador de *Candida* encontrado nos pacientes com câncer orogástrico foi de 85%. Para o grupo controle o número de indivíduos portadores de *Candida* foi de 59%;

20. As técnicas fenotípicas utilizadas para identificação de leveduras se mostraram eficientes podendo chegar ao nível de espécie com segurança.

21. A espécie *C. albicans* foi a espécie mais prevalente na maioria das amostras recuperados dos pacientes com câncer orogástrico com 48,3%, em segundo lugar *C. glabrata* com 14,5%, em terceiro lugar *C. parapsilosis* representando 13%, *C. tropicalis* em quarto com 9,7%, *C. lusitaniae* com 8,1% e por último *C. krusei* com 6,4%;

22. Para o grupo controle, a espécie *C. albicans* também foi a mais prevalente representando 66,7% dos isolados, seguido de *C. parapsilosis* com 23,8% e *C. glabrata* e *C. krusei* com 4,8% cada;

23. Quanto aos fatores de virulência, as amostras de *Candida* obtidas da cavidade oral dos indivíduos com câncer orogástrico, foram mais aderentes do que aquelas obtidas da cavidade oral de pessoas sem alteração (grupo controle) da mucosa oral;

24. Quanto à produção de fosfolipase pelas amostras de *Candida* isoladas do grupo teste, 51,6% foram considerados positivos na liberação desta enzima enquanto que para o grupo controle, das amostras identificadas 61,9% foram positivas. Das amostras de pacientes com câncer, a produção da enzima proteinase foi visualizada em 41,9% destas amostras, sendo um número bem maior do que as isoladas do grupo controle, que foi apenas de 4,8%;

25. A concentração inibitória mínima (CIM) determinada pela técnica de microdiluição padronizada pelo CLSI mostrou ser um método eficiente para determinar a susceptibilidade aos antifúngicos dos isolados de *Candida* spp. testados;

26. Os resultados gerados pelo CIM mostram ocorrência de sensibilidade entre os isolados para todos os antifúngicos testados;
27. As drogas antifúngicas as quais as amostras apresentaram maior susceptibilidade foram anfotericina B, isoconazol e cetoconazol.
28. Os pacientes com câncer orogástrico apresentaram um aumento estatisticamente significativo nos níveis de citocinas IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17 em relação aos indivíduos do grupo controle (saudáveis);
29. Com relação à localização do tumor não foi visualizado diferença estatística entre os níveis de citocinas retiradas do grupo com câncer de boca, estômago e pescoço;
30. Para as citocinas observadas com relação ao estadiamento do tumor, foi possível observar diferença estatística entre os grupos T1/T2 e T3/T4 somente para a citocina IL10;
31. Diante do hábito de fumar, não foi possível visualizar diferença estatística quando analisadas a média dos valores entre os grupos tabagistas e não tabagistas;
32. Entre os indivíduos com câncer orogástrico que apresentavam o hábito de beber ou não, foi observado o aumento de IFN- $\gamma$  no grupo que não apresentava etilismo;
33. Com relação ao sexo, não foi visualizada diferença estatística na produção das citocinas estudadas nos indivíduos com câncer orogástrico;
34. Com relação ao sexo feminino nos indivíduos controle e os pacientes com câncer orogástrico, foi possível observar uma diferença estatística entre as citocinas IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  estudadas quando analisadas a média do valor;
35. Para os indivíduos do sexo masculino, houve uma diferença estatisticamente significativa quando analisada a média do valor para os pacientes com câncer orogástrico em relação ao grupo controle, frente à maioria das citocinas quantificadas, IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17;

36. De acordo com o estado nutricional dos pacientes com câncer orogástrico, não foi observado aumento estatisticamente significativo para as citocinas estudadas quando analisadas a média do valor para estas citocinas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ABEID HM, ABU-ELTEEN KH, ELKARMI AZ, HAMAD MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants and antifungal sensitivity. **Jpn J Infect Dis.** 57, 279-284, 2004.

AL-WAHAB Z., TEBBE C., CHHINA J., DAR S.A., MORRIS R.T., ALI-FEHMI R., GIRI S., MUNKARAH A.R. and RATTAN R. Dietary energy balance modulates ovarian cancer progression and metastasis. **Oncotarget.** Online ISSN:1949-2553, 5 Jul. 2014.

ALBRECHT A., FELK A., PICOVA I., NAGLIK J.R., SCHALLER M., GROOT P., MACCALLUM D., ODDS F.C., SCHÄFER W., KLIS F., MONOD M. and HUBE B. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and hostpathogen interactions. **J Biol Chem.** 281(2): 688–694, 2006.

ALMIRANTE B, RODRIGUEZ D. Antifungal agents in neonates. Issues and recommendations. **Pediatr Drugs.** 9: 311-321, 2007.

ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. Teste de Susceptibilidade aos Antifúngicos: Por que, Quando e Como Realizar. 1997. Informação Extraída da Internet. Disponível em: <http://www.newslab.com.br/antifung.htm> Acesso em: 03 jun. 2009.

ALVES, S.H., LOPES, J. O., COSTA, J. M., KLOCK, C. Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.** V.39, p.359-361, 1997.

ANDREU C. M. F; ECHEMENDÍA Y.; GONZÁLEZ T. C; LLANES D. M. Sensibilidad *in vitro* a la nistatina de aislamientos vaginales de *Candida* spp. **Rev Cubana Med Trop.** 53(3):194-8, 2001.

ANDRIOLI JL, OLIVEIRA GSA, BARRETO CS, SOUSA ZL, OLIVEIRA MCH, CAZORLA IM, FONTANA R. Frequência de leveduras em fluido vaginal de mulheres com e

sem suspeita clínica de candidíase vulvovaginal. **Rer. Bras. Ginecol. Obstet.** 31(6):300-4, 2009.

ARAUJO, N. S.; ARAUJO, V. C. Anatomia patológica nas lesões pré-neoplásicas In: PARISE JÚNIOR, O. (Org.). Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: **Sarvier**, 256 p, 2000.

ARENDRUP MC, FUURSTED K, GAHRN-HANSEN B, JENSEN IM, KNUDSEN JD, LUNDRGREN B, SCHONHEYDER HC, TVEDE M. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **J Clin Microbiol.** 43:4434-4440, 2005.

AVRELLA, D. & GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 40(3): 205-207, 2008.

ASHMAN RB. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. **Front Biosci.** May 1;13:3334-51, 2004.

BAGINSKI, M., STERNAL, K., CZUB, J., AND BOROWSKI, E. Molecular modeling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. **Acta Biochim. Pol.** 52(3): 655–658. PMID:16086075, 2005.

BAGGOTT JE, OSTER RA, TAMURA T: Meta-analysis of cancer risk in folic acid supplementation trials. **Cancer Epidemiol**, 36:78–81, 2012.

BÄR E, WHITNEY PG., MOOR K, REIS E SOUSA C, and LEIBUNDGUT-LANDMANN S. IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells. **Immunity.** 16;40(1):117-27, 2014.

BARRETT-BEE, K., Y. HAYES, R. G. WILSON, AND J. F. RYLEY. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J. Gen. Microbiol.** 131:1217–1221,1985.

BIRMAN, E. G.; SUGAYA, N. N. Citologia no diagnóstico do câncer bucal. In: KOWALSKI, L. P. et al.. Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal. Hospital do Câncer e Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas. São Paulo: **Frôntis Editorial**, 1999.

BLANCO, J.L.; GARCIA, M.E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 125, 47–70, 2008.

BLOT, W. J.; McLAUGHLIN, J. K.; DEVESA, S. S. & FRAUMENI Jr., J. E. In: Cancer Epidemiology and Prevention (Schottenfeld, D.; Fraumeni Jr., J. F.), pp. 666-680, New York: **Editora Oxford**, 1996.

BOANG, A. Caspofungin acetate: an antifungal agent. **Am. J. Health Syst. Pharm.** v. 58, n. 13, p.1206-1214, 2001.

BORGES, D. M. DE L., SENA M. F. DE, FERREIRA M. A. F., RONCALLI A. G. Mortalidade por câncer de boca e condição sócio-econômica no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 25(2): 321-327, fev, 2009.

BORGES FT.; GARBIN CAS.; CARVALHOSA AA.; CASTRO PHS.; HIDALGO LRC.; Epidemiologia do câncer de boca em laboratório público do Estado de Mato Grosso, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 24(9):1977-1982, set, 2008.

BORMAN A. M.; PETCH R.; LINTON C. J.; PALMER M. D., BRIDGE P. D.; JOHNSON E. M. *Candida nivariensis*, an Emerging Pathogenic Fungus with Multidrug Resistance to Antifungal Agents. **Journal of Clinical Microbiology**, Mar., p. 933–938, 2008.

BOUDA, M.; VASSILIS G., G.; KASTRINAKIS, N. G.; GIANOUDIS, A.; TSOULI, E.; DESPINA, D.; FOUKAS, P.; KYROUDI, A.; LASKARIS, G.; HERRINGTON, C. S. & KITTAS, C. “High Risk” HPV Types are frequently detected in potentially malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Modern Pathology**, 13(6):644-53, 2000.

BOCKLE BC, WILHELM M, MULLER H, GOTSCH C, SEPP NT. Oral mucous squamous cell carcinoma - an anticipated consequence of autoimmune polyendocrino-pathy-candidiasis-

ectodermal dystrophy (APECED). **Journal of American Academy of Dermatology**; 62(5):864–8, 2010.

BOSCO-BORGEAT M.E., TAVERNA C.G., CORDOBA S., ISLA M.G., MURISENGO O.A., SZUSZ W., VIVOT W., DAVEL G. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia in Argentina: identification by a novel multiplex PCR and comparison of different phenotypic methods. **Mycopathologia**. v. 172(5):407-14, Nov. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos 2007. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 5ª. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007e. 286 p.: il. (Série B. Textos Básicos de Saúde)**

BRODERS AC. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North Am.** 21(4):947-62, 1941.

CALDERONE, R., R. DIAMOND, J.-M. SENET, J. WARMINGTON, S. FILLER, AND EDWARDS J. E. Host cell-fungal cell interactions. **J. Med. Vet. Mycol.** 32: 151–168. 1994.

CALIN GA, LIU CG, SEVIGNANI C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. **Proc Natl Acad Sci. USA**; 101:11755–11760, 2004.

CANDIDO, R.C.; TOLI, M.R.T.; FRANCESCHINI, S.A.; GARCIA, F.R.; MINTO, E.C.M. In vitro activity of antimycotic agents determined by E-test method against vaginal *Candida* species. **Mycopathologia**. v.144, p.15-20, 1999.

CARLI M L, SANTOS S L, PEREIRA A A C, HANEMANN JA C. Características Clínicas, epidemiológicas e Microscópicas do Câncer Bucal Diagnosticado na Universidade Federal de Alfenas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 55(3): 205-211, 2009.

CARNEIRO S. S., PERALTA R. M., SVIDZINSKI T. I.E, CONSOLARO M. EL. Contribuição da citologia de Papanicolaou para o diagnóstico de leveduras em secreção vaginal. **DST – J bras Doenças Sex Transm.** 18(1), 36-40, 2006.

CARVALHO, A.; COSTA-DE-OLIVEIRA, M. L.; MARTINS, C. PINA-VAZ C, RODRIGUES AG, LUDOVICO P, RODRIGUES F. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 619-637. 2007.

CASSATELLA, M. A. The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. **Int. J. Clin. Lab. Res.** 28:148–161, 1998.

CASSONE, A., DE BERNARDIS, F., MONDELLO, F., CEDDIA, T., AGATENSI, L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **Journal of Infectious Disease.** v. 156, p 777- 783, 1987.

CHAKRABARTI A., DAS S., SHIVAPRAKASH M. R. New Antifungal Agents in Pediatric Practice. **Indian Pediatrics.** v. 46, p.235-231, 2009.

CHEN Y-T; KITABAYASHI N.; ZHOU X. K.; FAHEY T. J. and SCOGNAMIGLIO T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. **Modern Pathology.** 21, 1139–1146, 2008.

CHEN, K. Y; KO, S. C; HSUEH, P. R; LUH, K.T., YANG, P.C. Pulmonary fungal infection: emphasis on microbiological spectra, patient outcome, and prognostic factors. **Chest Journal**, v. 120, n.1, p. 177-184, 2001.

CHEN, Y. C., EISNER, J. D., KATTAR, M. M., RASSOULIAN-BARRETT, S. L., LAKE, K., YARFITZ, S. L., LIMAYE, A. P., COOKSON, B. T. Identification of Medically Important Yeasts Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. **Journal of Clinical Microbiology.** v.38, n.6, p.2302-2310, 2000.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Memórias Instituto Oswald Cruz.** v. 8, p. 1027-1032, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts (3<sup>a</sup> ed.). Pennsylvania: USA. **CLSI document M27-A3**, 2008.

COLOMBO A. L.; MATTA D. DA, ALMEIDA L. P. DE; ROSAS R. Fluconazole Susceptibility of Brazilian *Candida* Isolates Assessed by a Disk Diffusion Method. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** 6(3):118-123, 2002.

COMERT F., KULAH C., AKTAS E., EROGLU O. AND OZLU N. Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. **Mycoses.** 50, 52–57, 2006.

CORZO-LEON D.E., ALVARADO-MATUTE T., COLOMBO A.L., CORNEJO-JUAREZ P., CORTES J., ECHEVARRIA J.I., GUZMAN-BLANCO M., MACIAS A.E., NUCCI M., OSTROSKY-ZEICHNER L., PONCE-DE-LEON A., QUEIROZ-TELLES F., SANTOLAYA M.E., THOMPSON-MOYA L., TIRABOSCHI I.N., ZURITA J., SIFUENTES-OSORNIO. Surveillance of *Candida* spp bloodstream infections: epidemiological trends and risk factors of death in two Mexican tertiary care hospitals. **PLoS One.** 15; 9(5):e97325, May 2014.

COSTA A.L.L, ARAÚJO-JÚNIOR R.F, RAMOS C.C.F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. **Rev Brás Otorrinolaringol.** 71(2):181-7, 2005.

COSTA N. L., VALADARES M. C., SOUZA P. P. C. et al., Tumor associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology.** vol. 49, no. 3, pp. 216–223, 2013.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Pathologic bases of disease. 6 ed. **Philadelphia: Saunders.** 1425p, 2000.

CROSS S. A. AND SCOTT L. J. Micafungin A Review of its Use in Adults for the Treatment of Invasive and Oesophageal Candidiasis, and as Prophylaxis Against *Candida* Infections. **Drugs.** 68 (15): 2225-2255, 2008.

CAWSON R.A. Leukoplakia and oral cancer. **Proc.R. Soc. Med.** 62, 610-614, 1969.

CUMMINS JM, HE Y, LEARY RJ, et al. The colorectal microRNAome. **Proc Natl Acad Sci USA.** 103:3687–3692, 2006.

DAMMANN F, HORGER M, MUELLER-BERG M, SCHLEMMER H, CLAUSSEN C, HOFFMAN J, et al. Rational diagnosis of squamous cell carcinoma of the head and neck region: comparative evaluation of CT, MRI and 18FDGPET. **Am J Neuroradiol.** 184(4):1326-31, 2005.

DANNAOUI E, LORTHOLARY O, RAOUX D, et al. In vitro activity of caspofungin and micafungin against 1038 yeasts isolates from France by EUCAST reference method [abstract no. P1974 plus poster]. **17th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases and the 25th International Congress of Chemotherapy**; Mar 31-Apr 3; Munich, 2007.

DE BERNARDIS, F., MONDELLO, F., SAN MILLAN, R., PONTÒN, J., CASSONE, A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology.** v.37, p.3281-3486, 1999.

D'ÊÇA JR A, SILVA A, ROSA F, MONTEIRO S, FIGUEIREDO P, MONTEIRO C. *In vitro* differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop.** 44:334-338, 2011.

DELSING C.E., BLEEKER-ROVERS C.P., VAN DEVEERDONK F.L., TOL J., VAN DER MEER J.W.M., KULLBERG B.J., NETEA M.G. Association of esophageal candidiasis and squamous cell carcinoma. **Medical Mycology.** 5–8, 2012.

DEORUKHKAR S.C., SAINI S, and MATHEW S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**. Volume 2014, Article ID 456878, 6 pages, 2014.

DHARMIK P.G., GOMASHE A.V., UPADHYAY V.G. Susceptibility Pattern of Various Azoles Against Candida Species Causing Vulvovaginal Candidiasis. The **Journal of Obstetrics and Gynecology of India**. V. 63(2):135–137, March–April 2013.

DINIZ FREITAS, M. et al.. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 9, n. 4, p. 355-61, 2004.

DOLANDE FRANCO M.E., REVIÁKINA V., PANIZO M.M., MACERO C., MORENO X., CALVO A., SELGRAD S., PAPATZIKOS J., VERGARA V. Y MENDOZA M.J. Distribución y sensibilidad a los antifúngicos de aislamientos clínicos de *Candida* en seis centros de salud del área metropolitana de Caracas, Venezuela (años 2003-2005). **Revista Iberoamericana Micología**. 25: 17-21, 2008.

DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 66:1191–308, 1981.

DOMER, J.E. & LEHRER, R.I. Introduction to *Candida* Systemic Candidiasis. IN: MURPHY, J.W.; FRIENDMAN, H.; BENDINELLI, M. Fungal Infections and Immune Responses. **Plenum Press**, New York, cap.4, p.49-116, 1993.

DURAY A, DESCAMPS G, DECAESTECKER C, REMMELINK M, SIRTAINÉ N, LECHIEN J, ERNOUX-NEUFCEUR P, BLETARD N, SOMJA J, DEPUYDT CE, DELVENNE P, SAUSSEZ S. Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. **Laryngoscope**. 122:1558-1565, 2012.

EDER M, SCHERR M. MicroRNA and lung cancer. **N Engl J Med** 2005;352:2446–2448.

EIS PS, TAM W, SUN L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. **Proc Natl Acad Sci USA**. 102:3627–3632, 2005.

ELEWSKI, B.E. Mechanisms of action of systemic antifungal agents. **J. Am. Acad. Dermatol.** 1993. v. 28, n.5 (pt. 1), p.28-34.

ENOCH D. A, LUDLAM H. A, BROWN N. M. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. **J Med Microbiol.** 55:809-818, 2006.

EPSTEIN, J. B. *et al.* Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J. Can. Dent. Assoc.** v. 68, p. 617-21, 2002.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M.A. Antifungal agents and susceptibility testing. IN: MURRAY, P.R.; BORON, E. J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology.** 6 ed., EUA, ASM Press, p.1405-1414, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A. Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). **Revista Iberoamericana de Micología.** 26(1):15-22, 2009.

EVANS, E. G. V. The clinical efficacy of terbinafine in the treatment of fungal infections of the skin. **Rev. Contemp. Pharmacother.** 8:325–341, 1997.

FARAH CS, GOTJAMANOS T, SEYMOUR GJ, ASHMAN RB. Cytokines in the oral mucosa of mice infected with *Candida albicans*. **Oral Microbiol Immunol.** Dec; 17(6):375-8, 2002.

FARAH C. S., ELAHI S., PANG G., GOTJAMANOS T., SEYMOUR G. J., CLANCY R. L., AND ASHMAN R. B. T Cells Augment Monocyte and Neutrophil Function in Host Resistance against Oropharyngeal Candidiasis. **Infection and immunity.** Vol. 69, No. 10, p. 6110–6118, 2001.

FELK, A., M. KRETSCHMAR, A. ALBRECHT, M. SCHALLER, S. BEINHAEUER, T. NICHTERLEIN, D. SANGLARD, H. C. KORTING, W. SCHAFER, AND B. HUBE. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. **Infect. Immun.** 70:3689–3700, 2002.

FENG-YAN BAI. Association of genotypes with infection types and antifungal susceptibilities in *Candida albicans* as revealed by recent molecular typing strategies. **Mycology**. v. 5, No. 1, 1–9, 2014.

FERREIRA N. M. L. A. O câncer e o doente oncológico segundo a visão dos enfermeiros. **Revista brasileira de cancerologia**. 42(3): 161-70, 1996.

FERREIRA, M. A. F.; MACIEL, S. S. S. V. O câncer bucal. In: FERREIRA, M. A. F. Saúde bucal coletiva: conhecer para atuar. Natal: Edufrn. p. 137-148, 2004.

FERRI M., ROSSI DEL MONTE S., SALERNO G., BOCCHETTI T., ANGELETTI S., MALISAN F., CARDELLI P., ZIPARO V., TORRISI M.R., VISCO V. Recovery of immunological homeostasis positively correlates both with early stages of right-colorectal cancer and laparoscopic surgery. **PLoS One**. v. 9;8(9):e74455, Sep 2013.

FILLER, S.G. & EDWARDS, J.E.Jr. Mucocutaneous Candidiasis. IN: MURPHY, J.W.; FRIENDMAN, H.; BENDINELLI, M. Fungal Infections and Immune Responses. **Plenum Press**, New York, cap.5, p.117-133, 1998.

FLCKIGER U, MARCHETTI O, BILLE J, et al. Treatment options of invasive fungal infections in adults. **Swiss Med Wkly**. 136: 447-463, 2006.

FONTES, K. B. F. C., MILAGRES A., MIURA M. M. P., SILVA L. E. DA, DIAS E. P. Contribuição da citopatologia para o diagnóstico de carcinoma de células escamosas oral. **J Bras Patol Med Lab**. v. 44, n. 1, p. 17-24, 2008.

FOTHERGILL, A. W. Antifungal Susceptibility Testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Methods. Chapter 2, p. 65 – 72, 2012.

FOTOS, P.; HELLSTEIN, J. *Candida* and candidosis - Epidemiology, diagnosis, and therapeutic management. **Dental Clinics of North America**. v.36. n.4, p.857-878, 1992.

De FREITAS EM<sup>1</sup>, NOBRE SA, PIRES MB, FARIA RV, BATISTA AU, BONAN PR.. Oral *Candida* species in head and neck cancer patients treated by radiotherapy. **Auris Nasus Larynx**. Aug; 40(4):400-4, 2013.

GARCÍA C. M. A; FERNÁNDEZ F. E, MARTÍN CORRIENTE MC, GARCÍA H. S, ÁLVAREZ-ARGÜELLES C. H. Utilidad de la citología de orina para el diagnóstico del carcinoma vesical: estudio comparativo con biopsia. **Actas Urol Esp.**, 32(9), 904-907, 2008.

GASPAROTO T. H., OLIVEIRA C. E., VIEIRA N. A., PORTO V. C., GASPAROTO C. T., CAMPANELLI A. P., LARA V. S. The pattern recognition receptors expressed on neutrophils and the associated cytokine profile from different aged patients with *Candida*-related denture stomatitis. **Experimental Gerontology** 47, 741–748, 2012.

GAUR A, JEWELL DA, LIANG Y, et al. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. **Cancer Res.** 67:2456–2468, 2007.

GLIGOROV J, BASTIT L, GERVAIS H et al. Prevalence and treatment management of oropharyngeal candidiasis in cancer patients: results of the French Candidoscope study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 80:532–539, 2011.

GONZÁLEZ-GRAVINA H., MORÁN E.G., ZAMBRANO O., CHOURIO ML, VALERO SR., ROBERTIS S., MESA L. Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** 1;12(6):E419-23, Oct 2007.

GOZALBO D, GIL ML. IFN-gama in *Candida albicans* infections. **Front Biosci.** Jan 1;14:1970-8, 2009.

GREENBERG RN, MULLANE K, VAN BURIK JA, RAAD I, ABZUG MJ, ANSTEAD G, et al. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. **Antimicrob Agents Chemother.** 50: 126-133, 2006.

GRUPTA, A.K.SAUDER, D.N.; SHEAR, N.H. Antifungal agents: an overview. Part I. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.30, n. 5, pt 1, p. 677-698, 1994.

GUNARSKOG, J.; STENBECK, M. & HOLM, L. Lip, Oral Cavity and Mesopharynx. Cancer. **Acta Oncologica**;34 Suppl 4:5-10. mar. 1995.

GÜZEL A.B., AYDIN M., MERAL M., KALKANCI A., ILKIT M. Clinical characteristics of Turkish women with *Candida krusei* vaginitis and antifungal susceptibility of the *C. krusei* isolates. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**. v. 2013: 698736, 2013.

HAMIDI O.; TAPAK L.; KOHNELOO AJ.; SADEGHIFAR A. High-Dimensional Additive Hazards Regression for Oral Squamous Cell Carcinoma Using Microarray Data: A Comparative Study. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

HANAHAN D. and WEINBERG R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.

HAYAMA, F.H.; MOTTA , A.C.; SILVA , A.P.G. Preparados de base líquida vs. citología convencional: adhesión de las muestras y coincidencia del diagnóstico en lesiones orales. **Med Patol Oral y Cir Bucal**. v. 10, p. 115-22, 2005.

HAN J.; KIOIIM.; CHU W-S.; KASPERBAUER J. L; STROME S. E. and PURI R. K. Identification of potential therapeutic targets in human head & neck squamous cell carcinoma. **Head & Neck Oncology**. 1:27, 2009.

HEBBAR PB., PAI A., AND SUJATHA D. Mycological and histological associations of *Candida* in oral mucosal lesions. **Journal of Oral Science**. v. 55, No. 2, 157-160, 2013.

HEIKKILÄ K., EBRAHIM S., and LAWLOR D. A., Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. **European Journal of Cancer**. v. 44, no. 7, pp. 937–945, 2008.

HEIMDAHL, A.; NORD, C. Oral yeast infections in immuno-compromised and seriously diseased patients. **Acta Odontologica Scandinavia**. v.48, p.77-84, 1990.

HERMANS R. Multidisciplinary symposium: head & neck cancer. **Cancer Imaging**. 5:52-57, 2005.

HIRSCH HA, ILIOPOULOS D, JOSHI A, et al. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. **Cancer Cell**. v.17:348–61, 2010.

HOBAN D, WESHNOWESKI B, ZHANEL G, VASHISHIT R, BL B. Azole resistance in bacteremic *Candida* species: Canada 1998-2005. San Francisco: **ICAAC**. M-1594, 2006.

HOMANN N, TILLONEN J, RINTAMAKI H, SALASPURO M, LINDQVIST C, MEURMAN JH. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva: a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. **Oral Oncol**. 37:153-8, 2001.

HUBE, B., AND J. NAGLIK. 2001. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**. 147:1997–2005.

HUBE, B., M. MONOD, D. A. SCHOFIELD, A. J. P. BROWN, AND N. A. R. GOW. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **Mol. Microbiol**. 14:87–99, 1994.

IBRAHIM, A. S., S. G. FILLER, D. SANGLARD, J. E. J. EDWARDS, AND B. HUBE. Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. **Infect. Immun**. 66:3003–3005, 1998.

IMAI JK, SINGH G, CLEMONS KV, STEVENS DA. Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. **Antimicrob Agents Chemother**. 48: 4063-4066, 2004.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014, incidência de câncer no Brasil. (acesso em 2014). Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

INCA - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2012, incidência de câncer no Brasil. (acesso em 2013). Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2008. [acesso em 2009 dec. 11]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>

Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6a Ed. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer**; 2004.

IORIO MV, FERRACIN M, LIU CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res.** 65:7065–7070, 2005.

ISHIDA K., RODRIGUES J. C. F., RIBEIRO M. D., VILA T. V. M., SOUZA W., URBINA J. A., NAKAMURA C. V., ROZENTAL S. Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by 24(25)-sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. **BMC Microbiology.** 9:74, 2009.

ISLES, M.G., MCCONKEY, C. & MEHANNA, H.M. A systematic review and meta-analysis of the role of positron emission tomography in the follow up of head and neck squamous cell carcinoma following radiotherapy or chemoradiotherapy. **Clin. Otolaryngol.** 33, 210-222, 2008.

JESSUP, C. J.; RYDER, N. S.; GHANNOUM, M. A. Na evaluation of the in vitro activity of terbinafine. **Medical Mycology.** v.38, n.2, p.155-159, 2000.

JHAM, B. C., FREIRE, A. R. DA S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. **Rev Bras Otorrinolaringol.**72(5):704-8, 2006.

JOHNSON M. D., PLANTINGA T.S., VOSSE E., EDWARDS D.R.V., SMITH P. B., ALEXANDER B. D., YANG J. C., KREMER D., LAIRD G. M., OOSTING M., JOOSTEN L. A. B., MEER J. W. M., DISSEL J. T., WALSH T. J., PERFECT J. R., KULLBERG B-J., SCOTT W.K., and NETEA M. G. Cytokine Gene Polymorphisms and the Outcome of Invasive Candidiasis: A Prospective Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases.** 54(4):502–10, 2012.

JÚNIOR, A.A.V; MENEZES, E.A.; CUNHA, F.A; CUNHA M.C.S.O.; BRAZ, B.H.L; CAPELO L.G.; SILVA, C.L.F. Comparison of microdilution broth and disk diffusion for

antifungal susceptibility testing against *Candida* spp. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 33, n. 1, p. 135-142, 2012.

JUNQUEIRA J.C., VILELA S.F., ROSSONI R.D., BARBOSA J.O., COSTA A.C., RASTEIRO V.M., SULEIMAN J.M., JORGE A.O. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 54(1): 17-24, 2012.

KATSURAGI S., SATA M., KOBAYASHI Y., MIYOSHI T., YAMASHITA Y., NEKI R., HORIUCHI C., YAMANAKA K., KAMIYA C., IWANAGA N., TANAKA H., IKEDA T., YOSHIMATSU J. Antifungal Susceptibility of *Candida* isolates at One Institution. *Medical Mycology Journal*. v.55E, E1-E7, 2014.

KEATING, G. M.; JARVIS, B. Caspofungin. *Drugs*. v.61, n.4, p.1121-1129, 2001.

KINGNEL, S. E BIRMAN, E. G. Aspectos fúngicos do câncer bucal. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 46(3): 279-82, 2000.

KIRKPATRICK WR, MCATEE RK, FOTHERGILL AW, LOEBENBERG D, RINALDI MG, PATTERSON TF. Efficacy of SCH56592 in a rabbit model of invasive aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 44: 780-782, 2000.

KLEIN EA, THOMPSON IM JR, TANGEN CM, CROWLEY JJ, LUCIA MS, GOODMAN PJ, MINASIAN LM, FORD LG, PARNES HL, GAZIANO JM, KARP DD, LIEBER MM, WALTHER PJ, KLOTZ L, PARSONS JK, CHIN JL, DARKE AK, LIPPMAN SM, GOODMAN GE, MEYSKENS FL JR, BAKER LH: Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *Journal of the American Medical Association*. 306:1549–1556, 2011.

KOGA-ITO, CY ; LYON, J.P.; VIDOTTO, V. ; RESENDE, M.A de . Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia JCR*, v. 161, p. 219-223, 2006.

KONEMAN, E. W.; et al. Diagnóstico Microbiológico. São Paulo: **Médica e Científica**. 2011.

KONTOYIANNIS, D. P., M. A. LUNA, B. I. SAMUELS, AND G. P. BODEY. Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.** 14:721–739. 2000.

KOWALSI, L. P.; NISHIMOTO, I. N. Epidemiologia do Câncer de Boca. In: PARISE JUNIOR, Orlando. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: **SARVIER**, p.3-11, 2000.

KRCMERY V, LAHO L, HUTTOVA M, et al. Aetiology, antifungal susceptibility, risk factors and outcome in 201 fungaemic children: data from a 12-year prospective national study from Slovakia. **J Med Microbiol.** 51: 110-116, 2002.

KRCMERY V & KALAVSKY E. Antifungal discovery, six new molecules patented after 10 years of feast: why do we need new patented drugs apart from new strategies? *Recent Patents Anti-Infect Drug.* **Disc.** 2:182-187, 2007.

KUBISTA M.; ANDRADE J. M.; BENGTSSON M.; FOROOTAN A.; JONA´K J.; LIND K.; SINDELKA R.; SJO´BACK R.; SJO´GREEN B.; STRO´MBOM L.; STA´HLBERG A.; ZORIC N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine.** 27, 95-125, 2006.

KWONG J., FRANKY L. C., WONG K.-K. Inflammatory cytokine tumor necrosis factor  $\alpha$  confers precancerous phenotype in an organoid model of normal human ovarian surface epithelial cells. **Neoplasia**, vol. 11, no. 6, pp. 529–541, 2009.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N. **Tratado de Micologia Médica.** 9<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LALLA RV, LATORTUE MC, HONG CH. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. **Support Care Cancer.** 18:985–992, 2010.

LANCE, M.R.; WASHINGTON, C.; DAVIS, S.S. Structure and toxicity of amphotericin B/triglyceride emulsion formulations. **J. Antimicrob. Chemother.** v.36, n.1, p.119-128, 1995.

LANGLAIS RP, RENSBURG LJ, GUIDRY J, MOORE WS, MILES DA, NORTJÉ CJ. Magnetic resonance imaging in dentistry. **Dent Clin North Ame.** 44(2):411-26, 2000.

LASS-FLORL C, GRIFF K, MAYR A, PETZER A, GASTL G, BONATTI H, FREUND M, KROPSHOFER G, DIERICH MP, NACHBAUR D. Epidemiology and outcome of infections due to *Aspergillus terreus*: 10-year single centre experience. **Brit J Haematol.** 131:201-207, 2005.

LAVERDIERE M, HOBAN D, RESTIERI C, et al. In vitro activity of three new triazoles and one echinocandin against *Candida* bloodstream isolates from cancer patients. **J Antimicrob Chemother.** 50:119-123, 2002.

LECH-MARANDA E., BIENVENU J., MICHALLET A.S. et al., Elevated IL-10 plasma levels correlate with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma, **European Cytokine Network**, v. 17, no. 1, pp. 60–66, 2006.

LEE YC, ZUGNA D, RICHIARDI L, MERLETTI F, MARRON M, AHRENS W, POHLABELN H, LAGIOU P, TRICHOPOULOS D, AGUDO A, CASTELLSAGUE X, BETKA J, HOLCATOVA I, KJAERHEIM K, MACFARLANE GJ, MACFARLANE TV, TALAMINI R, BARZAN L, CANOVA C, SIMONATO L, CONWAY DI, MCKINNEY PA, THOMSON P, ZNAOR A, HEALY CM, MCCARTAN BE, BOFFETTA P, BRENNAN P, HASHIBE M. Smoking addiction and the risk of upper-aerodigestive-tract cancer in a multicenter case-control study. **Int J Cancer**; 133: 2688-2695, 2013.

LEE S. H., HONG H. S., LIU Z. X. TNF $\alpha$  enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 424, no. 1, pp. 58–64, 2012.

LEE EJ, GUSEV Y, JIANG J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. **Int J Cancer.** 120:1046–1054, 2007.

LEES, N.D.; BROUGUTON, M.C.; SANGLARD, D.; BARD, M. Azole susceptibility and hyphal formation in a cytochrome p-450 - deficient mutant of *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chimotherapy**. v.34, n.5, p.831-836, 1990.

LEITE M. C. P. – acesso 03 de julho 2009 <http://www.policlin.com.br/drpoli/132/>

LENZ M, GREESS H, BAUM U, DOBRITZ M, KERSTING-SOMMERHOFF B. Oropharynx, oral cavity, floor of the mouth: CT and MRI. **Eur J Radiol**. 33(3):203-15, 2000.

LI, X., YAN, Z. & XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**. 149, 353–362, 2003.

LIN AL, JOHNSON DA, SIMS CA, STEPHAN KT, YEH CK. Salivary gland function in HIV-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy (HAART). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 102:318–324, 2006.

LIN J., OH S-H., JONES R., GARNETT J.A., SALGADO P.S., RUSNAKOVA S., MATTHEWS S.J., HOYER L.L., and COTA E. The Peptide-binding Cavity Is Essential for Als3-mediated Adhesion of *Candida albicans* to Human Cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 289, NO. 26, pp. 18401–18412, June 27, 2014.

LOURENÇO S. Q. C., SCHUELER A. F., CAMISASCA D. R., LINDENBLATT R. C., BERNARDO V. G. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 53(3): 325-333, 2007.

LYMAN, C.A.; WALSH, T.J. Systemically administred antifungal agents. A review of their clinical pharmacology and therapeutic applications. **Drugs**. v.44, n. 1, p. 9-35, 1992.

MACHADO A.G., KOMIYAMA E.Y., SANTOS S.S.F., JORGE A.O.C., BRIGHENTI F.L., KOGA-ITO C.Y. *In vitro* adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**. v.19 no.4 Bauru July/Aug. 2011.

MAFF- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Nitrate, nitrite and N-nitroso compounds in Food : Second Report. **Food Surveillance**, 32: 1992.

MAGEE, P. N. e M., BARNES J. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **Br. J. Cancer.**, 10: 114, 1956.

MAGIĆ Z., SUPIĆ G., BRANKOVIĆ-MAGIĆ M., and JOVIC N., DNA methylation in the pathogenesis of head and neck cancer, in Methylation: From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment, **InTech**, 2013.

MAHMOUD, A. G; LOUIS, B.R. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** v.12, n.4, p.501-517, 1999.

MAHMOUDABADI A.Z., ZARRIN M., MIRY S. Phospholipase activity of *Candida albicans* isolated from vagina and urine samples. **Jundishapur Journal Microbiol.** 3(4): 169-73, 2010.

MAHNSS, B.; STHERR, F.; SCHAFER, W.; NEUBER, K. Comparison of standard phenotypic assays a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses.** v. 48(1):55-61, Jan. 2005.

MAIO R., BERTO J. C., CORRÊA C. R., CAMPANA A. O., PAIVA S. A. R. Estado Nutricional e Atividade Inflamatória no Pré-operatório em Pacientes com Cânceres da Cavidade Oral e Orofaringe. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 55(4): 345-353, 2009.

MAÑAS A.; CEREZO L.; TORRE A. DE LA; GARCÍA M.; ALBURQUERQUE H.; LUDEÑA B.; RUIZ A.; PÉREZ A.; ESCRIBANO A.; MANSO A.; GLARIA LA. Epidemiology and prevalence of oropharyngeal candidiasis in Spanish patients with head and neck tumors undergoing radiotherapy treatment alone or in combination with chemotherapy. **Clin Transl Oncol.** 14:740–746, 2012.

MARCHENA-GOMEZ J.; SAEZ-GUZMAN T.; HEMMERSBACH-MILLER M.; CONDE-MARTEL A.; MORALES-LEON V.; BORDES-BENITEZ A.; ACOSTA-MERIDA M. A. Candida Isolation in Patients Hospitalized on a Surgical Ward: Significance and Mortality-Related Factors. **World J Surg.** 33:1822-1829, 2009.

MAROL S. and YÜCESOY M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. Journal compilation; **Mycoses**. 51, 40–49, 2007

MATTEI A.S, ALVES S.H., SEVERO C.B., GUAZZELLI L.S., OLIVEIRA F.M. and SEVERO L.C. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 46(3): 340-342, May-Jun, 2013.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol. 454, no. 7203, pp. 428–435, 2008.

MEHROTRA, R. *et al.* Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. **Molecular Cancer**. v. 5, n. 11, 2006.

MEHROTRA R., GUPTA D. K. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. **Head Neck Oncol**. 3: 33, 2011.

MEILLER TF, HUBE B, SCHILD L, SHIRTLIFF ME, SCHEPER MA, Winkler R., Ton A, Jabra-Rizk M.A. A Novel Immune Evasion Strategy of *Candida albicans*: Proteolytic Cleavage of a Salivary Antimicrobial Peptide. **PLoS ONE** 4(4): 5039, 2009.

MELO A. U. C. & ROSA M. R. D. Nível de Informação e Comportamento Preventivo de Cirurgiões Dentistas e Usuários das Unidades Básicas de Saúde do Programa Saúde da Família de Aracajú-SE a Respeito de Câncer Bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 55(4): 405-406, 2009.

MEURMAN J.H. & UITTAMO J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. **Acta Odontologica Scandinavica**. 66: 321-326, 2008.

MISHRA M., AGRAWAL S., RAUT S., KURHADE A.M., POWAR R.M. Profile of yeasts isolated from urinary tracts of catheterized patients. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 8(2):44-46, Feb 2014.

MOCELLIN S, MARINCOLA FM AND YOUNG HA: Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. **Journal of Leukocyte Biology**. v.78: 1043-1051, 2005.

MOEN M. D., LYSENG-WILLIAMSON K. A. AND SCOTT L. J. Liposomal Amphotericin B A Review of its Use as Empirical Therapy in Febrile Neutropenia and in the Treatment of Invasive Fungal Infections. **Adis Drug Evaluation**. 69 (3): 361-392, 2009.

MOHAN das V and BALLAL M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Rev Iberoam Micol**; 25: 208-210, 2008.

MOHANDAS V., BALLAL M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of Global Infectious Disiases**. 3(1):4-8. Jan 2011.

MOHAN DAS V., BALLAL M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micología**. 25: 208-210, 2008.

MOKADDAS E., BURHAMAH MHA, KHAN ZU, AHMAD S. Levels of (1 $\alpha$ 3)-b-D-glucan, *Candida* mannan and *Candida* DNA in serum samples of pediatric cancer patients colonized with *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**. 10:292, 2010.

MORK, J. Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway - no good news. **Anticancer Res**. v. 18, n. 5B, p. 3705-3708, Sep-Oct 1998.

MORKS J., THORESEN S, FAYE-LUND H, LANGMARK F, GLATTRE E. Head and neck cancer in Norway. A study of the quality of the Cancer Registry of Norway's data on head and neck cancer for the period 1953-1991. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**. v. 103, n. 5 p. 375-382, May 1995.

MOUTON JW, VERWEIJ PE, WARN P, DENNING D, HEEP M, ISHAM N, et. al. *In vitro* activity of a new triazole BAL4815 against *Candida* isolates with decreased fluconazole susceptibility. **Mycoses**. 48: 58-59, 2005.

MURAKAMI Y, YASUDA T, SAIGO K, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. **Oncogene**. 25:2537–2545, 2006.

MURPHY, J.W.; FRIENDMAN, H.; BENDINELLI, M. Fungal Infections and Immune Responses. **Plenum Press**, New York, pp.574, 1993.

NAGLIK J. R., CHALLACOMBE S. J., AND HUBE B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, No. 3, p. 400–428, 2003.

NAGLIK J. R.; MOYES D.; MAKWANA J.; KANZARIA P.; TSICHLAKI E.; WEINDL G.; TAPPUNI A. R.; RODGERS C. A.; WOODMAN A. J.; CHALLACOMBE S. J.; SCHALLER M. and HUBE B. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. **Microbiology**. 154, 3266–3280, 2008.

NENOFF, P.; OSWALD, U.; HAUSTEIN, F. In vitro susceptibilidade of yeasts for fluconazole and itraconazole. Evaluation of a microdilution test. **Mycoses**. v.42, p. 629-639, 1999.

NEVILLE D.D.S., DAMM D.D.S., ALLEN M.S.D., BOUQUOT M.S.D. Patologia oral e maxilofacial. 1ª Edição. Rio de Janeiro: **Koogan**, pp. 158-164, 1998.

NEVILLE B.W., DAY T.A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J. Clin.**52, 195-215, 2002.

NORLING L. V. and SERHAN C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and proresolving mediators and signals for termination. **Journal of Internal Medicine**. v. 268, no. 1, pp. 15–24, 2010.

OLIVEIRA, E. E, SILVA, C. S., SOARES, A. J., ATTUX, C., CRUVINEL, B. e SILVA, M. R. R. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Cândida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 31(6):523-527, nov-dez, 1998.

OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odontol Scand**. v.48, p. 45-53, 1990.

ÖZCAN İ., ABACI Ö., UZTAN A. H., AKSU B., BOYACIOĞLU H., GÜNERI T, ÖZER Ö. Enhanced Topical Delivery of Terbinafine Hydrochloride with Chitosan Hydrogels. **AAPS PharmSci Tech**. v.10, n 3. Sept. 2009.

PAPPAS PG., REX JH., SOBEL JD., FILLER SG., DISMUKES WE., WALSH TJ., and EDWARDS JE. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis**. Jan 15; 38(2):161-189, 2004.

PARAKH A, DUBEY AP, SAMANTA D. Caspofungin. **Indian Pediatr**. 45: 905-910, 2008.

PARK S.; JEE SH.; SHIN H-R.; PARK EH.; SHIN A.; JUNG K-W.; HWANG S-S.; CHA ES.; YUN YH.; PARK SK.; BONIOL M.; BOFFETTA P. Attributable fraction of tobacco smoking on cancer using population-based nationwide cancer incidence and mortality data in Korea. **BMC Cancer**. 14:406, 2014.

PATEL SG, SHAH JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for an uniformity among diversity. **CA Cancer J Clin**. 55:242-58, 2005.

PELTROCHE-LLACSAHUANGA H, SCHNITZLER N, SCHMIDT S, TINTELNOT K, LÜTTICKEN R, HAASE G. Phagocytosis, oxidative burst, and killing of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by human neutrophils. **FEMS Microbiol Lett**. 1;191(1):151-5, 2000.

PFALLER MA, CASTANHEIRA M, LOCKHART SR, AHLQUIST AM, MESSER SA, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **Journal Clinical Microbiology**. 50: 1199-1203, 2012.

PFALLER M.A., ESPINEL-INGROFF A., CANTON E., CASTANHEIRA M., CUENCA-ESTRELLA M., DIEKEMA D.J., FOTHERGILL A., FULLER J., GHANNOUM M., JONES R.N., LOCKHART S.R., MARTIN-MAZUELOS E., MELHEM M.S., OSTROSKY-ZEICHNER L., PAPPAS P., PELAEZ T., PEMAN J., REX J., SZESZS M.W. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 6, p. 2040-2046, June 2012.

PFALLER MA, BOYKEN L, HOLLIS RJ, et al. In vitro susceptibility of invasive isolates of *Candida* spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance. **J Clin Microbiol**; 46 (1): 150-6, 2008.

PFALLER, M. A., and D. J. DIEKEMA. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin. Microbiol. Rev.** 20:133–163, 2007.

PFALLER M. A.; DIEKEMA D. J.; GIBBS D. L.; NEWEL V. A.; MEIS J. F.; GOULD I. M.; FU W.; COLOMBO A. L.; RODRIGUEZ-NORIEGA E. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2005: an 8.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species and Other Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 45, No. 6, p. 1735–1745, 2007.

PFALLER MA, MESSER SA, BOYKEN L, RICE C, TENDOLKAR S, HOLLIS RJ, et al. Cross-resistance between fluconazole and ravuconazole and the use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to ravuconazole among 12,796 clinical isolates of *Candida* spp. **J Clin Microbiol**. 42: 3137–3141, 2004.

PARKIN D.M; BRAY F.I; DEVESA S.S. Cancer burden in the year 2000. The global picture. **Eur J Cancer**. Oct;37 Suppl 8:S4-66, 2001.

PIMENTA, FLÁVIO JULIANO GARCIA SANTOS. Análise molecular do gene *WWOX* no carcinoma de células escamosas da cavidade bucal. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, 2005.

POLAK, A. Virulence of *Candida albicans* mutants. **Mycoses**. v.35, p.9-16, 1992.

POPA C., NETEA M. G., VAN RIEL P. L. C. M., VAN DER MEER J. W. M., and STALENHOEF A. F. H., The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, vol. 48, no. 4, pp. 751–762, 2007.

POWER EG. RAPD typing in microbiology--a technical review. **J Hosp Infect**. v. 34(4):247-65, Dec. 1996.

PRADO, R. F. e TAVEIRA, L.A. de A. Nicotina Na Carcinogênese Química Bucal. **Revista Brasileira de Patologia Oral**. 2: 24, 2003.

PRAGATI B. HEBBAR, ANURADHA PAI, and SUJATHA D. Mycological and histological associations of *Candida* in oral mucosal lesions. **Journal of Oral Science**. v. 55, No. 2, 157-160, 2013.

PREMKUMAR J., RAMANI P., CHANDRASEKAR T., NATESAN A., PREMKUMAR P. Detection of species diversity in oral candida colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**. v. 5(1):148-54, January 2014.

PUC CETTI, P., A. MENCACCI, E. CENCI, R. SPACCAPELO, P. MOSCI, K. H. ENSSLE, L. ROMANI, AND F. BISTONI. Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. **J. Infect. Dis**. 169:1325, 1994.

PUC CETTI, P., L. ROMANI, AND F. BISTONI. A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. **Trends Microbiol**. 3:237–240, 1995.

QUEIROZ, REJANE CHRISTINE. Validade e confiabilidade das declarações de óbito por câncer de boca no Município do Rio de Janeiro. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional De Saúde Pública, Departamento De Epidemiologia, 2002 .

RAAD, II, HACHEM RY, HERBRECHT R, GRAYBILL JR, HARE R, CORCORAN G, *et al.* Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. **Clin Infect Dis.** 42: 1398-1403, 2006.

RAGUNATHAN L., POONGOTHAI G.K., SINAZER A.R., KANNAIYAN K., GURUMURTHY H., JAGET N., KUTHALARAMALINGAM S. Phenotypic Characterization and Antifungal Susceptibility Pattern to Fluconazole in *Candida* species Isolated from Vulvovaginal Candidiasis in a Tertiary Care Hospital. **Journal of Clinical & Diagnostic Research.** 8(5): DC01-4, May 2014.

RAHMAN F, TIPPU SR, KHANDELWAL S, GIRISH KL, MANJUNATH BC, BHARGAVA A. A study to evaluate the efficacy of toluidine blue and cytology in detecting oral cancer and dysplastic lesions. **Quintessence Int.** Jan;43(1):51-59, 2012.

RAMIREZ-GARCIA A., REMENTERIA A., AGUIRRE-URIZAR JM., MORAGUES MD., ANTORAN A., PELLON A., ABAD-DIAZ-DE-CERIO A. AND HERNANDO FL. *Candida albicans* and cancer: Can this yeast induce cancer development or progression? **Critical Reviews in Microbiology.** Early Online: 1–13, 2014.

RAVERA, M.; REGGIORI, A.;AGLIATA, A.M.; ROCCO, R.P. Evaluating diagnosis and treatment of oral and esophageal candidiasis in Ugandan AIDS patients. **Emerg Infect Dis.** v.5, n.2, p.274-277, 1999.

REGEZI, J. A., AND J. J. SCIUBBA. White lesions, p. 83–121. In J. A. Regezi and J.J. Sciubba (6<sup>a</sup> ed.), **Oral pathology: clinical pathologic correlations**, 3rd ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pa, 1999.

REX J.H., PFALLER M.A., WALSH T.J, CHATURVEDI V., ESPINEL-INGROFF A., GHANNOUM M.A., GOSEY L.L., ODDS F.C., RINALDI M.G., SHEEHAN D. J., AND WARNOCK D.W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.** 14:643– 658, 2001.

RIBEIRO, E.L; CAMPOS, C.C; CARDOSO, C.G; FERREIRA, W.M; PIMENTA, F.C; TOLEDO, O.A. *Candida albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down:

comportamento de tubos germinativos, exoenzimas e sensibilidade a toxinas “killer”. **Revista Odonto Ciência** – Faculdade Odonto/PUCRS. v.22, n.57: 243-249, 2007.

ROCO PEREZ, O. G.; ARREDONDO LOPEZ, M.; ALVAREZ NAVARRO, M. D. C. Citología exfoliativa en el diagnóstico precoz de lesiones oncológicas bucales. **Rev Cubana Estomatol**, v. 39, n. 2, p. 89-100, 2002.

RHODUS NL, HO V, MILLER CS, MYERS S, ONDREY F. NF-kappab dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Detect Prev**. 29 (1): 42-5, 2005.

ROILIDES, E., A. ANASTASIOU-KATSIARDANI, A. DIMITRIADOU-GEORGIADOU, I. KADILTSOGLU, S. TSAPARIDOU, C. PANTELIADIS, AND T. J. WALSH. Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. **J. Infect. Dis**. 178:1734–1742, 1998.

ROMANI, L., BISTONI F., and PUCCETTI P. Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. **Chem. Immunol**. 68:110–135, 1997.

ROMANI, L., A. MENCACCI, E. CENCI, P. PUCCETTI, AND F. BISTONI. Neutrophils and the adaptive immune response to *Candida albicans*. **Res. Immunol**. 147:512–518. 1996.

ROMANI, L., E. CENCI, A. MENACCI, F. BISTONI, AND P. PUCCETTI. T helper cell dichotomy to *Candida albicans*: implications for pathology, therapy, and vaccine design. **Res. Immunol**. 14:148–162, 1995.

ROMANI, L., BISTONI F., MENCACCI A., CENCI E., SPACCAPELO R., and PUCCETTI P. IL12 in *Candida albicans* infections. **Res. Immunol**. 146:532–538, 1995.

ROSSELLÓ-MORA R, AMANN R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev**. v. 25(1):39-67, Jan 2001.

ROUTH MM, CHAUHAN NM, KARUPPAYIL SM. Cancer drugs inhibit morphogenesis in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology** 44, 3, 855-859, 2013.

RUBIRA C. M. F., DEVIDES N. J., ÚBEDA L. T., BORTOLUCCI JR A. G., LAURIS J. R., RUBIRA-BULLEN I. R. F., DAMANTE JH. Evaluation of some oral postradiotherapy sequelae in patients treated for head and neck tumors. **Braz Oral Res**; 21(3):272-272, 2007.

RYDER, N. S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 1998. v.42, n.5, p.1057-1061.

SAHEBJAMEE M, ESLAMI M, ATARBASHIMOGHADAM F, SARAFNEJAD A. Salivary concentration of TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$ , IL6, and IL8 in oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. May 1;13(5):E292-5, 2008.

SAMARANAYAKE Y.H., SAMARANAYAKE L.P., DASSANAYAKE R.S., YAU J.Y. Y., TSANG W.K., CHEUNG B.P. K. and YEUNG K.W. S. Genotypic shuffling? of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52, 349-359, 2003.

SAMARANAYAKE LP & MACFARLANE TW. Textbook of oral candidiasis. Editora Wright, 1990.

SANDOVAL-DENIS M., PASTOR F.J., CAPILLA J., SUTTON D.A., FOTHERGILL A.W., GUARRO J. In vitro pharmacodynamics and in vivo efficacy of fluconazole, amphotericin B and caspofungin in a murine infection by *Candida lusitaniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 43, Issue 2, Pages 161-164, February 2014.

SANJAYA P.R., GOKUL S., PATIL B. G, RAJU R. Candida in oral pre-cancer and oral câncer. **Medical Hypotheses**. 77, 1125–1128, 2011.

SAPP, J. P.; EVERSOLE, L. R.; WYSOCKI, G. P. Epithelial disorders. In: **Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology**. 1.ed. St. Louis: Mosby, p.174-182, 1997.

SARDI J.C.O., SCORZONI L., BERNARDI T., FUSCO-ALMEIDA A.M., AND GIANNINI M.J.S., *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, no. 1, pp. 10-24, 2013.

SCHALLER M., BOELD U., OBERBAUER S., HAMM G., HUBE B. & KORTING H. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. **Microbiology**. 150, 2807-2813, 2004.

SCHILLING A.; SEIBOLD M.; MANSMANN V.; & GLEISSNER B.. Successfully treated *Candida krusei* infection of the lumbar spine with combined caspofungin/posaconazole therapy. **Medical Mycology**. February, 46, 79-83, 2008.

SCHMITT-HOFFMANN A, ROOS B, HEEP M, SCHLEIMER M, WEIDEKMAN E, BROWN T, *et al.* Single ascending-dose pharmacokinetics and safety of the novel broad-spectrum antifungal triazole BAL4815 after intravenous infusions (50, 100 and 200 milligrams) and oral administrations (100, 200 and 400 milligrams) of its prodrug BAL8557, in healthy volunteers. **Antimicrob Agent Chemother**. 50: 279-285, 2006.

SCHOOFF N.I.L.S., FRANKLIN J., FÜRST R., ZANDER T., VON BONIN F., PEYRADE F., TRÜMPER L., DIEHL V., ENGERT A., KUBE D., RE D. Interleukin-10 Gene Polymorphisms are Associated With Freedom From Treatment Failure for Patients With Hodgkin Lymphoma. **The Oncologist**. v. 18:80–89, 2013.

SCHWARTZ, G. J.; *et al.* Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head Neck**. v. 22, n. 1, p. 34-41, Jan 2000.

SCHWARZMÜLLER T., MA B., HILLER E., ISTELE F., TSCHERNER M., BRUNKE S., AMES L., FIRON A., GREEN B., CABRAL V., MARCET-HOUBEN M., JACOBSEN I.D., QUINTIN J., SEIDER K., FROHNER I., GLASER W., JUNGWIRTH H., BACHELLIER-BASSI S., CHAUVEL M., ZEIDLER U., FERRANDON D., GABALDÓN T., HUBE B., D'ENFERT C., RUPP S., CORMACK B., HAYNES K., KUCHLER K. Systematic phenotyping of a large-scale *Candida glabrata* deletion collection reveals novel antifungal tolerance genes. **PLoS Pathogens**. 19;10(6):e1004211, Jun 2014.

SCULLY C, EL-KABIR M, SAMARANAYAKE LP. *Candida* and oral candidosis: a review. **Crit Rev Oral Biol Med.** 5, 125-157, 1994.

SEGAL BH, WALSH TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. **Am J Respir Crit Care Med.** 173:707-717, 2006.

SETTANNI L., CORSETTI A. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. **Journal of Microbiological Methods.** v. 69, Issue 1, Pages 1–22, April 2007.

SETTANNI,G., RAO F., and CAFLISCH A. Value analysis by molecular dynamics simulations of reversible folding. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** v. 102, 628–633, January 2005.

SHEEHAN, D.J, HITCHCOCK, C.A, SIBLEY, C.M, Current and Emerging Azole Antifungal Agents. **Clinical Microbiology Research.** v. 12, n.1, p.40-79, 1999.

SILVA M.C.; MARQUES E. B.; MELO L.C.; BERNARDO J. M. P.; LEITE I. C. G.; Fatores Relacionados ao Atraso no Diagnóstico do Câncer de Boca e Orofaringe em Juiz de Fora/MG. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 55(4), 329-335, 2009.

SILVERMAN, JR. S.; EVERSOLE, L. R.; TRUELOVE, E. L. Fundamentos de medicina oral. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.** 384 p, 2004.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. M.; SMEJKAL W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. **Cancer.** v. 6, n. 5, p. 963-968, Sep 1953.

SOBEL JD, KAPERNICK PS, ZERVOS M *et al.* Treatment of complicated *Candida* vaginitis: Comparison of single and sequential doses of fluconazole. **Am J Obstet Gynecol.** 185: 363-369, 2001.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 178:203-211, 1998.

SOMI MH., GOLZARI M.; FARHANG S., NAGHASHIIS., ABDOLLAHI L. Gastrointestinal Cancer Incidence in East Azerbaijan, Iran: Update on 5 Year Incidence and Trends. **Asian Pac J Cancer Prev**, 15 (9), 3945-3949, 2014.

SPOLIDORIO, D. M. P.; SPOLIDORIO, L. C.; BARBEIRO, R. H.; HÖFLING, J. F.; BERNARDO, W. L. C.; PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida* spp. e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. **Pesqui Odontol Bras.** v. 15, n. 4, p. 354-358, out./dez. 2001.

STAAB, J.F.;BRADWAY, S.D.; FIDEL, P.L.; SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science.** v.283, n.5407, p.1535-1538, 1999.

STAIB, F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. **Sabouraudia** 4:187–193. 1965.

STANILOV N., MITEVA L., DELIYSKY T., JOVCHEV J. and STANILOVA S. Advanced colorectal cancer is associated with enhanced IL-23 and IL-10 serum levels. **Lab Med.** 41: 159-163, 2010.

STEINBACH WJ, BENJAMIN DK. New antifungal agents under development in children and neonates. **Curr Opin Infect Dis.** 18: 484-489, 2005.

STEWART B.W., KLEIHUES P., editors. World cancer report. **Lyon: International Agency for Research on Cancer Press.** 2003.

STRINGARO, A., P. CRATERI, G. PELLEGRINI, G. ARANCIA, A. CASSONE, AND F. DE BERNARDIS. Ultrastructural localization of the secretory aspartyl proteinase in *Candida albicans* cell wall *in vitro* and in experimentally infected rat vagina. **Mycopathologia.** 137:95-105, 1997.

SUÁREZ V. L. & ANDREU C. M. F. Susceptibilidad *in vitro* de aislamientos vaginales de *Candida* frente a clotrimazol y nistatina. **Rev Cubana Med Trop**55(3):138-45, 2003.

SZLOSAREK P., CHARLES K. A., and BALKWILL F.R.. Tumour necrosis factor- $\alpha$  as a tumour promoter. **European Journal of Cancer**, vol. 42, no. 6, pp. 745–750, 2006.

TANG HJ, LIU WL, LIN HL, LAI CC. Epidemiology and Prognostic Factors of Candidemia in Cancer Patients. **PLoS ONE** 9(6): e99103, 2014.

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Atiinfeciosos. São Paulo, Ed. **Atheneu**, 1º ed., 1993.

TEIXEIRA AKM.; ALMEIDA MEL.;; HOLANDA ME.;; SOUSA FB.;; ALMEIDA PC. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal: um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 55(3): 229-236, 2009.

TESTINO G.; Borro P. Alcohol and gastrointestinal oncology. **World J Gastrointestinal Oncology**. 15; 2(8): 322-325, August 2011.

TESTINO G. The Burden of Cancer Attributable to Alcohol Consumption. **A Journal of Clinical Medicine**, v. 6 No.4, p.313-320, 2011.

TILLONEN J, HOMANN N, RAUTIO M, JOUSIMIES-SOMER H, SALASPURO M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanolassociated oral cavity cancer. **Alcoh Clin Exp Res**. 23: 1409-15, 1999.

TONG AW. Small RNAs and non-small cell lung cancer. **Curr Mol Med**. 6:339-349, 2006.

TONNETTI, L., R. SPACCAPELO, E. CENCI, A. MENCACCI, P. PUC CETTI, R. L. COFFMAN, F. BISTONI, AND L. ROMANI. Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. **Eur. J. Immunol**. 25:1559-1565, 1995.

TOPETE E. G. B; VALENCIA M. G. Evaluación de la eficacia de la combinación de ketoconazol/clindamicina comparada con metronidazol/nistatina en vaginitis candidiásica y vaginosis bacteriana. **Ginecología y obstetricia de méxico**. v. 72, n. 11, 2004.

TROST, A., GRAF B, EUCKER J, SEZER O, POSSINGER K, GÖBEL UB, ADAM T. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. **Journal of Microbiology Methods**. v. 56, p. 201-211. 2004.

VANDEN BOSSCHE, H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO-CHIU, M.; REX, J.H.; SANGLARD, D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Medical Mycology**. v.36, suppl. 1, p. 119-128, 1998.

VERSTREPEN, K. J. & KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Mol Microbiol**. 60, 5-15, 2006.

VIJAYA D., DHANALAKSHMI T.A., KULKARNIIS. Changing trends of vulvovaginal candidiasis. **Journal Laboratoty Physicians**. 6(1):28-30, Jan 2014.

VISONE R, PALLANTE P, VECCHIONE A, et al. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. **Oncogene**. 26:7590-7595, 2007.

VOLLMER W., BLANOT D. & PEDRO M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiol Rev**. v. 32, 149-167, 2008.

Xi, S.; GRANDIS, J. R. Gene therapy for the treatment of oral squamous cell carcinoma: review. **J Dent Res**. v. 82, n. 1, p. 11-16, Jan 2003.

WANG B., LI ., LIAO Y., LI J., YU X., ZHANG Y., XU J., RAO H., CHEN S., ZHANG L., ZHENG L. Mast cells expressing interleukin 17 in the muscularis propria predict a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**. Published online: 03 August 2013.

WANG Y., LIU X-H., LI Y-H. and LI O. The paradox of IL-10-mediated modulation in cervical cancer (Review). **BIOMEDICAL REPORTS**. 1: 347-351, 2013.

WANLU L., LIBING L., YUN F., JIAO C., YAN L., XIANGLI K., SIXIU C., XIAOY. L., QIANMING C. and PING Z. Inflammation promotes oral squamous carcinoma immune

evasion via induced programmed death ligand-1 surface expression. **ONCOLOGY LETTERS** 5:1519-1526, 2013.

WICKI A., HAGMANN J. Diet and cancer. **The European Journal of Medical Sciences**. 141:w13250, 2011.

WILLE MP., GUIMARÃES T., FURTADO GHC., COLOMBO AL. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. v. 108(3): 288-292, May 2013.

WILLIAMSON D.M. Chronic hyperplastic candidiasis and squamous carcinoma. **Br. J. Dermatol.**v.8, 125-127, 1969.

YANG, X.O., PANOPOULOS, A.D., NURIEVA, R., CHANG, S.H., WANG, D., WATOWICH, S.S., and DONG, C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. **J. Biol. Chem.** 282, 9358–9363, 2008.

YASHAVANTH R., SHIJU M.P., BHASKARU.A., RONALD R., ANITA K.B. Candiduria: Prevalence and Trends in Antifungal Susceptibility in A Tertiary Care Hospital of Mangalore. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 7(11): 2459-2461, Nov 2013.

YEN T, CHANG J, CHANG Y, WANG H, SEE L, CHEN T, et al. Staging of untreated squamous cell carcinoma of buccal mucosa with 18 FDG PET: comparison with head and neck CT/MRI and histopathology. **J Nucl Med**. 46(5):775-81, 2005.

YILDIRIM M.; SAHIN I.; KUCUKBAYRAK A.; OZDEMIR D.; M. YAVUZ T.; OKSUZ S. and CAKIR S. Hand carriage of *Candida* species and risk factors in hospital personnel. J Compilation. **Mycoses**. 50, 189-192, 2007.

YOKOYAMA, K.; BISWAS, S.K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Identification and Phylogenetic Relationship of the Most Common Pathogenic *Candida* Species Inferred from Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Sequences. **J Clin Microbiol**. v.38, n.12, p. 4503-4510, 2000.

WALSH TJ, LUTSAR I, DRISCOLL T, DUPONT B, RODEN M, GHAHRAMANI P, *et al.* Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. **Pediatr Infect Dis J.** 21: 240-248, 2002.

WARD E. Addressing nutritional gaps with multivitamin and mineral supplements. **Nutrition Journal.** 13:72, 2014.

WEBER A, ROMO L, HASHMI S. Malignant tumors of the oral cavity and oropharynx: clinical, pathologic and radiologic evaluation. **Neuroimaging Clin N Am.** 13(3):443-64, 2003.

WHITE, T. C., AND N. AGABIAN. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **J. Bacteriol.** 177:5215-5221, 1995.

World Health Organization. Cancer. Fact sheet N°297. February 2006. [homepage on the Internet]. Geneva: World Health Organization; c2007 [cited 2007 oct. 10]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html>.

ZAMARRON B. F. and CHEN W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. **International Journal of Biological Sciences.** v. 7, no. 5, pp. 651- 658, 2011.

ZARDO, V., MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* spp. **NewsLab** - edição 63, 2004.

ZHU Q.C., GAO R.Y., WU W., GUO B.M., PENG J.Y., QIN H.L. Effect of a high-fat diet in development of colonic adenoma in an animal model. **World Journal Gastroenterol.** V.7; 20(25): 8119-8129, July 2014.

**9 ANEXO 1****Ficha do paciente**

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_ Tabagismo: \_\_\_\_\_ Álcool: \_\_\_\_\_

Hipertensão: \_\_\_\_\_ Diabetes: \_\_\_\_\_ Alergia: \_\_\_\_\_

Imunidade: \_\_\_\_\_ Medicação: \_\_\_\_\_

Condições de saúde bucal:

Uso de prótese Total Superior ( ) Total Inferior ( )

Uso de prótese Parcial Superior ( ) Parcial Inferior ( )

Dentição completa: Sim ( ) Não ( )

História da doença:

Tipo de lesão: \_\_\_\_\_ Localização: \_\_\_\_\_

Linfonodos: \_\_\_\_\_ Candidose: \_\_\_\_\_

Diagnóstico clínico e classificação TNM:

Diagnóstico histopatológico:

Tratamento: \_\_\_\_\_ Prognóstico: \_\_\_\_\_

**10 ANEXO 2**

**QUESTIONÁRIO PADRONIZADO - GRUPO CONTROLE**  
**ESTUDO PARA COMPARAR O POTENCIAL AGREÇOR DAS LEVEDURAS DO GÊNERO**  
***Candida* ENTRE OS PACIENTES QUE APRESENTAM CÂNCER E OS PACIENTES**  
**SAUDÁVEIS**

*(a ser preenchido pelo entrevistado ou pelo entrevistador)*

Código Individual:

Entrevistador:

Data da entrevista:

Por favor, responda o máximo de questões possíveis marcando nos quadrados disponíveis. Se você não tem certeza o que responder a uma determinada pergunta, não se preocupe, apenas deixa-a em branco. O coordenador da pesquisa irá auxiliá-lo com as questões deixadas em aberto. Por favor, preencha o questionário em letras maiúsculas.

1. Informações biográficas básicas

1.1- Sexo

Masculino            \_\_\_1

Feminino             \_\_\_2

1.2- Data de nascimento

Dia: \_\_\_\_\_ Mês: \_\_\_\_\_ Ano: \_\_\_\_\_

1.3- Local de nascimento

Município/Estado/Pais: \_\_\_\_\_

Para ser preenchido pelo entrevistador: CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

1.4- Profissão: \_\_\_\_\_

2. Informações básicas de saúde (Baseado no SF-36)

As questões a seguir se referem ao seu estado de saúde e como você se sente em relação a vida que leva em geral. Se você ficar em dúvida sobre alguma das perguntas, tente pensar sobre como se sente com relação a sua saúde e a sua vida e tente responder da melhor maneira passível. No entanto, não gaste muito tempo pensando no assunto porque a melhor resposta é exatamente a mais imediata.

2.1- Problemas de saúde e doenças

2.2- Quais dos seguintes problemas de saúde/doenças você tem?

	Sim	Não	Idade de início
a. Alguma dificuldade visual	__1	__2	_____
b. Alguma dificuldade de audição	__1	__2	_____
c. Doenças neurológicas (Parkinson, etc)	__1	__2	_____
d. Doenças cardíacas	__1	__2	_____
1. Angina	__1	__2	_____
2. Batimentos cardíacos irregulares	__1	__2	_____
3. Insuficiência cardíaca	__1	__2	_____
e. Pressão alta (hipertensão tratada com medicamentos)	__1	__2	_____
f. Varizes ou úlceras nas pernas	__1	__2	_____
g. Dores nas pernas durante a caminhada	__1	__2	_____
h. Doenças respiratórias crônicas (DPOC/asma)	__1	__2	_____
i. Insuficiência renal	__1	__2	_____
j. Colesterol alto	__1	__2	_____
k. Diabetes	__1	__2	_____
l. Hipertireoidismo	__1	__2	_____
m. Hipotireoidismo	__1	__2	_____
n. Doença autoimune (Lupus, esclerose múltipla, etc)	__1	__2	_____
o. Cirrose hepática	__1	__2	_____
p. Osteoporose	__1	__2	_____
q. Artrite (incluindo artrite óssea ou reumatismo)	__1	__2	_____
1. dor nas costas	__1	__2	_____
2. dor em diferentes locais - no momento	__1	__2	_____
Por mais de 3 meses	__1	__2	_____
r. Problemas sérios de memória (por ex. demência)	__1	__2	_____
s. Outros problemas mentais	__1	__2	_____
t. Já se submeteu a qualquer um dos seguintes procedimentos cirúrgicos: ponte safena, angioplastica coronariana, cirurgia de artérias, colocação de marca passo.	__1	__2	_____

2.3- Você já teve alguma das seguintes doenças?	Sim	Não	Idade (1° vez)
a. Pneumonia	__1	__2	_____
b. Infarto do miocárdio	__1	__2	_____
c. Derrame cerebral (hemorragia, isquemia)	__1	__2	_____
d. Tumor maligno (câncer)	__1	__2	_____
e. Fratura do quadril	__1	__2	_____
f. Para as mulheres: diabetes durante a gravidez	__1	__2	_____
g. Para as mulheres: aborto espontâneo	__1	__2	_____

2.4- Você tem alguma das doenças mencionadas no momento atual?

    Sim       \_\_1

    Não       \_\_2

Se sim, especifique qual: \_\_\_\_\_

2.5- Você foi hospitalizado nos últimos 12 meses?

    Sim       \_\_1

    Não       \_\_2

Se sim, especifique quantas vezes: \_\_\_\_\_

Se sim, você se submeteu a alguma cirurgia?

Sim \_\_\_1

Não \_\_\_2

Se sim, especifique qual: \_\_\_\_\_

### 3. Tratamentos e medicamentos

3.1- Você usa algum medicamento regularmente?

Sim \_\_\_1

Não \_\_\_2

Se sim, preencha o esquema abaixo:

Nome do medicamento	Para qual doença	Código ATC (a ser preenchido pelo entrevist.)
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

3.2- Durante a última semana, você tomou algum antibiótico, corticóide ou antiinflamatório?

Sim \_\_\_1

Não \_\_\_2

Se sim, especifique qual: \_\_\_\_\_

### 4. Hábitos Comuns

#### 4.1- Fumo

- a. Você fuma atualmente ? Sim \_\_\_1 Não \_\_\_2
- b. Você já fumou? Sim \_\_\_1 Não \_\_\_2  
Se sim, quando você parou de fumar? Ano: \_\_\_\_\_
- c. Por quantos anos você fumou? Número de anos: \_\_\_\_\_
- d. Quantos cigarros/dia você fumou ou fuma ainda? \_\_\_\_\_

#### 4.1- Alimentação

4.1.1- Quais das seguintes bebidas você consome e quantos copos por dia ou por semana?

	Por dia	Por semana	Por mês	Nunca
a - água	_____	_____	_____	_____
b - suco	_____	_____	_____	_____
c - refrigerante	_____	_____	_____	_____
d - cerveja	_____	_____	_____	_____
e - cachaça ou destilado	_____	_____	_____	_____
f - vinho	_____	_____	_____	_____
g - outra bebida alcóolica	_____	_____	_____	_____

**11 Anexo 3:**

Avaliação nutricional dos pacientes com câncer orogástrico.

Identificação do paciente:

Nome: \_\_\_\_\_ Data da avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Cor:  L  F  I

Examinador: \_\_\_\_\_

**A. História****1. Peso**

Peso Habitual: \_\_\_\_\_ Kg

Perdeu peso nos últimos 6 meses?  Sim  Não  Desconhecido

Quantidade perdida: \_\_\_\_\_ Kg

Nas últimas 2 semanas:  continua perdendo  estável  engordou

**2. Ingestão alimentar em relação habitual**

1=sem alterações 2=houve alterações Se houve, há quanto tempo:  as

Se houve, para dieta  1=sólida, em menor quantidade 2=líquida completa 3=líquida restrita 4=jejum

**3. Sintomas gastrointestinais presentes há mais de 15 dias**

1=Sim 2=Não Falta de apetite  1=Sim 2=Não Náuseas  1=Sim 2=Não

Vômitos  1=Sim 2=Não

Diarréia, acima de 3 evacuações líquidas por dia  1=Sim 2=Não

**4. Capacidade funcional**

1=Sem disfunção 2=Com disfunção Se alterada, há quanto tempo:  dias

Tipo de disfunção:  1=trabalho sub-ótimo 2=tratamento ambulatorial 3=acamado

**5. Doença principal e sua relação com as necessidades nutricionais**

Diagnóstico(s) Principal(is): \_\_\_\_\_

Demanda metabólica:  1=baixo stress   2=stress moderado   3=stress elevado

---

## **B. Exame físico**

Para cada item dê um valor

0 = normal

1 = leve

2 = moderada

3 = importante

Perda de gordura subcutânea (tríceps e tórax)

Perda muscular (quadríceps e deltóide)

Presença de edema maleolar (pernas)

Presença de edema pré-sacral

Presença de ascite

---

## **C. Avaliação subjetiva**

Resultado Final:

1= Nutrido

2= Suspeita de desnutrição ou moderadamente desnutido

3= desnutrido grave