

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES  
DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

**GISELLE DINIZ GUIMARÃES SIQUEIRA**

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA* EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO  
ESTADO DO AMAZONAS**

**MANAUS-AM**

**2021**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ - FIOCRUZ**  
**INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE – ILMD**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES DE**  
**SAÚDE NA AMAZÔNIA**

**GISELLE DINIZ GUIMARÃES SIQUEIRA**

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA* EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA**  
**E PESCOÇO TRATADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO ESTADO DO**  
**AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, na linha de Pesquisa Fatores sócio biológicos no processo saúde-doença na Amazônia.

**MANAUS-AM**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S618f

Siqueira, Giselle Diniz Guimarães

Fatores de virulência de *Candida* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados em um centro de referência do estado do Amazonas. / Giselle Diniz Guimarães Siqueira. - Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

90 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2021.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes.

1. Candida 2. Neoplasias de cabeça e pescoço I. Título

CDU 616-006.6:616.314(811.3) (043.3)

CDD 616.969098113

22. ed.

**Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos – Bibliotecário CRB-11 N° 287**

**GISELLE DINIZ GUIMARÃES SIQUEIRA**

**FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA* EM PACIENTES COM CÂNCER DE  
CABEÇA E PESCOÇO TRATADOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DO  
ESTADO DO AMAZONAS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública, na linha de Pesquisa Fatores sócio biológicos no processo saúde-doença na Amazônia.

**Aprovada em:** 22/03/2021

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes - Orientadora  
ILMD/FIOCRUZ

Prof. Dr. Lioney Nobre Cabral  
UEA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ani Beatriz Jackisch Matsuura  
ILMD/FIOCRUZ

*A Deus, meus pais, irmãs, avó e marido que me  
impulsionam a seguir em frente, são minha base, meu alicerce.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo direcionamento à oportunidade de ingresso e conclusão do curso de Mestrado, sem ele nada seria possível.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia, funcionários da secretaria e Posgrad que sempre se prontificaram ao auxílio das atividades durante todo o curso, aos demais funcionários, funcionários do laboratório em especial a técnica Rejane que com paciência prestou auxílio durante as atividades laboratoriais. Ao Sr. Ícaro, bibliotecário, que prontamente prestou auxílio nas pesquisas bibliográficas. A todos os professores que, com maestria, conduziram as disciplinas e contribuíram nos orientando, em especial à Profa. Dra. Maria Luiza Garnelo Pereira.

Ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia (PPGVIDA) pela oportunidade no desenvolvimento dessa pesquisa e capacitação profissional.

Ao laboratório Diversidade Microbiana da Amazônia com Importância para a Saúde (DMAIS) pelo acolhimento e apoio nas atividades da pesquisa.

Às colegas de laboratório, Dani, Taiana, Marla, Maria Júlia, Josy, Ellen e Clarice pela ajuda e disponibilidade sempre que solicitado.

À Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) que autorizou o desenvolvimento deste trabalho em suas dependências, a todos os funcionários do setor de radioterapia pelo auxílio na captação dos pacientes em especial Dona Socorro e Sr. Elio. Ao Dr. Leandro Baldino pela aprovação do desenvolvimento da pesquisa no setor de radioterapia.

A Vinícius e Tayana (UEA/Fundação de Medicina Tropical) pela parceria durante a captação e coleta das amostras dos pacientes na FCECON e também pela troca de conhecimentos.

Aos colegas da turma PPGVIDA 2018 que dividiram sentimentos de felicidade e angústias, solidarizando-se uns com os outros. Muito obrigada pela união e parceria durante os choros e risos. Em especial à colega Anne Beatriz, sempre solícita a todos os colegas de turma; obrigada pela ajuda quando o assunto era tecnologia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo aporte financeiro à pesquisa, pela concessão da bolsa de mestrado, pelas passagens e diárias para participação de cursos; muito obrigada pelas oportunidades.

Aos professores Dra. Suanni Lemos de Andrade, Dr. Fernando José Herkrath e Dr. Lioney Nobre Cabral pela contribuição de conhecimentos e sugestões durante a qualificação.

À minha querida orientadora, Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, pela orientação, compreensão, paciência, apoio e incentivo. Muito obrigada pelo aceite em orientar-me e por permitir-me, pela primeira vez, a experiência em micologia médica, métodos de cultivo e biologia molecular; a rotina de laboratório proporcionou-me, sem dúvida, um crescimento como pesquisadora e profissional.

À minha coorientadora, Dra. Lia Mizobe Ono, pelo vasto conhecimento transmitido sobre a odontologia hospitalar e a condução de casos de manifestações bucais decorrentes da radioterapia, exemplo de profissional dedicada aos pacientes.

À Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura que, durante as idas ao laboratório, estava sempre disponível ao esclarecimento de dúvidas dando sugestões quanto à melhor condução das atividades.

A todos os professores desde o ciclo básico de educação, professores da graduação em especial Prof. Dr. Lioney Nobre Cabral, meu exemplo de profissional na odontologia e Prof. Dr. Tiago Novaes Pinheiro que foi quem me iniciou na pesquisa científica e quem me despertou o interesse pela oncologia.

Ao meu pai, Carlos Alberto Guimarães da Silva, por ter proporcionado educação durante toda a minha vida, o que me permitiu chegar e concluir esta etapa.

Às minhas irmãs, Giovanna Diniz Guimarães da Silva e Anne Gabrielle Diniz Guimarães da Silva, minha avó Cidália e minha mãe, Maria de Fátima de Assis Diniz, pelos momentos de incentivo.

Ao meu marido, Dr. Alexander Moreira Siqueira, que é um super-profissional, pelas inspirações e incentivos na busca pelo desenvolvimento pessoal e profissional, pelo companheirismo, pelo apoio e pela ajuda nas formatações e revisões.

E, principalmente, agradeço aos pacientes e familiares pela confiança depositada e por terem permitido ser instrumento essencial para que este trabalho acontecesse.

Por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma, direta ou indireta, fizeram parte dessa etapa tão importante.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin



## RESUMO

**Introdução:** Fungos são colonizadores da cavidade oral de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. A radioterapia utilizada no tratamento dessas neoplasias leva a alterações no microambiente oral devido à diminuição do fluxo salivar e alteração da microbiota predispondo assim às infecções fúngicas por *Candida*. A habilidade de *Candida* causar infecção oral depende além de fatores relacionados ao hospedeiro, dos fatores de virulência produzidos por esses fungos. **Objetivo:** Avaliar a frequência e os fatores de virulência de *Candida* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos em um centro de referência da cidade de Manaus-AM antes, durante e após um mês de tratamento radioterápico. **Metodologia:** Trata-se de um estudo observacional do tipo antes e depois, realizado em uma amostra inicial de dezoito pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço submetidos à radioterapia e sob protocolo profilático de nistatina. Foram coletados dados relacionados às características socioeconômicas dos pacientes, idade, sexo, estado civil, escolaridade, moradia e os dados clínicos hábitos tabagistas e etilistas, diagnóstico, estadiamento clínico, protocolo de tratamento antineoplásico, histórico familiar e sinais e sintomas orais. Foi possível proceder à avaliação em três intervalos de tempo, antes, na segunda semana e após um mês do tratamento das amostras de onze pacientes cuja coleta do material biológico bucal foi feita por meio de um *swab* estéril e semeadas em *CHROMagar™ Candida* para o isolamento das espécies. Os isolados foram testados para os fatores de virulência, crescimento a 37°C, produção de proteinase, fosfolipase, urease e hemolisina. **Resultados:** Foi observada predileção pelo sexo masculino, faixa etária entre a quinta e sexta década de vida, grau de escolaridade ensino médio completo, com renda entre um e três salários mínimos, tabagismo foi relatado em mais da metade dos casos, laringe e boca foram os sítios prevalentes, o tipo histológico mais comum foi o carcinoma de células escamosas. Os pacientes foram irradiados com uma dose média de  $25,75 \pm 8,28$  centigreys (cGy) na segunda semana e  $44,56 \pm 5$  cGy na quarta semana. Candidíase oral foi observada em 1(9%) paciente antes do tratamento, em 45,5% na segunda semana e em 1(9%) na quarta semana de tratamento. A xerostomia e disgeusia foram as manifestações orais mais expressivas. *C. albicans* (58,3%) foi espécie mais isolada nos três períodos avaliados, além desta foram isoladas *C. tropicalis* (8,3%), *C. guilliermondi* (8,3%), *Candida sp.*(16,7%) e *Exophiala dermatitidis* (8,3%). Os isolados foram produtores apenas de proteinase, foi observada a produção em 45,5% antes do tratamento, 27,3% na segunda semana e em 27,3% das amostras na quarta semana de tratamento. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que a colonização por *Candida* pode ser aumentada pela radioterapia, que a produção de proteinase parece ser mais expressiva durante a segunda semana de tratamento, que espécies de *Candida* não *albicans* são colonizadoras de pacientes com neoplasias malignas de cabeça e pescoço e apresentam potencial de virulência, e que o uso profilático da nistatina parece ser eficaz no combate às infecções bucais durante o tratamento agindo sobretudo em *Candida* não *albicans*. Este trabalho expõe a necessidade de estudos relacionados à colonização e infecção por *Candida* e outras leveduras durante o tratamento radioterápico, ademais, sugerimos que os pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço sejam avaliados periodicamente quanto à colonização e infecção fúngica na cavidade bucal para que medidas profiláticas sejam implementadas.

**Palavras-Chave:** Radioterapia; *Candida*; Leveduras; Neoplasias de Cabeça e Pescoço; Fatores de Virulência.

## ABSTRACT

**Introduction:** Fungi are colonizers of the oral cavity of patients with head and neck cancer. Radiotherapy without treatment of these neoplasms that leads to changes in the oral microenvironment due to decreased salivary flow and alteration of the microbiota thus predisposing to *Candida* fungal infections. *Candida's* ability to cause oral infection depends on factors related to the host, on virulence factors by these fungi. **Objective:** To evaluate the frequency and virulence factors of *Candida* in patients with head and neck cancer treated at a referral center in the city of Manaus-AM before, during and after one month of radiotherapy treatment. **Methodology:** This is an observational study of the type before and after, carried out in an initial sample of eighteen patients diagnosed with head and neck cancer submitted to radiotherapy and under the prophylactic protocol of Nystatin. Data were collected related to the patients' socioeconomic characteristics, age, sex, marital status, education, housing and clinical data, smoking and alcohol consumption habits, diagnosis, clinical staging, antineoplastic treatment protocol, family history and oral signs and symptoms. It was possible to proceed to the evaluation in three time intervals, before, in the second week and after one month of the treatment of the samples of eleven patients whose collection of the biological material was made through a sterile *swab* and sown in CHROMagar TM *Candida* for isolation of the species. The isolates were tested for virulence factors, growth at 37°C, production of proteinase, phospholipase, urease and hemolysin. **Results:** There was a predilection for males, age between the fifth and sixth decade of life, complete high school education, with income between one and three index, smoking was reported in more than half of the cases, larynx and mouth were the prevalent sites, the most common histological type was squamous cell carcinoma. Patients were irradiated with an average dose of  $25.75 \pm 8.28$  (cGy) in the second week and  $44.56 \pm 5$  cGy in the fourth week. Oral candidiasis was observed in 1 (9%) patient before treatment, in 45.5% in the second week and in 1 (9%) in the fourth week of treatment. Xerostomia and dysgeusia were the most expressive oral manifestations. *C. albicans* (58.3%) was the most isolated type in the three approved periods, in addition to this, *C. tropicalis* (8.3%), *C. guilliermondi* (8.3%), *Candida sp.* (16.7%) and *Exophiala dermatitidis* (8.3%). The products were produced only from proteinase, production was observed in 45.5% before treatment, 27.3% in the second week and in 27.3% of the first in the treatment week. **Conclusions:** Our results obtained that colonization by *Candida* can be increased by radiotherapy; the production of proteinase seems to be more expressive during the second week of treatment; *Candida non albicans* species are colonizers of patients with malignant neoplasms of the head and appear and present potential of virulence; and the prophylactic use of nystatin appears to be effective in combating oral infections during treatment, acting mainly on non-*albicans* species. This work exposes the need for studies related to colonization and infection by *Candida* and other yeasts during radiotherapy treatment, in addition, we suggest that patients irradiated in the head region and research be periodically harvested regarding colonization and fungal infection in the oral cavity so that measures prophylactics are implemented.

**Keywords:** Radiotherapy; *Candida*; Yeasts; Head and Neck Neoplasms; Virulence Factors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- a) Crescimento de <i>Candida sp.</i> em <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> . b) Crescimento de <i>C. albicans</i> em <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> . ....	34
Figura 2- Colônias de <i>C. albicans</i> em SAB. ....	34
Figura 3- Colônias de <i>C. albicans</i> em triplicata em meio ágar-gelatina-leite, para o teste de produção de proteinase. ....	35
Figura 4- Culturas de <i>C. albicans</i> em triplicata em meio teste para produção de fosfolipase. ....	36
Figura 5- Escala MacFarland. ....	37
Figura 6- <i>Cup-plates</i> em ágar sangue. ....	37
Figura 7- Amostra positiva para urease (meio vermelho- fúcsia) e amostras negativas (meio amarelo).....	37
Figura 8- a) Assimetria de face de paciente com melanoma invasivo. b) Aspecto intrabucal do melanoma invasivo. ....	43
Figura 9 - Mucosite e Candidíase pseudomembranosa em palato de paciente com câncer de laringe na segunda semana de tratamento. ....	46
Figura 10 - Candidíase pseudomembranosa em palato de paciente com câncer de laringe na quarta semana de tratamento. ....	46
Figura 11- Crescimento em <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> de <i>Candida sp.</i> e <i>C. albicans</i> isoladas de um mesmo paciente antes( a) e na segunda semana de tratamento( b). ....	47
Figura 12- Crescimento em <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> de <i>C. albicans</i> isoladas de um mesmo paciente nos três intervalos de tempo, antes(a), segunda semana(b) e quarta semana(c). Na quarta semana não houve crescimento. ....	47
Figura 13- Crescimento de <i>C. albicans</i> em meio <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> de amostra de paciente coletada ao final da quarta semana de tratamento.....	48
Figura 14- Meio <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> com amostras de paciente coletadas nos três períodos de tempo, antes(a), segunda semana(b) e quarta semana(c), mostrando crescimento positivo de <i>C. tropicalis</i> apenas antes do tratamento. ....	48
Figura 15- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas concomitantemente à <i>C. albicans</i> em meio <i>CHROMagar<sup>TM</sup>Candida</i> . As amostras são de um mesmo paciente, coletadas antes e na segunda semana de tratamento. ....	50
Figura 16 - Culturas em meio Ágar-gelatina-leite, teste negativo para produção de proteinase nas culturas de <i>C. tropicalis</i> e teste positivo na cultura de <i>C. albicans</i> . ....	53

Figura 17- a e b- Aspecto clínico da lesão de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado em estágio IV de origem em amígdala palatina. ....	65
Figura 18- Amostras semeadas em meio Chromagar <i>Candida</i> (a) e em SAB (b). Foi observado crescimento leveduriforme de coloração negra.....	65
Figura 19- Cultura de <i>Exophiala dermatitidis</i> e <i>C. albicans</i> em ágar Christensen. Teste positivo para <i>E.dermatitidis</i> evidenciado pela mudança na coloração do meio para vermelho-fúcsia.....	66
Gráfico 1 - UFC em função do tempo antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento. ....	53
Gráfico 2 - Produção de proteinase em função do tempo antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento. ....	54

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Espécies de leveduras isoladas e a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). .....	49
Quadro 2 - Espécies bacterianas isoladas de amostras de pacientes negativas para crescimento fúngico. ....	49
Quadro 3 - Produção de proteinase por espécie antes do tratamento radioterápico. ....	52
Quadro 4 - Produção de proteinase por espécie na segunda semana do tratamento radioterápico. ....	52
Quadro 5 - Produção de proteinase por espécie ao final da quarta semana do tratamento radioterápico. ....	52
Tabela 1- Dados sócio-demográficos da amostra inicial de 18 pacientes .....	39
Tabela 2 - Dados sociodemográficos da amostra de 11 pacientes .....	41
Tabela 3 - Localização dos tumores e associação de tabagismo e etilismo. ....	42
Tabela 4 - Frequências de Localização do tumor, diagnóstico histológico e estadiamento da amostra inicial de 18 pacientes .....	44
Tabela 5 - Frequências de Localização do tumor, diagnóstico histológico e estadiamento da amostra de 11 pacientes .....	44
Tabela 6 - Comparação das manifestações orais na segunda e quarta semana de tratamento .	45
Tabela 7 - Frequência de Candidíase Oral na segunda e quarta semana de tratamento .....	46
Tabela 8 - Frequência de leveduras isoladas em <i>CHROMagar<sup>TM</sup> Candida</i> à 37°C .....	47
Tabela 9 - Espécies identificadas em <i>CHROMagar<sup>TM</sup> Candida</i> antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento radioterápico e as respectivas UFC.....	51
Tabela 10 - Frequência das espécies isoladas em <i>CHROMagar<sup>TM</sup> Candida</i> antes, na segunda semana e na quarta semana.....	51

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SAP- Aspartato Protease  
SUS-Sistema Único de Saúde  
FCECON- Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas  
CECON- Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas  
TNM- Tumor, Node ,Metastasis.  
INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva  
UICC- Union for International Cancer Control  
AJCC- The American Joint Committee on Cancer  
DNA- Deoxyribonucleic acid  
HIV- Human Immunodeficiency Virus  
FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz  
TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido  
Pz- Atividade enzimática  
pH- Potencial hidrogeniônico  
UFC- Unidades formadoras de colônias  
GLMR- Generalized Linear Model with Mixed Effects  
CEP- Comitê de Ética em Pesquisa  
UNINORTE- Universidade do Norte  
CEC- Carcinoma espinocelular/ Carcinoma de células escamosas  
CD- Carcinoma ductal  
CAC- Carcinoma Adenoide Cístico  
LAGC- Linfoma Anaplásico de Grandes Células  
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase  
BDA-Ágar Sabouraud Dextrose  
BOD -Biochemical Oxygen Demand  
 $\gamma$ - gama  
°C- Graus Celsius  
 $\alpha$ - Alpha  
 $\sigma$ - Sigma  
g -Grama  
mg- Miligramas  
mm- Milímetros  
ml- Mililitro  
Gy- Gray  
CGy-Centigray

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo Geral .....	19
2.2. Objetivos Específicos .....	19
<b>3. Revisão de literatura.....</b>	<b>20</b>
3.1. Câncer: Um problema de Saúde Pública.....	20
3.2. Câncer de Cabeça e Pescoço .....	22
3.3. Efeitos da radioterapia de cabeça e pescoço na saúde oral .....	24
3.4. Infecções fúngicas orais em pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante o tratamento radioterápico .....	25
3.5. Fatores de virulência de <i>Candida</i> e radiação.....	28
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>31</b>
4.1. Tipo de estudo .....	31
4.2. Local de estudo.....	31
4.3. População de estudo .....	31
4.4. Amostra .....	31
4.5. Critérios de inclusão .....	32
4.6. Critérios de exclusão .....	32
4.7. Etapas da coleta dos dados .....	32
4.7.1. Coleta de dados Clínico-epidemiológicos.....	32
4.7.2. Coleta do material biológico .....	33
4.7.3. Processamento do material biológico.....	33
4.7.4. Determinação dos fatores de virulência .....	35
4.7.5. Produção de proteinase.....	35
4.7.6. Produção de Fosfolipase.....	36
4.7.7. Produção de Hemolisina.....	36

4.7.8. Produção de uréase .....	37
4.8 Análise Estatística .....	38
4.9 Aspectos Éticos .....	38
<b>5. Resultados .....</b>	<b>39</b>
5.1 Descrição das características epidemiológicas .....	39
5.2. Achados clínicos.....	42
5.2.1. Tabagismo e etilismo.....	42
5.2.2. Localização do tumor, diagnóstico e estadiamento.....	43
5.2.3. Manifestações clínicas bucais durante a radioterapia.....	45
5.3. Crescimento a 37° C e identificação de leveduras na amostra inicial de 18 pacientes .....	46
5.4. Crescimento a 37° C, identificação de leveduras e fatores de virulência Antes, na segunda semana e na quarta semana de tratamento.....	50
5.5. Dosagem de Radiação x UFC.....	54
5.6. Dosagem de Radiação x Produção de Proteinase.....	55
<b>6. Discussão .....</b>	<b>56</b>
6.1. Descrição das características clínicas e epidemiológicas .....	56
6.2. Manifestações clínicas bucais na radioterapia.....	58
6.3. Leveduras identificadas e fatores de virulência no tratamento radioterápico.....	60
6.4. Achado incidental de <i>Exophiala dermatitidis</i> .....	65
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>69</b>
<b>8. Considerações Finais.....</b>	<b>71</b>
<b>9. Referências bibliográficas .....</b>	<b>72</b>



## 1. Introdução

A partir da segunda metade do século XX o câncer passou de uma enfermidade atrelada à civilização e ao desenvolvimento socioeconômico a um problema de Saúde Pública (ARAÚJO NETO; TEIXEIRA, 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, contabilizou-se 559.371 novos casos de câncer no Brasil e 243.588 mortes por câncer no mesmo ano (WHO, 2018).

As neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço, que compreendem os cânceres do trato aerodigestivo superior (FILHO et al., 2013), destacam-se pela elevada morbidade e mortalidade, trazendo reconhecidos impactos social e econômico relacionados ao tratamento (SILVEIRA et al., 2012). Pinto e Ugá (2011) apontam a radioterapia e a hospitalização como os principais direcionadores dos custos relacionados ao tratamento de pacientes com histórico de tabagismo, principal fator de risco para câncer de cabeça e pescoço. A cirurgia e a radioterapia a depender das dimensões do tumor são a terapêutica de escolha no tratamento do câncer de cabeça e pescoço sendo a quimioterapia utilizada como adjuvante (CAMPANA; GOIATO, 2013; CURIONI et al., 2012).

Pacientes com câncer de cabeça e pescoço lidam com os impactos estéticos e funcionais decorrentes da terapia antineoplásica. A cirurgia pode levar a mutilações permanentes, perda de órgãos e/ou alterações funcionais (FILHO et al., 2013). A radioterapia é utilizada com intuito de promover destruição do tecido neoplásico, porém, em menor grau age sobre tecidos saudáveis promovendo efeitos deletérios ao paciente afetando diretamente sua qualidade de vida. Estudos apontam que os efeitos indesejados mais comuns da radioterapia são mucosite, xerostomia, e infecções fúngicas orais causadas por leveduras do gênero *Candida* (AHADIAN et al., 2017; FLORIANO et al., 2018)

As infecções orais por fungos oportunistas, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, acontecem porque a radiação ionizante induz alterações estruturais nas glândulas salivares levando a uma hipofunção destas, com consequente diminuição do fluxo salivar, predispondo o ambiente bucal às infecções e ocasionando a sensação de boca seca (xerostomia) relatada pelos pacientes durante o tratamento (PAIVA et al., 2010).

O gênero *Candida* é o principal envolvido em infecções orais oportunistas durante as terapias antineoplásicas (ROCHA; MARTINS; MEDRADO, 2017). Embora vivam de forma comensal em indivíduos saudáveis, em situações onde exista comprometimento do sistema imune e alterações do microambiente oral, essas leveduras podem tornar-se patogênicas (RAY-CHAUDHURI; SHAH; PORTER, 2013). A espécie mais comumente relacionada às

infecções na mucosa oral é *Candida albicans* (SIDRIM & ROCHA, 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Ainda que estudos tenham demonstrado emergência de espécies de *Candida* não *albicans* como importantes agentes patogênicos humanos (REDDING, 2001; REDDING et al., 2001) (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Os efeitos da radiação sobre a distribuição de espécies de *Candida* foi examinada por alguns autores cujos resultados evidenciaram aumento do número e variabilidade de *Candida* não *albicans* durante a radioterapia (BELAZI et al., 2004; DE FREITAS et al., 2013). As razões para a emergência na distribuição de *Candida* não *albicans* na cavidade oral pós-radioterapia e no desenvolvimento de infecções não estão claras, porém podem estar relacionadas aos fatores de virulência desses microrganismos.

A presença do fungo no organismo do hospedeiro, *per se*, não é indicativo de infecção, esta, necessariamente, requer habilidades especiais do agente conhecidas como fatores de virulência. Dentre os fatores de virulência descritos para espécies do gênero *Candida*, estão o crescimento a 37° C, a produção de enzimas extracelulares, formação de biofilme e aderência às células epiteliais (KOGA-ITO et al., 2006; ANDREOLA et al., 2016).

Os mecanismos de virulência apresentados por *Candida sp.* frente à radiação utilizada no tratamento do câncer de cabeça e pescoço, e, sobretudo, por *Candida* não *albicans*, têm sido pouco estudados, embora alguns autores sugiram que a radioterapia possa induzir mudanças nos mecanismos de patogenicidade fúngica de *C. albicans* (SURYAWANSHI et al., 2012; RAMLA; SHARMA; PATEL, 2016) e de *Candida* não *albicans* (DA SILVA et al., 2017; JAHANSHIRI et al., 2018).

Diante disso, este trabalho almeja contribuir para o entendimento da colonização e infecções fúngicas orais durante o tratamento radioterápico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, a partir da investigação dos fatores de virulência e distribuição de *Candida*. Espera-se, com os conhecimentos adquiridos, cooperar para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com vistas às estratégias de controle e prevenção das infecções orais.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a frequência e os fatores de virulência de *Candida* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos em um centro de referência da cidade de Manaus-AM antes, durante e após um mês de tratamento radioterápico.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Quantificar (UFC'S) e identificar as espécies de *Candida* antes, durante e após um mês de tratamento radioterápico;
- ✓ Avaliar fatores de virulência dos isolados de *Candida* antes, durante e após um mês de tratamento radioterápico;
- ✓ Relacionar a dosagem de Radiação e a presença de espécies de *Candida*;
- ✓ Avaliar e classificar as manifestações clínicas de Candidíase oral e demais manifestações orais associadas à radioterapia;
- ✓ Investigar fatores clínico-epidemiológicos relacionados aos pacientes avaliados (localização da lesão, estadiamento clínico, características sociodemográficas, fatores ambientais e ocupação).

### **3. Revisão de literatura**

#### **3.1. Câncer: Um problema de Saúde Pública**

Nas primeiras décadas do século XX, o câncer era visto como doença em ascensão apenas em países desenvolvidos. Nessa época, no Brasil, as políticas públicas de saúde eram voltadas ao controle de doenças infecciosas endêmicas (BRASIL, 2006). Devido à reduzida expressão epidemiológica o câncer era pouco percebido pela população, tendo sido inicialmente reconhecido como problema de saúde pública por profissionais da área médica que, por sua vez, estavam em constante contato com as discussões sobre a doença em congressos internacionais. Foi a partir desses profissionais que surgiram as primeiras iniciativas de inclusão do câncer na agenda da saúde pública (TEIXEIRA; PORTO; NORONHA, 2012).

À medida que se ampliava o conhecimento científico sobre a doença e as possibilidades terapêuticas, atrelado aos avanços na medicina ocidental no combate às doenças infecciosas, intensificou-se o desenvolvimento de estudos direcionados ao câncer no Brasil. Embora a doença fosse reconhecidamente de baixa incidência e incurável, acreditava-se que o número de casos tenderia a aumentar concomitantemente ao desenvolvimento do país, haja vista se tratar de doença presente em países desenvolvidos (TEIXEIRA, 2009).

Em 1904, Azevedo Sodré publicou no periódico carioca *O Brasil Médico* o estudo “Frequência do câncer no Brasil”, considerado o primeiro estudo sobre o câncer no país, no qual apontou além da baixa incidência da doença no país, as dificuldades na obtenção de dados nas estatísticas oficiais e a restrição dos dados às principais capitais. Outrossim, observou ainda menor frequência na Região Norte do Brasil (TEIXEIRA, 2009).

O estudo de Sodré (1949) possivelmente representa o pensamento da época, momento no qual pouca importância era dada à notificação da doença, culminando na subnotificação dos casos, em especial na Região Norte. Apesar disso, o interesse dos médicos brasileiros em relação ao câncer, bem como ao seu tratamento, ampliava-se gradualmente. Inicialmente devido ao contato com a literatura internacional e, posteriormente, devido ao fato de haver, à época, uma preocupação com a possibilidade de o câncer ser uma doença transmissível (TEIXEIRA; PORTO; NORONHA, 2012)

Nesse contexto, surgiram as primeiras instituições de tratamento do câncer no Brasil, amparadas pelo desenvolvimento da dermatologia relacionada às novas técnicas de tratamento de cânceres de pele e o interesse filantrópico na assistência aos portadores da doença. Em

1922 foi criado o Instituto do Radium de Belo Horizonte voltado a pesquisas e tratamento do câncer mantido por apoio federal, estadual e filantrópico e, em 1937, o Centro de Cancerologia do Distrito Federal (TEIXEIRA, 2009).

Das primeiras iniciativas da Saúde Pública com relação à doença, destaca-se a inclusão do câncer à Inspeção da Lepra e Doenças Venéreas criada após a reforma sanitária de 1920 (TEIXEIRA; PORTO; HABIBI, 2012). Ainda de acordo com Teixeira *et al.* (2012), a Política Nacional de Controle da Doença só viria a ser estruturada a partir da reforma do Ministério da Educação e Saúde que instituiu serviços direcionados à doença e com a criação do Serviço nacional do Câncer (SNC) em 1941, resultante do intenso trabalho de conscientização da elite política e econômica a cerca da importância epidemiológica da doença e de seu controle, trabalhos estes assumidos pelo médico Mario Kroeff, a quem também se atribui a criação, em 1937, no então Distrito Federal, do Centro de Cancerologia que mais tarde viria a se transformar no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).

O INCA é o órgão auxiliar do Ministério da saúde que desenvolve ações de prevenção e controle do câncer no Brasil (INCA, 2019). Desde 1993, o INCA fornece as estimativas dos tipos de câncer mais incidentes em cada uma das regiões do país, contribuindo para estratégias em Saúde Pública, atuando também, como integrante do Sistema único de Saúde (SUS), na assistência à população e no desenvolvimento do ensino e da pesquisa.

Em contraste ao observado no início do século passado, hoje, o câncer tem assumido números significativamente maiores em países em desenvolvimento. Tal fato pode ser atribuído ao aumento da expectativa de vida da população, a maior exposição aos fatores de risco e às desigualdades sociais (BRAY *et al.*, 2018). Zhang *et al.* (2017) explicam que as alterações biológicas próprias do envelhecimento, em conjunto com doenças crônicas associadas à idade, processos inflamatórios e imunosenescência, somadas ainda a fatores ambientais e psicossociais, resultam numa maior vulnerabilidade de idosos às malignidades.

Partindo-se dessa mudança epidemiológica e social, em dezembro de 2005 o Ministério da Saúde instituiu, por meio da Portaria GM/MS nº 2.439, a Política Nacional de Atenção Oncológica a qual define o câncer como um problema de saúde pública (BRASIL, 2005). Os principais objetivos dessa política envolvem a promoção, prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e cuidados paliativos; estruturar ações integrativas em todos os níveis de atenção; e constituir redes organizadas de forma hierárquica de forma a garantir o acesso ao atendimento integral (BRASIL, 2005).

No Brasil, de acordo com o INCA, a estimativa é de 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo-se os cânceres de pele não melanoma) para cada ano do triênio 2020-2022. O câncer bucal (o tipo de câncer da região de cabeça e pescoço mais comum) ocupa a quinta posição dos cânceres de maior incidência em homens e a décima terceira de maior incidência em mulheres. Além disso, dos 11.180 novos casos de câncer bucal no Brasil para o ano de 2020, cem deles foram estimados para o estado do Amazonas (BRASIL,2019).

No estado do Amazonas, a Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), inicialmente Centro de Controle de Oncologia (CECON), criado em 1974, e, mais tarde, em 1989, transformado em Fundação, situada na Capital (Manaus-AM), é a instituição de referência responsável pela assistência de alta complexidade, atuante no ensino e pesquisa, e executora das ações e políticas de controle dessa doença no Estado.

### **3.2. Câncer de Cabeça e Pescoço**

Câncer é a designação dada às neoplasias malignas cujas características são o crescimento e a multiplicação desordenados de células culminando na formação de tumores com potencial de invasão de tecidos e órgãos (DOMINGOS; PASSALACQUA; DE OLIVEIRA, 2014; INCA,2019). Podem acometer diversas partes do corpo e quando afetam a região do trato aero digestivo superior, no qual se incluem a cavidade oral, a faringe, a laringe, a cavidade nasal, os seios paranasais, a tireoide e as glândulas salivares, agregam o grupo das neoplasias de cabeça e pescoço (CAMPANA; GOIATO, 2013).

O Câncer de cabeça e pescoço é de etiologia multifatorial, resultando da interação entre diversos fatores ambientais e a herança genética (GALBIATTI et al., 2013). Ocupa a sexta posição dos cânceres mais prevalentes em todo o mundo (JEMAL et al., 2011). O tipo histológico mais comum é o carcinoma de células escamosas, constituindo cerca de 90% dos casos (CURADO; HASHIBE, 2009). Estudos apontam prevalência dessas neoplasias em indivíduos do sexo masculino (SILVEIRA et al., 2012; CURADO; BOYLE, 2013), leucodermas, entre a quinta e a sétima década de vida (DOMINGOS; PASSALACQUA; DE OLIVEIRA, 2014; KIGNEL; BIRMAN,2000), e asseveram que o tabagismo é o principal fator de risco para desenvolvimento desse tipo de câncer (ALVARENGA et al., 2008; GALBIATTI et al., 2013).

De acordo com Galbiatti *et al.* (2013), o cigarro contém substâncias, tais como nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos, carcinogênicas genotóxicas que podem aumentar o risco de doença devido a alterações no perfil molecular causando mutações. Di Credico *et*

*al.* (2019) mostram que um fator relevante é a intensidade e duração do hábito de fumar. Nesse estudo, cujo intento foi quantificar o efeito conjunto da intensidade e duração do tabagismo sobre o risco para câncer de cabeça e pescoço, notaram que indivíduos que fumavam vinte ou mais cigarros por dia, durante um período de trinta anos, apresentaram risco cinco vezes superior de desenvolverem câncer de cavidade oral e faringe.

Outros fatores de risco são considerados importantes no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, como o alcoolismo (CAMPANA; GOIATO, 2013) e as infecções pelo Papiloma vírus humano (HPV), associados ao desenvolvimento de câncer de orofaringe (WAGNER et al., 2017); o uso de próteses mal adaptadas e a higiene oral precária, associados ao desenvolvimento de câncer da cavidade oral; e a exposição ocupacional aos raios ultravioleta, associada ao desenvolvimento de câncer no lábio inferior (DOMINGOS; PASSALACQUA; DE OLIVEIRA, 2014).

O diagnóstico é feito por meio de exame das vias aerodigestivas superiores e biópsia (CURIONI et al., 2012). O estadiamento do tumor é classificado por meio do sistema TNM da *Union for International Cancer Control - UICC* e do *American Joint Committee on Cancer - AJCC* (SOBIN; WITTEKIND; INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER, 2002; MONDEN et al., 2019; CURIONI et al., 2012). Esse sistema de estadiamento consiste no agrupamento dos casos de câncer de acordo com padrões de estágios de extensão da doença, onde a letra T refere-se à extensão do tumor primário; a letra N, a ausência ou a presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; e a letra M, a ausência ou a presença de metástases à distância. Cada letra acompanha-se de um numeral que indica a extensão da doença maligna. O objetivo do estadiamento é fornecer indicadores do prognóstico sendo utilizado para o norteamto das medidas terapêuticas (MONDEN et al., 2019).

Nas fases iniciais da doença, há pouca ou nenhuma sintomatologia, o que pode ser um dos motivos pelos quais a maioria dos casos é diagnosticado tardiamente. De acordo com Marta *et al.* (2011), o diagnóstico, com frequência, é estabelecido na vigência de estágios clínicos avançados, determinando maiores sequelas e deformidades, repercutindo na qualidade de vida de paciente. Da mesma forma, Silveira *et al.* (2012) asseveram que o diagnóstico tardio repercute na morbidade e mortalidade crescentes desse tipo de câncer, com relevantes impactos social e econômico envolvidos no tratamento e reabilitação. Nesse sentido, a doença oncológica representa um problema de saúde pública devido aos custos econômicos, e sociais envolvidos, principalmente relacionados ao tratamento dessa enfermidade (FILHO et al., 2013).

Com relação à estratégia terapêutica, a cirurgia e/ou a radioterapia são empregadas como protocolo terapêutico nos estágios iniciais, sendo reservada a quimioterapia como terapia adjuvante nos estágios avançados da moléstia (CURIONI et al., 2012; CAMPANA; GOIATO, 2013).

Pacientes submetidos ao tratamento radioterápico utilizado no manejo da doença oncológica de cabeça e pescoço desenvolvem alterações e sequelas que afetam suas qualidade de vida e que, por vezes, repercutem em atrasos na terapia anticâncer (FREITAS et al., 2011). Estudos apontam que entre os efeitos indesejados os mais comuns são mucosite, xerostomia, e infecções fúngicas ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* (AHADIAN et al., 2017; FLORIANO et al., 2017).

### **3.3. Efeitos da radioterapia de cabeça e pescoço na saúde oral**

Após a descoberta dos raios X por Wilhelm Conrad Röntgen (1895) e, em 1898, do rádio por Marie e Pierre Curie, a radioterapia ao final do século XIX passou a ser utilizada como tratamento para neoplasias, utilizando radiação ionizante para o tratamento desses tumores (MARTA et al., 2011).

As radiações ionizantes são aquelas que apresentam energia suficiente para formar íons, sendo exemplos os raios X e raios gama (TOLEDO; FERRAGUT; DE ALMEIDA, 2014). A radioterapia é utilizada com o objetivo de destruir o tecido neoplásico preservando tanto quanto possível os tecidos normais e adjacentes. De acordo com Marta (2014), existem duas formas de radioterapia: a Teleterapia, ou radioterapia externa, na qual existe uma distância entre o paciente e a fonte de radiação; e a Braquiterapia, em que geralmente se usam as fontes de radiação em contato direto com os tecidos a serem irradiados. Na radioterapia externa para a região de cabeça e pescoço, o paciente fica deitado sob o aparelho e uma máscara é utilizada com o objetivo de auxiliar na sustentação da posição correta durante o tratamento (INCA, 2019).

A dose de radiação é medida em unidade gray (Gy), os pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço recebem geralmente como dose curativa, entre 50 e 70 Gy (ROLIM; COSTA; RAMALHO, 2011). Os efeitos da radioterapia nos tecidos são dose dependentes e se dão de duas formas: O efeito direto - quando a radiação atua diretamente no DNA, proteínas e lipídios levando a alterações estruturais; e o efeito predominante, conhecido como efeito indireto - quando a radiação quebra moléculas de água formando radicais livres que podem lesar outras moléculas importantes (OKUNO, 2013; MARTA et al., 2011).



A sensibilidade das células à radiação está relacionada com a fase do ciclo celular em que estas se encontram (TOLEDO; FERRAGUT; DE ALMEIDA, 2014; MARTA et al.,2011). As fases G2 e mitose (M) são as mais sensíveis (MARTA et al.,2011). Portanto, os tecidos que apresentam um alto índice de proliferação celular, ou seja, alta capacidade mitótica, como é o caso do epitélio oral, são mais afetados pela terapia antineoplásica (HOLMES et al., 2014).

Os efeitos iniciais da radioterapia, também chamados efeitos do tipo precoce ou agudo, ocorrem na mucosa oral nas primeiras semanas após o início da radioterapia (MARTA et al., 2011). Entre esses efeitos estão a mucosite, xerostomia disgeusia, infecções fúngicas, infecções herpéticas, infecções bacterianas, cárie de radiação (GÓMEZ et al.,2017; QUISPE et al., 2018; FREITAS et al., 2011; BASCONES-MARTÍNEZ; MUÑOZ-CORCUERA; GÓMEZ-FONT, 2013; PAIVA et al.,2010; FLORIANO et al.,2017) e doença periodontal (QUISPE et al., 2018; GÓMEZ et al.,2017; SANTOS et al., 2017). Além desses efeitos, podem ocorrer efeitos tardios meses a anos após a irradiação, estes por sua vez, acontecem nos tecidos com baixa atividade mitótica, tais como nervos, músculos e ossos, exemplos são o trismo (limitação da abertura bucal decorrente de fibrose muscular) e a osteorradionecrose (necrose asséptica de tecido ósseo pós-radioterapia devido à obliteração da microcirculação local) (PAIVA et al.,2010; FREITAS et al., 2011; SARI; NASILOSKI; GOMES, 2014; CAETANO et al., 2016).

A Infecção fúngica por *Candida* é achado comum durante o tratamento radioterápico e tem sido relacionada à xerostomia.(NICOLATOU-GALITIS et al., 2003; NICOLATOU-GALITIS, 2011; EPSTEIN et al.,1993). Esta por sua vez, caracteriza-se por sensação de boca seca e espessamento da saliva e resulta dos danos da radioterapia aos ácinos das glândulas salivares maiores, deixando o meio bucal propenso a infecções secundárias (PAIVA et al.,2010). A redução do fluxo salivar e, conseqüentemente, a xerostomia, ocorrem depois de 1800 cGy, correspondendo à segunda semana do tratamento radioterápico (ROTHWELL, 1987).

### **3.4. Infecções fúngicas orais em pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante o tratamento radioterápico**

As leveduras do gênero *Candida* são fungos habitantes de diversos ecossistemas, tais como solo, alimentos, água e fazem parte da microbiota normal do homem e de outros animais (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; LACAZ, 2002). Taxonomicamente classificam-se no

reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). *C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica mais frequentemente isolada em humanos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SIDRIM & ROCHA, 2004).

As infecções fúngicas causadas por *Candida* são denominadas Candidíases ou Candidoses. A infecção oral acontece porque as leveduras embora sejam organismos comensais, podem se tornar patógenos quando os mecanismos imunológicos do hospedeiro estão comprometidos ou quando na presença de um desequilíbrio no ambiente oral (RAY-CHAUDHURI; SHAH; PORTER, 2013). A relação de comensalismo depende da integridade do tecido do hospedeiro, da microbiota normal e do sistema imune (DE ROSSI et al., 2011)

No geral, as lesões orais apresentam-se como placas brancas removíveis à raspagem, e as manifestações clínicas da infecção incluem as formas pseudomembranosa, eritematosa, estomatite protética, queilite angular, glossite romboidal mediana (SIDRIM & ROCHA, 2004; NEVILLE, 2009; PEIXOTO et al., 2014) e crônica hiperplásica (NEVILLE, 2009).

O Tratamento das lesões orais é feito com nistatina, considerada como primeira escolha para o tratamento de Candidoses de irradiados na cabeça e pescoço, antifúngicos azólicos como cetoconazol, fluconazol e itraconazol também podem ser utilizados (ANDRADE et al., 2014).

A candidíase da mucosa oral é a infecção oportunista mais prevalente relacionada ao tratamento antineoplásico quimioterápico e radioterápico (ROCHA; MARTINS; MEDRADO, 2017). A radioterapia ao alterar o fluxo salivar, estimula a colonização oral por esses fungos que, por vezes, levam à candidíase orofaríngea. (RAMIREZ-AMADOR et al., 1997). Particularmente, durante o tratamento radioterápico, há um aumento de 74,5% da colonização fúngica oral (JAHANSHIRI et al., 2018). Suryawhanshi *et al.* (2012) em um estudo investigando candidíase orofaríngea em pacientes com câncer de orofaringe para os quais a radioterapia foi tratamento recomendado concluiu que a radiação aumenta a frequência de ocorrência de candidíase oral, e, em suas amostras, houve predominância de *C. albicans*.

Há evidências de que, embora *C. albicans* seja a espécie mais comumente relacionada às infecções orais, outras espécies podem estar presentes como patógenas colaborando para infecções mais graves e de difícil tratamento, sobretudo em imunossuprimidos e em pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço. Redding (2001) e Deorukhkar *et al.* (2014) asseveram a emergência de *Candida* não *albicans* como organismos causadores de infecção orofaríngea, essas espécies eram pensadas como patógenas apenas quando em conjunto com *C. albicans*.

Em 2001, Redding *et al.* (2001) publicaram o primeiro caso de candidíase orofaríngea radioinduzida causada por *Candida dubliniensis*. Até então, esse fungo havia sido relatado como patógeno exclusivamente em pacientes infectados pelo HIV. Da mesma forma, em 2004, identificou-se candidíase orofaríngea radioinduzida causada por *Candida glabrata* em seis pacientes, todos tratados com fluconazol, porém, necessitaram de doses aumentadas da medicação (200 a 800 mg/dia), sugerindo resistência intrínseca dessa espécie aos tratamentos convencionais (REDDING *et al.*, 2004).

De acordo com Giolo *et al.* (2010), nas últimas décadas, têm-se notado um aumento significativo de *Candida* não *albicans* nos processos patogênicos, das quais se destacam: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. haemulonii*, *C. cifferii*, *C. catenulata*, *C. utilis*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides*. Belazi *et al.* (2004) investigaram isolados de *Candida* de pacientes durante a radioterapia para cabeça e pescoço e obtiveram como resultado aumento da frequência de *C. albicans* e das espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. kefyr*. De acordo com os achados de Dambroso *et al.* (2009), a radioterapia induziu níveis mais altos de *Candida* não *albicans*; as espécies isoladas nesse estudo foram: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. kefyr*.

Em consonância a esses achados, De Freitas *et al.* (2013), ao identificarem espécies de *Candida* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados por radioterapia, notaram diversificação e maior prevalência de *Candida* não *albicans* na cavidade oral, com presença de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr*. Apontaram ainda que *C. albicans* foi espécie mais prevalente em indivíduos saudáveis do grupo controle, enquanto *C. tropicalis* foi a espécie prevalente em pacientes irradiados.

Jahanshiri *et al.* (2018) concordam que a candidíase orofaríngea é a principal manifestação fúngica em pacientes irradiados em cabeça e pescoço e as espécies não *albicans* *C. tropicalis* e *C. glabrata* são agentes patogênicos notáveis nessa infecção.

As razões para a emergência na distribuição de *Candida* não *albicans* na cavidade oral durante o tratamento radioterápico e no desenvolvimento de infecções não foram elucidadas e podem estar relacionadas com os fatores de virulência desses microrganismos.

### 3.5. Fatores de virulência de *Candida* e radiação

A habilidade de *Candida* causar infecção oral depende, além dos fatores relacionados ao hospedeiro, tais como imunossupressão e alterações no microambiente oral como as induzidas pela radiação, da expressão de diferentes fatores de virulência.

Os fatores de virulência, produção de tubo germinativo, termotolerância, formação de biofilme, produção de enzimas extracelulares e aderência às células epiteliais são comumente relacionados à *Candida* e contribuem para sua patogenicidade (KOGA-ITO et al., 2006; ANDREOLA et al., 2016)

A termotolerância, capacidade de o fungo crescer e manter-se à temperatura de 37° C, configura uma característica de patogenicidade, e somente as espécies capazes de crescer à temperatura corpórea humana são consideradas potencialmente patogênicas (SIDRIM & ROCHA, 2004).

A produção de exoenzimas facilita a fixação das leveduras na mucosa formando ulcerações (LACAZ, 2002). A fosfolipase produzida pelos fungos tem capacidade de degradar os substratos fosfolipídicos das membranas de células epiteliais da mucosa desintegrando-as, facilitando a entrada e ancoragem das hifas no citoplasma (ANDREOLA et al., 2016; CASTELO BRANCO et al., 2012). A atividade da proteinase produzida está associada com uma família de izoenzimas SAP codificadas pelo gene SAP1-10 que aumentam a capacidade do microrganismo colonizar e penetrar os tecidos do hospedeiro além de evasão da resposta imune pela degradação de imunoglobulinas, proteínas do complemento e citocinas (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; KOGA-ITO et al., 2006).

Vieira *et al.* (2018) compararam sensibilidade antifúngica e presença dos genes SAP 1-3 em *Candida*. Os isolados de *Candida* não *albicans* apresentaram predomínio de genes SAP 2, sendo o gene SAP 3 não identificado, enquanto em *C. albicans* foi predominante SAP 1. Com relação à sensibilidade aos antifúngicos Cetoconazol, fluconazol e Itraconazol as linhagens de *Candida* não *albicans* foram menos sensíveis, sugerindo patogênese distinta para essas leveduras.

De acordo com Fourie *et al.* (2018), o ferro é um micronutriente vital para todos os organismos vivos, desempenhando importante papel nos processos biológicos, no entanto, no hospedeiro humano é amplamente indisponível por ser englobado por proteínas que impedem que estes reajam com radicais livres de oxigênio que poderiam corromper a integridade celular. No ambiente oral, as proteínas lactoferrina e ferritina são as principais armazenadoras

de ferro extracelular e intracelular respectivamente (ROSSONI et al., 2013). A *Candida* apresenta atividade hemolítica e é capaz de impetrar esse mineral das proteínas de ligação de ferro. Uma vez disponível, o ferro é utilizado pelos fungos para atividades metabólicas e de crescimento durante a invasão tecidual, sendo este um importante mecanismo de virulência (LINARES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009).

Em um estudo comparando atividade hemolítica de *C. albicans* e *Candida* não *albicans*, em pacientes infectados pelo HIV, foi observado que *Candida* não *albicans* apresentaram habilidade de produção de hemolisina similar à *C. albicans*, com maior atividade hemolítica identificada em *C. glabrata* (ROSSONI et al., 2013).

O papel da urease como fator de virulência emergente em infecções fúngicas foi estudado por Rutherford, (2014), em sua pesquisa avaliando os fungos *Cryptococcus neoformans* (basidiomiceto) e *Coccidioides posadasii* (ascomiceto), concluindo que a urease teve papel importante na promoção de infecção. Ainda de acordo com esse autor, vários microrganismos são capazes de utilizar ureia como fonte de nitrogênio através da enzima urease que converte a ureia em ácido carbâmico e amoníaco, este último, tóxico para as células epiteliais. Muitos fungos patogênicos para humanos têm atividade de urease, entre os quais apontam-se o *Cryptococcus neoformans*, o *Coccidioides immitis*, o *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e as espécies de *Trichosporon* e *Aspergillus* (COX et al., 2000). De acordo com Lee et al. (2013), *C. albicans* e outros patógenos leveduriformes são capazes de extrair nitrogênio do hospedeiro embora de forma menos ampla que os fungos filamentosos. Dessa forma, apresentariam virulência atenuada. A produção de urease por *Candida* durante tratamento radioterápico ainda não foi investigada.

A relação do tratamento radioterápico, como promotor de alterações dos fatores de virulência de *Candida*, tem sido pouco estudada, embora haja indícios de que a radioterapia possa induzir mudanças nos mecanismos de patogenicidade fúngica de *C. albicans* (SURYAWANSHI et al., 2012; RAMLA; SHARMA; PATEL, 2016; DAMBROSO et al., 2009). O mesmo fenômeno foi observado em *Candida* não *albicans*, como nos achados de Da Silva et al. (2017), nos quais foi apurado que a patogenicidade de *C. tropicalis* foi afetada pela radiação  $\gamma$  (gama) *in vitro*, demonstrando alterações na morfologia das colônias, maior aderência e formação de biofilme pós-irradiação. Testes foram feitos por Jahanshiri et al. (2018) para aferir a formação de biofilme, a atividade de proteinase e de fosfolipase em espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* e *C. dubliniensis* durante tratamento radioterápico e verificaram positividade para a produção em todas as espécies. Todos os isolados de *C.*

*tropicalis* apresentaram alta atividade para proteinase. No entanto, testes para a produção de urease e hemolisina nas mesmas condições não foram realizados.

Outros estudos avaliaram a influência da radiação no crescimento de *Candida*, como o realizado por Procop *et al.* (2009) que ao, avaliarem oito espécies de *Candida*, demonstraram que todos os isolados apresentaram crescimento de pseudo-hifas e produção acelerada de blastosporos. Por outro lado, Ben-Yosef *et al.* (2005) investigaram o efeito de uma única aplicação de radiação gama no crescimento de *Candida* e *Cryptococcus* injetados em ratos e verificaram que houve inibição do crescimento *in vivo* desses fungos.

Inferre-se, assim, que estudos direcionados às alterações na epidemiologia e fatores de virulência de *Candida* durante o tratamento radioterápico podem contribuir para tomada de decisão quanto às medidas terapêuticas e profiláticas no controle de infecção contribuindo para a melhora na qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo transversal, descritivo, observacional do tipo Antes e depois.

### **4.2. Local de estudo**

A coleta das amostras foi realizada nos setores de Cabeça e Pescoço e Radioterapia da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON). Uma vez obtidas, foram acondicionadas e transportadas, seguindo todas as medidas de biossegurança, para o laboratório de micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AMAZÔNIA).

### **4.3. População de estudo**

A população do estudo foi constituída por pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço, que na data da primeira avaliação, não tivessem iniciado tratamento radioterápico. De acordo com os últimos Relatórios de gestão da FCECON correspondentes aos anos de 2017 e 2018, foram diagnosticados pela instituição 39 e 42 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, respectivamente. A captação dos pacientes ocorreu no período de Agosto de 2019 e foi interrompida em Março de 2020 em virtude da eclosão da Pandemia de COVID-19 que culminou com a paralisação das atividades na FCECON e no Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ Amazônia).

### **4.4. Amostra**

Para o cálculo amostral considerou-se um poder de 90%, significância estatística ( $\alpha$ ) = 0,01, desvio-padrão ( $\sigma$ ) = 200 e, valendo-se de referência os achados de Suryawanshi *et al.* (2012), cuja diferença nas médias de unidades formadoras de colônias antes e após intervenção radioterápica foi de 450, chegou-se ao número amostral de 30 pacientes. Tendo em vista possíveis recusas de participação, óbitos, abandono de tratamento e transferências para outros centros de atendimento consideramos uma perda de 70%.

#### **4.5. Critérios de inclusão**

Foram incluídos no estudo os pacientes com idade igual ou superior a 18, anos diagnosticados com câncer de Cabeça e pescoço, sem distinção de sexo, etnia e procedência, que ainda não tivessem iniciado tratamento radioterápico no momento da primeira avaliação e que, após prestadas as devidas informações e esclarecimentos com relação ao estudo, assentiram em participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice I).

#### **4.6. Critérios de exclusão**

Foram excluídos do referido estudo, os pacientes que apresentassem *doenças autoimunes a exemplo da Síndrome de Sjögren*, agravo à saúde cujo quadro clínico inclui a xerostomia; pacientes que, após o início do projeto e assinatura do TCLE, revogaram seu consentimento em participar da pesquisa; e pacientes que desistiram do tratamento FCECON.

#### **4.7. Etapas da coleta dos dados**

Os dados foram levantados a partir da análise dos prontuários do setor de radioterapia da FCECON, da coleta de informações prestadas pelo próprio paciente e do exame clínico e na oportunidade da coleta de material biológico. Os parâmetros utilizados são descritos a seguir.

##### **4.7.1. Coleta de dados Clínico-epidemiológicos**

Os dados relacionados às características socioeconômicas dos pacientes, ao que se incluíram qualificações pessoais como idade, sexo, estado civil, escolaridade, moradia (rural ou urbana) e os dados clínicos - referentes às características relacionadas ao desfecho da doença (hábitos tabagistas e etilistas), ao diagnóstico, ao estadiamento clínico, ao tipo e protocolo de tratamento antineoplásico, ao histórico familiar e aos sinais e sintomas orais manifestados durante o tratamento - foram extraídos das informações registradas em



prontuário e declarações fornecidas pelo próprio paciente. Os dados foram anotados seguindo o roteiro pré-definido no Apêndice II.

#### 4.7.2. Coleta do material biológico

A coleta do material biológico foi feita após exame clínico da cavidade bucal dos pacientes utilizando para isso uma espátula descartável. Durante o exame clínico foi avaliada presença de Candidíase oral e o uso de dispositivos protéticos. A coleta do material biológico bucal foi então realizada por meio de um *swab* e em seguida o material armazenado em Cary-Blair.

#### 4.7.3. Processamento do material biológico

As amostras contendo material biológico foram transportadas para análise no laboratório do Instituto Leônidas e Maria Deane, e então semeadas em placas separadas contendo um meio seletivo para *Candida*, *CHROMagar<sup>TM</sup>Candida* (WANG, 2016; LEITE et al., 2015; JAHANSHIRI et al., 2018). Esse procedimento foi realizado através da rotação do *swab* na placa contendo o meio de cultura, por meio da técnica do esgotamento.

As placas foram inseridas em uma incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 37°C por 48 h e, após este período, foram feitas as leituras das placas. O crescimento da levedura foi observado em cada placa e as amostras foram então classificadas como “positivas” ou “negativas”, conforme a presença ou ausência do fungo, respectivamente. Os isolados de *Candida* observados em *CHROMagar<sup>TM</sup>Candida* foram quantificados e classificados por meio da morfologia e pigmentação das colônias de acordo com as instruções do fabricante (LEITE et al., 2015; JAHANSHIRI et al., 2018; ANDREOLA et al., 2016).

A identificação cromogênica de *Candida* permite a diferenciação das espécies por meio da coloração e da verificação do aspecto típico da colônia, sendo *C. albicans* identificada pela cor verde; *C. glabrata*, pela coloração rosa brilhante e lisa; *C. tropicalis*, pela cor azul metálico; *C. krusei*, pela cor rosa difuso e rugosa; e as demais espécies, pela cor branca à malva. A figura 1 ilustra o crescimento em placa de *Candida sp.* e *C. albicans* em meio *CHROMagar<sup>TM</sup>Candida* (Figura 1a e Figura 1b).

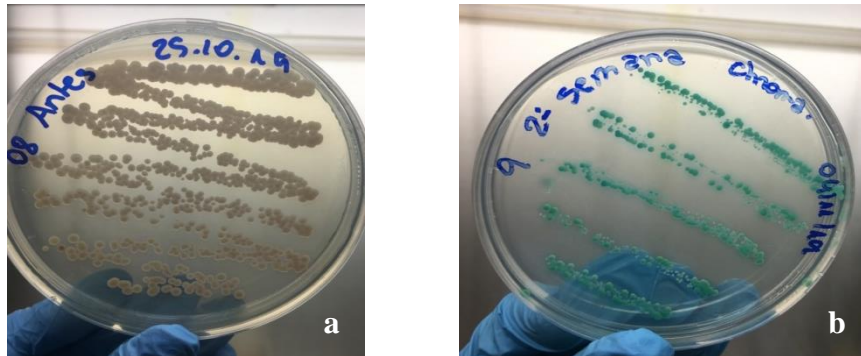


Figura 1- a) Crescimento de *Candida* sp. em CHROMagar<sup>TM</sup>Candida. b) Crescimento de *C. albicans* em CHROMagar<sup>TM</sup>Candida.

Após a identificação das espécies, cada espécie positiva para crescimento a 37° C no meio cromogênico foi inoculada em uma placa contendo o meio Ágar Saboraund dextrose - SDA (Figura 2), e levada à incubadora BOD a 37°C por 48 h. Este procedimento visa isolar e purificar as amostras. Por fim, após a verificação do crescimento puro das espécies, as amostras foram repicadas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura e levados novamente à incubadora BOD a 37°C por 48 h. Verificado o crescimento das colônias puras, os tubos foram preservados em baixa temperatura ( 2° C a 8° C).

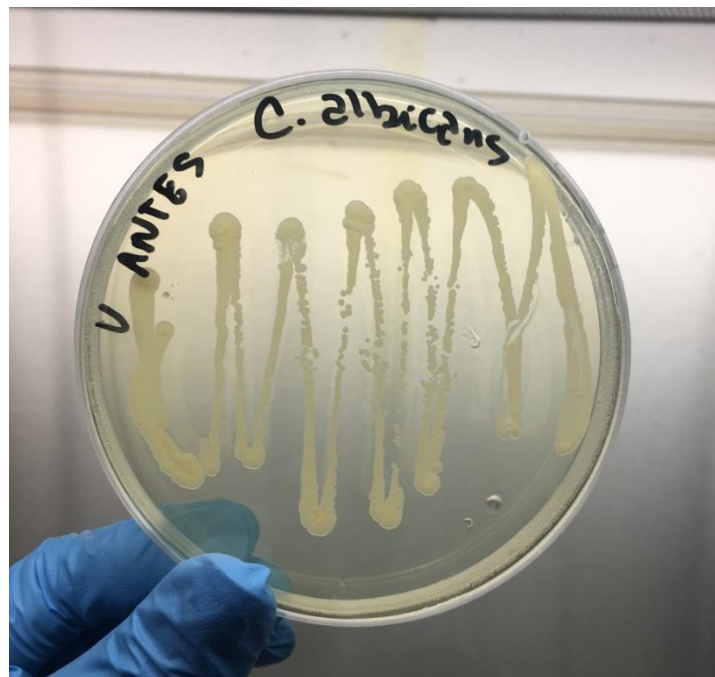


Figura 2- Colônias de *C. albicans* em SAB.

#### 4.7.4. Determinação dos fatores de virulência

Os fatores de virulência foram avaliados pelo crescimento a 37°C e pela produção de urease, proteinase, fosfolipase e hemolisina. Para todos os testes, foram inoculadas alçadas com 48 hs de crescimento a 37 °C na superfície do meio. Os testes de produção de proteinase, fosfolipase e hemolisina foram realizados em triplicata. A produção dessas enzimas foi observada pela formação de um halo de hemólise (atividade hemolítica), halo transparente (Proteinase) e halo opaco (fosfolipase) ao redor da colônia da levedura.

A atividade enzimática foi feita utilizando o valor da zona de precipitação (Pz) dado como a média dos diâmetros avaliados (colônia / halo + colônia) cuja classificação de acordo com o valor do Pz foi: atividade enzimática muito forte ++++ (Pz  $\leq$  0,69), forte +++ (Pz entre 0,70 – 0,79), média ++ (Pz entre 0,80 – 0,89) ou fraca + (Pz entre 0,90 – 0,99).

#### 4.7.5. Produção de proteinase

Utilizou-se o meio de cultura ágar-gelatina-leite descrito por Teixeira *et al.* (1996) para a avaliação qualitativa da produção de proteinase (Figura 3). O meio foi preparado nas concentrações de 1 g de ágar nutriente, 5 g de gelatina, 5 g de leite desnatado, 0,2 g de ágar para cada 100 ml de água destilada.

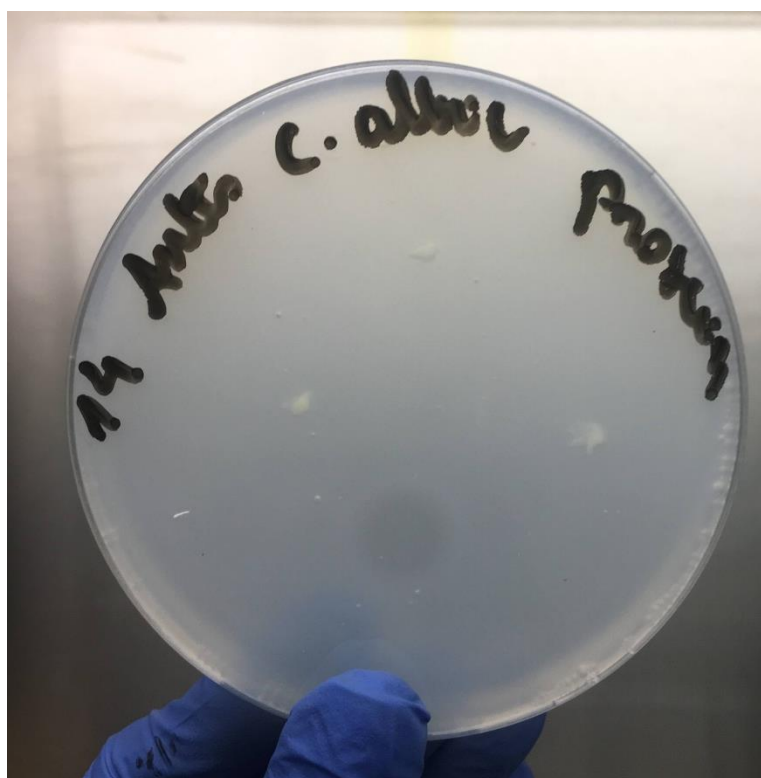


Figura 3- Colônias de *C. albicans* em triplicata em meio ágar-gelatina-leite, para o teste de produção de proteinase.

#### 4.7.6. Produção de Fosfolipase

O método em placa que utiliza como substrato gema de ovo descrito por Price *et al.* (1982) com modificações foi utilizado para a análise da produção de fosfolipase (Figura 4). O meio consistiu de 10 g de peptona, 58,5 g de cloreto de sódio, 0,55 g de cloreto de cálcio, 20 g de glicose, 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, 160 ml de emulsão de ovo para cada 840 ml de água destilada.

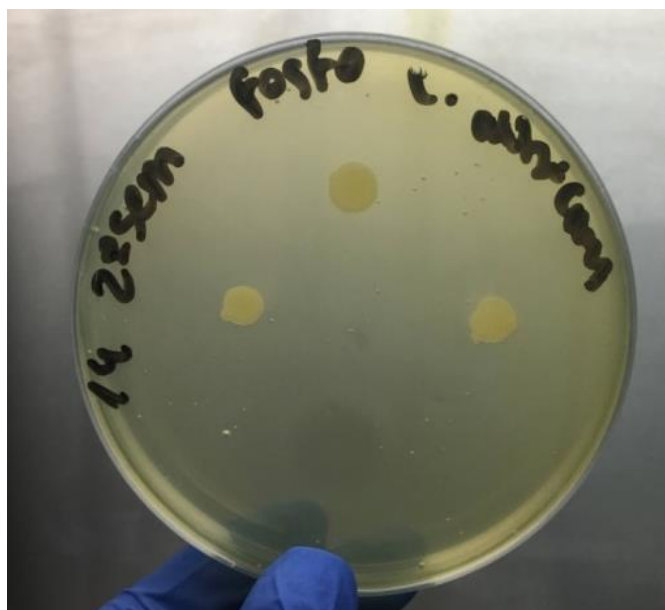


Figura 4- Culturas de *C. albicans* em triplicata em meio teste para produção de fosfolipase.

#### 4.7.7. Produção de Hemolisina

A produção de hemolisina foi realizada utilizando-se o método de Luo *et al.* (2001) com modificações. O meio foi preparado com 30 g de dextrose, 10 g de peptona, 15 g de ágar bacteriológico, 70 ml de sangue de carneiro por 1000 ml de água destilada. Foram feitos 3 *cup-plates* de 10 mm na superfície do ágar em cada placa de Petri (Figura 6). Uma porção da amostra foi cultivada por meio de uma alça de inoculação em 5 mL de água destilada esterilizada em tubo de ensaio e, em seguida, o preparo foi agitado em *Vortex* para homogeneização. Foram inoculados 10  $\mu$ L da suspensão de células com turvação ajustada a escala 1 MacFarland (Figura 5). As placas de Petri foram incubadas a 37°C durante 48 h.

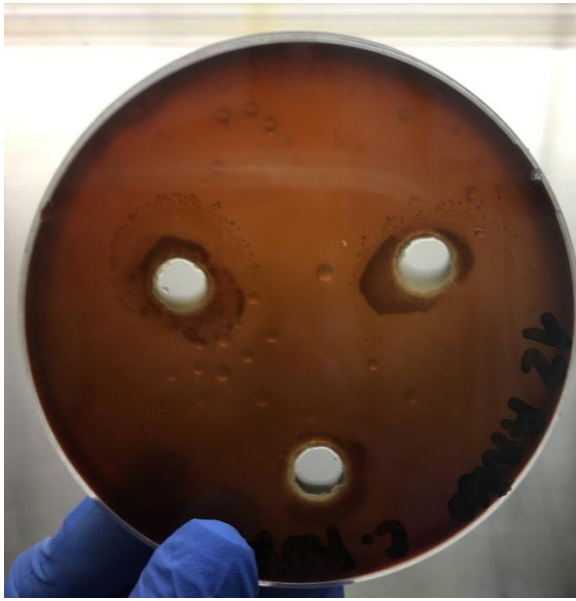


Figura 6- *Cup-plates* em ágar sangue.



Figura 5- Escala MacFarland

#### 4.7.8. Produção de ureáse

Para o teste da urease os isolados foram reativados e semeados em meio Agar Christensen (Agar uréia) que consistiu em 1 g de peptona, 1 g de glicose, 5 g de cloreto de sódio, 2 g de fosfato de potássio, 20 g de uréia, 0,012 mg de fenol vermelho, 20 g de ágar por 1000 ml de água destilada, o pH foi ajustado para 6,8 e logo após, foram incubados a temperatura de 37°C com leituras em 6h, 24h e sete dias. (LACAZ, 2002). Uma mudança na coloração do meio para vermelho- fúcsia devido à produção de amônia e consequentemente aumento do p indicaria um resultado positivo, quando não houve a mudança, a cultura foi considerada negativa (Figura 7).

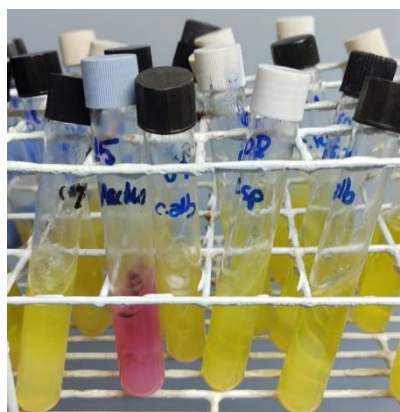


Figura 7- Amostra positiva para urease (meio vermelho- fúcsia) e amostras negativas (meio amarelo)

#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados foram tabulados no software Microsoft Office Excel, versão 2016. As variáveis categóricas idade, sexo, estado civil, profissão, raça, escolaridade, moradia, renda e procedência, foram descritas em tabelas. Da mesma forma, as variáveis estadiamento, diagnóstico, localização do tumor e manifestações orais do tratamento radioterápico.

Para a análise das UFCs, da produção de fatores de virulência e da dosagem de radiação foi utilizado um modelo de regressão, o modelo linear generalizado com efeitos mistos (GLMR, sigla em inglês) utilizando o indivíduo como efeito aleatório na segunda e quarta semana de tratamento radioterápico, essa análise foi realizada por meio do Software R. Considerou-se um nível de significância de 0,05.

#### **4.9 Aspectos Éticos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro Universitário do Norte (UNINORTE) com o parecer n° 3.483.267 em 02 de agosto de 2019 (Anexo I). As informações e dados obtidos de pacientes participantes dessa pesquisa foram utilizados apenas para fins acadêmicos.

## 5. Resultados

### 5.1 Descrição das características epidemiológicas

Neste estudo foram coletadas, a partir do palato, da mucosa jugal e do dorso de língua, espécimes clínicas de dezoito pacientes, sendo que, de onze deles, foram coletadas amostras em três intervalos de tempo: antes do tratamento, na segunda semana e na quarta semana de tratamento radioterápico.

Do total de pacientes avaliados, onze (61,1%) eram do sexo masculino e sete (38,9%) do sexo feminino. A média de idade foi de  $55,7 \pm 17$  anos. A maioria, oito (44,4%) dos pacientes eram procedentes do município de Manaus-AM, cinco (27,8%) de municípios do interior do Estado, quatro (22,2%) eram oriundos de outros Estados da federação e um (5,6%) era paciente estrangeiro. Quanto ao estado civil, dez (55,6%) declaram-se solteiros, cinco (27,8%) casados, dois (11%) amasiados (união estável) e um (5,6%) viúvos. Quanto à etnia, seis (33,3%) identificaram-se como brancos dez (55,6%), como pardos ou negros e dois (11,1%) como amarelos. Quanto à Escolaridade, sete (38,9%) referiram possuir o ensino médio completo, um (5,6%) o ensino médio incompleto, um (5,6%) o nível fundamental completo, seis (33,3%) o fundamental incompleto, um (5,6%) o nível superior incompleto e dois (11%) o superior completo. Quanto à moradia, dezesseis (88,9%) residiam em zona urbana e dois (11,1%) em zona rural. Com relação à renda mensal, um (5,6%) percebia renda inferior a um salário mínimo (SM), quinze (83,3%) entre um e três SM, um (5,6%) entre quatro e cinco SM e um (5,6%) mais que 5 SM. A tabela 1 mostra os dados sócio-demográficos dos dezoito pacientes avaliados.

Tabela 1- Dados sócio-demográficos da amostra inicial de 18 pacientes

<b>Dados Demográficos</b>		<b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	11 (61,1%)
	Feminino	7 (38,9%)
<b>Idade</b>	0-19	1 (5,6%)
	20-39	3 (16,7%)
	40-59	6 (33,3%)
	60 ou mais	8 (44,4%)
<b>Estado Civil</b>	Solteiro	5 (27,8%)
	Casado	3 (16,7%)
	Amasiado	2 (11,1%)
	Viúvo	1 (5,6%)

<b>Profissão</b>	Agente de endemias	1 (5,6%)
	Agricultor	2 (11,1%)
	Comerciante	1 (5,6%)
	Desempregado	1 (5,6%)
	Domestica	1 (5,6%)
	Dona de casa	1 (5,6%)
	Eletricista	1 (5,6%)
	Enfermeira	1 (5,6%)
	Estudante	2 (11,1%)
	Motorista	2 (11,1%)
	Pedagoga	1 (5,6%)
	Representante Comercial	1 (5,6%)
	Vigilante	2 (11,1%)
<b>Etnia</b>	Amarela	2 (11,1%)
	Branca	6 (33,3%)
	Parda/Negra	10 (55,6%)
<b>Escolaridade</b>	Fundamental Incompleto	2 (11,1%)
	Fundamental completo	1 (5,6%)
	Médio incompleto	1 (5,6%)
	Médio completo	7 (38,9%)
	Superior incompleto	1 (5,6%)
	Superior completo	2 (11,1%)
<b>Moradia</b>	Rural	2 (11,1%)
	Urbana	16 (88,9%)
<b>Renda</b>	Inferior a 1 SM	2 (11,1%)
	Entre 1 e 3 SM	14 (77,8%)
	Entre 3 e 5 SM	2 (11,1%)
	Superior a 5 SM	1 (5,6%)
<b>Procedência</b>	Caracas-Venezuela	1 (5,6%)
	Coari-AM	1 (5,6%)
	Goiânia-GO	1 (5,6%)
	Ipixuna-AM	1 (5,6%)
	Itacoatiara-AM	2 (11,1%)
	Itapipoca-CE	1 (5,6%)
	Manaus-AM	8 (44,4%)
	Oriximina-PA	3 (16,7%)

Os dados sócio-demográficos dos onze pacientes cujas amostras foram coletadas em três intervalos de tempo (antes, na segunda semana e na quarta semana de tratamento radioterápico), e que, portanto, tiveram as amostras laboratoriais utilizadas para avaliação da frequência e dos fatores de virulência, estão demonstrados na Tabela 2.



Tabela 2 - Dados sociodemográficos da amostra de 11 pacientes

	<b>Variáveis</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Sexo</b>	Masculino	6	(54,5%)
	Feminino	5	(45,5%)
<b>Idade</b>	20-39	1	(9,1%)
	40-59	6	(54,5%)
	60 ou mais	4	(36,4%)
<b>Estado Civil</b>	Solteiro	3	(27,3%)
	Casado	1	(9,1%)
	Amasiado	1	(9,1%)
	Viúvo	1	(9,1%)
<b>Profissão</b>	Agente de endemias	1	(9,1%)
	Agricultor	2	(18,2%)
	Comerciante	1	(9,1%)
	Dona de casa	1	(9,1%)
	Eletricista	1	(9,1%)
	Estudante	1	(9,1%)
	Pedagoga	1	(9,1%)
	Repres. Comercial	1	(9,1%)
	Vigilante	1	(9,1%)
<b>Raça</b>	Amarela	2	(18,2%)
	Branca	5	(45,5%)
	Parda	4	(36,4%)
<b>Escolaridade</b>	Fundamental Incompleto	3	(27,3%)
	Fundamental completo	1	(9,1%)
	Médio completo	5	(45,5%)
	Superior incompleto	1	(9,1%)
	Superior completo	1	(9,1%)
<b>Moradia</b>	Rural	2	(18,2%)
	Urbana	9	(81,8%)
<b>Renda</b>	Inferior a 1 SM	1	(9,1%)
	Entre 1 e 3 SM	8	(72,7%)
	Entre 3 e 5 SM	2	(18,2%)
	Superior a 5 SM	1	(9,1%)
<b>Procedência</b>	Goiânia-GO	1	(9,1%)
	Itacoatiara-AM	1	(9,1%)
	Itapipoca-CE	1	(9,1%)
	Manaus-AM	6	(54,5%)
	Oriximiná-PA	2	(18,2%)

## 5.2. Achados clínicos

### 5.2.1. Tabagismo e etilismo

Dos dezoito pacientes avaliados, mais da metade (55,6%) relataram tabagismo e oito (44,4%) declararam nunca ter fumado. Dos que referiram tabagismo, cinco (50%) eram do sexo masculino e cinco (50%) do sexo feminino. Observou-se câncer de laringe em cinco (50%) dos tabagistas. Metade dos pacientes declarou consumo de bebidas alcoólicas, sendo quatro desses (44,4%) eram do sexo masculino e cinco (55,6%) do sexo feminino. O câncer de laringe foi a neoplasia mais frequente entre os etilistas, afetando cinco (55,6%) dos participantes com esse hábito. Nove (50%) dos dezoito pacientes apresentaram associação entre tabagismo e etilismo, e destes, também cinco (55,6%) apresentaram câncer de laringe (Tabela 3).

Tabela 3- Localização dos tumores e associação de tabagismo e etilismo.

<b>Localização</b>	<b>n (%)</b>	<b>Fatores de Risco</b>	<b>n (%)</b>
<b>Boca</b>	6 (33,3%)	Tabagismo	2 (11,1%)
		Etilismo	2 (11,1%)
<b>Laringe</b>	6 (33,3%)	Tabagismo	5 (27,8%)
		Etilismo	5 (27,8%)
<b>Nasofaringe</b>	3 (16,7%)	Tabagismo	1 (5,6%)
		Etilismo	1 (5,6%)
<b>Orofaringe</b>	3 (16,7%)	Tabagismo	2 (11,1%)
		Etilismo	1 (5,6%)
<b>Total</b>	<b>18 (100,0%)</b>	<b>Tabagismo</b>	<b>10 (55,6%)</b>
		<b>Etilismo</b>	<b>9 (50,0%)</b>

### 5.2.2. Localização do tumor, diagnóstico e estadiamento

Aproximadamente sessenta e sete por cento dos tumores foram diagnosticados como Carcinoma Espinocelular. Quanto à localização, a laringe e a boca foram os sítios mais afetados com seis (33,3%) dos casos cada um, a nasofaringe seis (16,7%) e a orofaringe quatro (22,2%). Quanto ao estadiamento clínico, metade dos casos encontrava-se em estágio avançado, entre graus III (22,2%) e IV (27,8%), conforme demonstrado na Tabela 4. A Figura 8 mostra paciente com tumor em estágio avançado.



Figura 8- a) Assimetria de face de paciente com melanoma invasivo. b) Aspecto intrabucal do melanoma invasivo.

Os dados Clínicos dos onze pacientes cujas amostras foram coletadas em três intervalos de tempo (antes, na segunda semana e na quarta semana de tratamento radioterápico), e que, portanto, tiveram as amostras laboratoriais utilizadas para avaliação da frequência e dos fatores de virulência, estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 4 - Frequências de Localização do tumor, diagnóstico histológico e estadiamento da amostra inicial de 18 pacientes

Estadiamento		Localização				Diagnóstico				
Classificação	n (%)	Boca n (%)	Laringe n (%)	Nasofaringe n (%)	Orofaringe n (%)	CEC n (%)	CD n (%)	CAC n (%)	LAGC n (%)	Melanoma n (%)
<b>I</b>	1 (5,6%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>II</b>	2 (11,1%)	0 (0,0%)	2 (33,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>III</b>	6 (33,3%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	3 (25,0%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)
<b>IV</b>	5 (27,8%)	2 (33,3%)	1 (16,7%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	4 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Indeterminado</b>	4 (22,2%)	1 (16,7%)	1 (16,7%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	2 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>TOTAL</b>	18 (100,0%)	6 (33,3%)	6 (33,3%)	3 (16,7%)	3 (16,7%)	12 (66,7%)	1 (5,6%)	1 (5,6%)	1 (5,6%)	1 (5,6%)

Tabela 5 - Frequências de Localização do tumor, diagnóstico histológico e estadiamento da amostra de 11 pacientes

Estadiamento		Localização				Diagnóstico			
Classificação	n (%)	Boca n (%)	Laringe n (%)	Nasofaringe n (%)	Orofaringe n (%)	CEC n (%)	CD n (%)	CAC n (%)	Melanoma n (%)
<b>I</b>	1 (9,1%)	0 0,0%	1 (25,0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>II</b>	2 (18,2%)	0 0,0%	2 (50,0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (25,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>III</b>	4 (36,4%)	2 40,0%	1 (25,0%)	0 (0%)	1 (100%)	2 (25,0%)	1 (100%)	1 (100%)	0 (0%)
<b>IV</b>	2 (18,2%)	2 40,0%	0 (0,0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (25,0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Indeterminado</b>	2 (18,2%)	1 20,0%	0 (0,0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
<b>TOTAL</b>	11 (100%)	5 100%	4 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	8 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)

### 5.2.3. Manifestações clínicas bucais durante a radioterapia

Para essa avaliação foram utilizados os dados dos onze pacientes cujas informações abrangeram os três períodos de tempo: antes, a segunda semana e a quarta semana de tratamento. Os pacientes foram irradiados com uma dose média de  $25,75 \pm 8,28$  centigreys (cGy) na segunda semana e  $44,56 \pm 5$  cGy na quarta semana.

O uso de dispositivos protéticos foi observado em 36,4% dos pacientes. Antes de o tratamento ser instituído, não foram verificadas manifestações clínicas orais além de Candidíase pseudomembranosa, observada em apenas um (9%) paciente. Essa, por sua vez, era do sexo feminino, com diagnóstico de câncer de língua em estágio IV, não utilizava dispositivos protéticos e fazia uso de medicações xerostomizantes. Os sintomas orais foram mais expressivos durante a segunda semana de tratamentos, sendo a xerostomia e a disgeusia os mais frequentes, estando presentes em 90,9% dos pacientes avaliados. Já na quarta semana, a xerostomia foi observada em 90,9% dos pacientes, enquanto a disgeusia foi relatada por 72,7% deles. Na Tabela 6, mostra-se a comparação das manifestações orais na segunda e quarta semana de tratamento e na Tabela 7 expõe-se as manifestações clínicas de candidíase oral. A figura 9 ilustra um caso de mucosite e candidíase pseudomembranosa no palato de paciente com câncer de laringe submetida ao tratamento radioterápico há duas semanas; e a Figura 10, um caso de candidíase pseudomembranosa em palato de paciente com câncer de laringe na quarta semana do tratamento radioterápico.

Tabela 6 - Comparação das manifestações orais na segunda e quarta semana de tratamento

<b>Diagnóstico</b>	<b>2ª semana n (%)</b>	<b>4ª semana n (%)</b>
<b>Mucosite</b>	6 (54,5%)	0 (0,0%)
<b>Candidíase</b>	5 (45,5%)	1 (9,1%)
<b>Odinofagia</b>	7 (63,6%)	4 (36,4%)
<b>Disgeusia</b>	10 (90,9%)	8 (72,7%)
<b>Xerostomia</b>	10 (90,9%)	10 (90,9%)
<b>Disfagia</b>	9 (81,8%)	7 (63,6%)

Tabela 7 - Frequência de Candidíase Oral na segunda e quarta semana de tratamento radioterápico

Candidíase Oral	2 <sup>a</sup> semana	4 <sup>a</sup> semana
	n (%)	n (%)
Estomatite Protética	1 (20,0%)	0 (0%)
Pseudomembranosa	4 (80,0%)	1 (100%)
<b>Total</b>	<b>5 (100%)</b>	<b>1 (100%)</b>



Figura 9 - Mucosite e Candidíase pseudomembranosa em palato de paciente com câncer de laringe na segunda semana de tratamento.



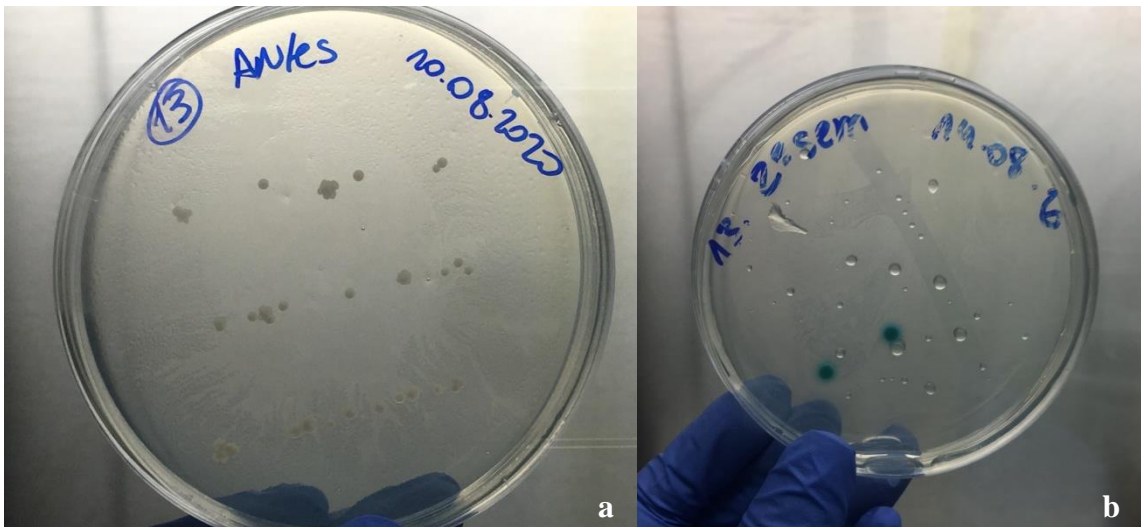
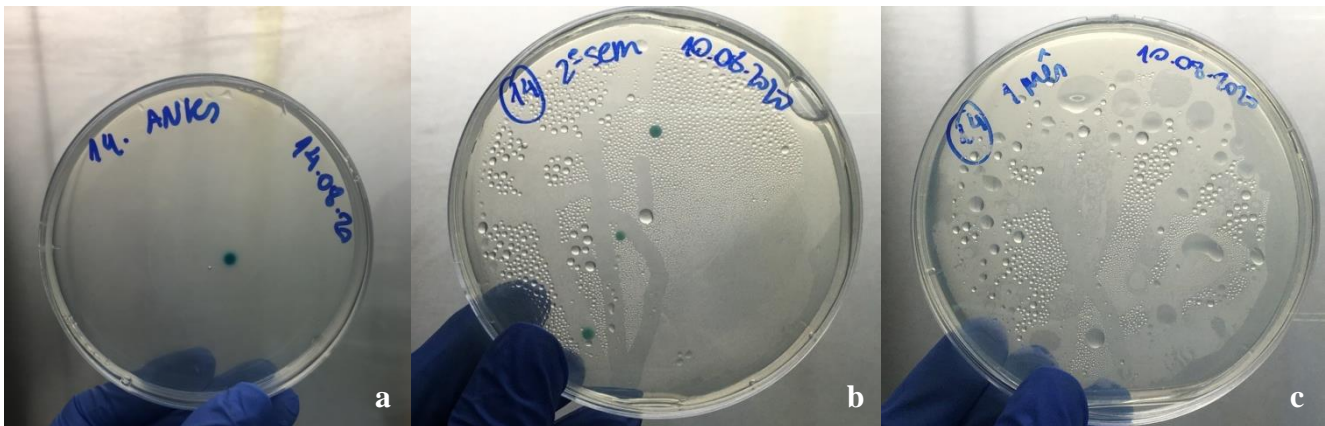
Figura 10 - Candidíase pseudomembranosa em palato de paciente com câncer de laringe na quarta semana de tratamento.

### 5.3. Crescimento a 37<sup>o</sup> C e identificação de leveduras na amostra inicial de 18 pacientes

O crescimento a 37<sup>o</sup> C foi verificado nas amostras de doze (66,7%) dos pacientes antes do tratamento radioterápico ser efetuado e *C. albicans* foi a espécie mais isolada (58,3%) (Tabela 8). As figuras abaixo mostram o crescimento a 37<sup>o</sup> C das leveduras isoladas em meio *CHROMagar<sup>TM</sup> Candida* (Figura 11; Figura 12; Figura 13; Figura 14).

Tabela 8 - Frequência de leveduras isoladas em *CHROMagar™ Candida* à 37°C

Isolamento de leveduras em cultura a 37°C	Espécie			
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Exophiala dermatitidis</i>
n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
12 (66,7%)	7 (58,3%)	1 (8,3%)	3 (25,0%)	1 (8,3%)

Figura 11- Crescimento em *CHROMagar™ Candida* de *Candida sp.* e *C. albicans* isoladas de um mesmo paciente antes (a) e na segunda semana de tratamento (b).Figura 12- Crescimento em *CHROMagar™ Candida* de *C. albicans* isoladas de um mesmo paciente nos três intervalos de tempo, antes(a), segunda semana(b) e quarta semana(c). Na quarta semana não houve crescimento.

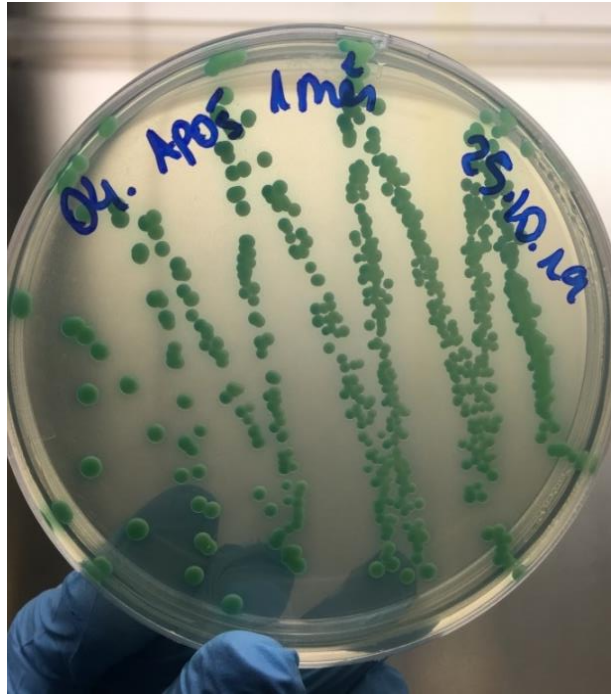


Figura 13- Crescimento de *C. albicans* em meio CHROMagar<sup>TM</sup> Candida de amostra de paciente coletada ao final da quarta semana de tratamento.

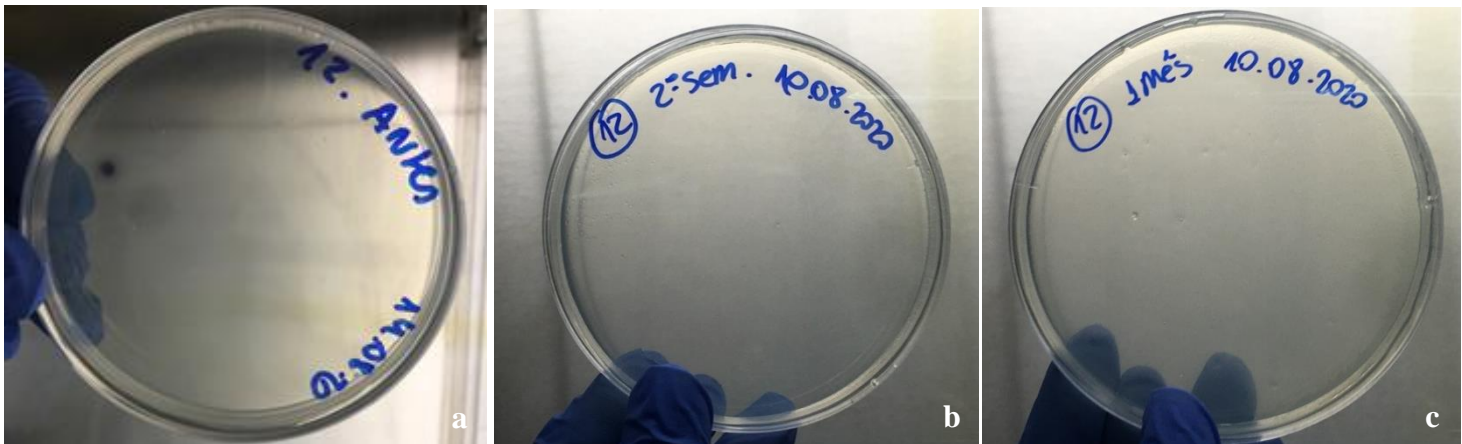


Figura 14- Meio CHROMagar<sup>TM</sup> Candida com amostras de paciente coletadas nos três períodos de tempo, antes(a), segunda semana(b) e quarta semana(c), mostrando crescimento positivo de *C. tropicalis* apenas antes do tratamento.

O Quadro 1 mostra as espécies de leveduras isoladas e a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em cada amostra coletada antes do tratamento radioterápico ser instituído.



<b>Amostra</b>	<b>Espécie</b>	<b>UFC</b>
FC001		0
FC002		0
FC003	<i>C. albicans</i>	120
FC004	<i>C. albicans</i>	62
FC005	<i>C. albicans</i>	246
FC006		0
FC007	<i>C. albicans</i>	20
FC008	<i>Candida sp</i>	620
FC009	<i>C. albicans</i>	650
FC010	<i>C. albicans</i>	442
FC011		0
FC012	<i>C. tropicalis</i>	1
FC013	<i>Candida sp</i>	28
FC014	<i>C. albicans</i>	1
FC015	<i>Exophiala dermatitidis</i>	84
FC016		0
FC017		0
FC018	<i>Candida sp</i>	95

Quadro 1 - Espécies de leveduras isoladas e a quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

Foram isoladas bactérias em meio SAB de algumas amostras negativas para o crescimento fúngico a 37° C e um caso de crescimento fúngico e bacteriano na mesma placa antes e na segunda semana de tratamento (Figura 15). Os espécimes bacterianos foram identificados por meio do método bioquímico EPM-MILi citrato. O Quadro 2 mostra as espécies identificadas. A figura 18 mostra o crescimento concomitante em meio *CHROMagar<sup>TM</sup>Candida* de *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*.

<b>Amostra</b>	<b>Espécies Bacterianas</b>
<b>FC001</b> (Antes)	<i>Klebsiela aerogenes</i>
<b>FC002</b> (Antes)	<i>Klebsiela aerogenes</i> e <i>Klebsiela pneumoniae</i>
<b>FC006</b> (Semana 4)	<i>Escherichia coli</i>
<b>FC007</b> (Semana 2)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>FC011</b> (Antes)	<i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Quadro 2 - Espécies bacterianas isoladas de amostras de pacientes negativas para crescimento fúngico.

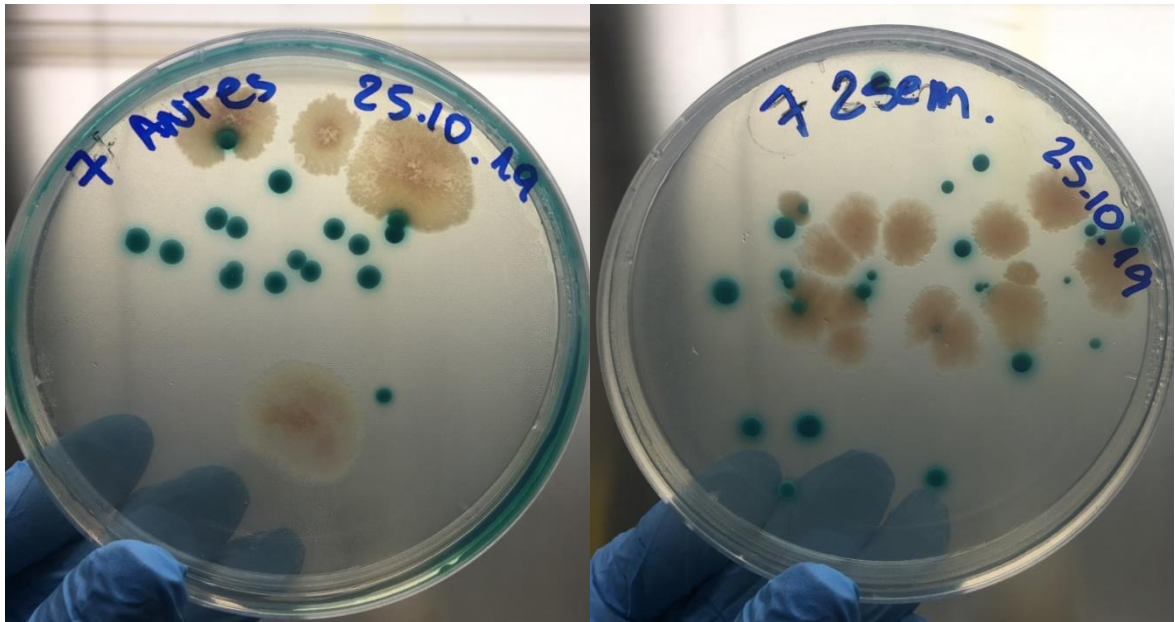


Figura 15- *Pseudomonas aeruginosa* isoladas concomitantemente à *C. albicans* em meio CHROMagar<sup>TM</sup> Candida. As amostras são de um mesmo paciente, coletadas antes e na segunda semana de tratamento.

#### 5.4. Crescimento a 37° C, identificação de leveduras e fatores de virulência Antes, na segunda semana e na quarta semana de tratamento.

Devido à Pandemia de COVID-19 foi possível a avaliação dos fatores de virulência apenas das amostras de onze pacientes. A Tabela 9 demonstra o crescimento a 37° C, a quantidade de unidades formadoras de colônia e as espécies identificadas em CHROMagar<sup>TM</sup> Candida antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento radioterápico. Considerando a amostra de onze pacientes *C. albicans* foi a espécie mais isolada sendo identificada em 54,5% das amostras antes, 45,5% na segunda semana e em 54,5% das amostras na quarta semana de tratamento.

Para as espécies não identificadas em CHROMagar<sup>TM</sup> Candida foi lançado mão do método molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando a metodologia de Taverna *et al.* (2013). Por esse método foi possível a identificação de *C. guillermondi* em uma das amostras. Já a Tabela 10 mostra o percentual das espécies isoladas antes, na segunda semana e na quarta semana de tratamento radioterápico.

Tabela 9 - Espécies identificadas em *CHROMagar™ Candida* antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento radioterápico e as respectivas UFC

Amostra	Antes		Segunda Semana		Quarta Semana	
	Espécie	UFC	Espécie	UFC	Espécie	UFC
1 (FC001)	0	0	<i>C. albicans</i>	200	<i>C.albicans e Candida.sp</i>	1,100
2 (FC004)	<i>C. albicans</i>	62	<i>Candida sp</i>	75	<i>C. albicans</i>	280
3 (FC005)	<i>C. albicans</i>	246	<i>C. albicans</i>	160		0
4 (FC006)	0	0		0		0
5 (FC007)	<i>C. albicans</i>	20	<i>C. albicans</i>	38	<i>C. albicans</i>	109
6 (FC008)	<i>Candida sp</i>	620	<i>C. albicans</i>	0		0
7 (FC009)	<i>C. albicans</i>	650	<i>C. albicans</i>	13	<i>C. albicans</i>	960
8 (FC010)	<i>C. guilliermondi*</i>	442		0	<i>C. albicans</i>	36
9 (FC011)	0	0		0	<i>C. albicans</i>	61
10 (FC012)	<i>C. tropicalis</i>	1			0	0
11 (FC014)	<i>C. albicans</i>	1	<i>C. albicans</i>	3	0	0

\*Espécie identificada por meio de método Molecular (PCR)

Tabela 10 - Frequência das espécies isoladas em *CHROMagar™ Candida* antes, na segunda semana e na quarta semana de tratamento radioterápico.

Período	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida sp</i>
	n (%)	n (%)	n (%)
Antes	6 (54,5%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)
Segunda Semana	6 (54,5%)	0 (0,0%)	1 (9,1%)
Quarta Semana	5 (45,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

Na investigação dos fatores de virulência, as amostras foram produtoras apenas de proteinase, tendo sido observada a produção em 45,5% das amostras antes do tratamento, 27,3% das amostras na segunda semana e em 27,3% das amostras na quarta semana de tratamento. Os Quadro 3, Quadro 4 e Quadro 5 mostram a produção de proteinase segundo espécies *Candida* antes, na segunda semana e na quarta semana de radioterapia respectivamente. A Figura 16 mostra o resultado do teste de produção de proteinase dos isolados de *C. tropicalis* e *C. albicans*.

<b>Antes</b>		
<b>Espécie</b>	<b>ID amostra</b>	<b>Proteinase</b>
<i>C. albicans</i>	FC004	0.2(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC005	
<i>C. albicans</i>	FC007	0.3 (muito forte)
<i>C. guilliermondi</i>	FC008	0.07(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC009	0.2(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC010	0.3(muito forte)
<i>C. tropicalis</i>	FC012	
<i>C. albicans</i>	FC014	

Quadro 3 - Produção de proteinase por espécie antes do tratamento radioterápico.

<b>Semana 2</b>		
<b>Espécie</b>	<b>ID amostra</b>	<b>Proteinase</b>
<i>C. albicans</i>	FC001	0.1(muito forte)
<i>Candida.sp</i>	FC004	
<i>C. albicans</i>	FC005	0.2(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC007	0.3(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC009	
<i>C. albicans</i>	FC014	

Quadro 4 - Produção de proteinase por espécie na segunda semana do tratamento radioterápico.

<b>Semana 4</b>		
<b>Espécie</b>	<b>ID amostra</b>	<b>Proteinase</b>
<i>C. albicans</i>	FC001	0.3(muito forte)
<i>Candida.sp</i>	FC001	0.3(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC004	
<i>C. albicans</i>	FC007	0.2(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC009	0.2(muito forte)
<i>C. albicans</i>	FC010	
<i>C. albicans</i>	FC011	

Quadro 5 - Produção de proteinase por espécie ao final da quarta semana do tratamento radioterápico.

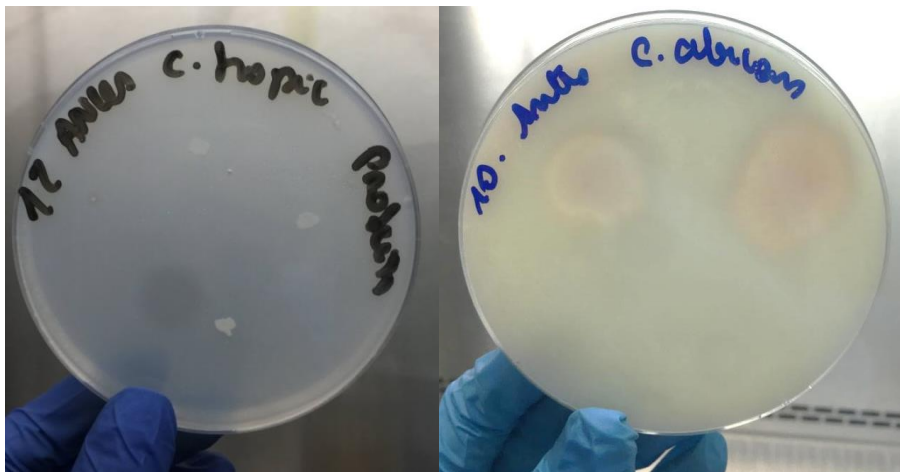


Figura 16 - Culturas em meio Ágar-gelatina-leite, teste negativo para produção de proteinase nas culturas de *C. tropicalis* e teste positivo na cultura de *C. albicans*.

O Gráfico 1 ilustra, sem análises, como as UFCs dispõem-se no tempo. Uma redução do valor médio de UFC pode ser observada na segunda semana seguida de um aumento na quarta semana. Já o Gráfico 2 ilustra, sem análises, como a produção de proteinase dispõe-se no tempo. Similar ao que se observou com as UFCs, há uma redução dos valores médios de produção na segunda semana seguida de um aumento na quarta semana. Como o valor da produção é calculado pelo Pz e quanto menor o valor mais forte é a produção de proteinase, pode-se inferir que, nesse caso, houve forte produção de proteinase na segunda semana de tratamento.

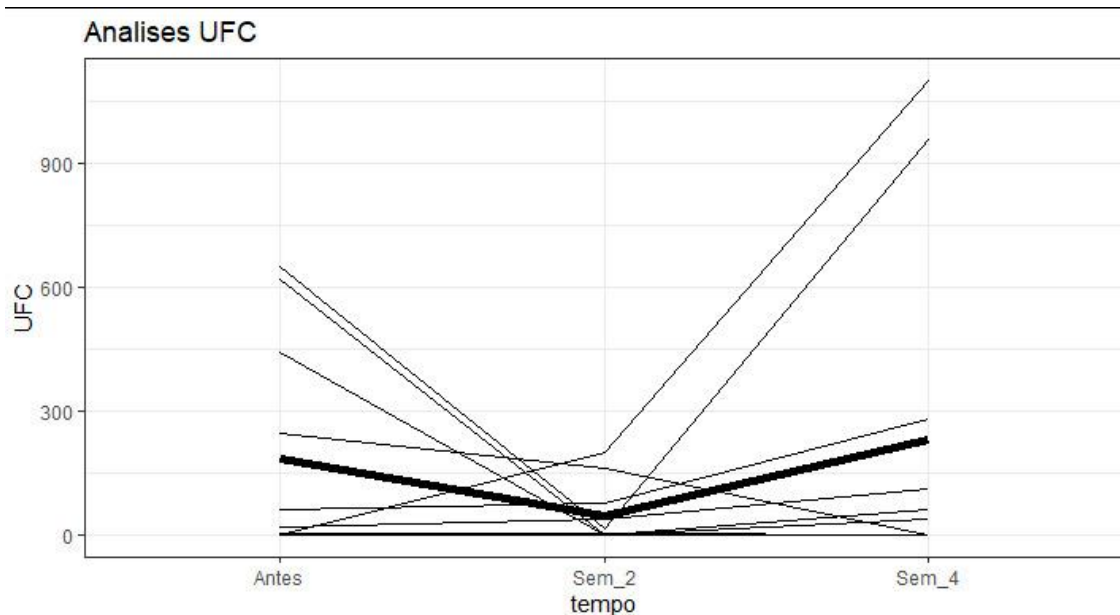


Gráfico 1 - UFC em função do tempo antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento.

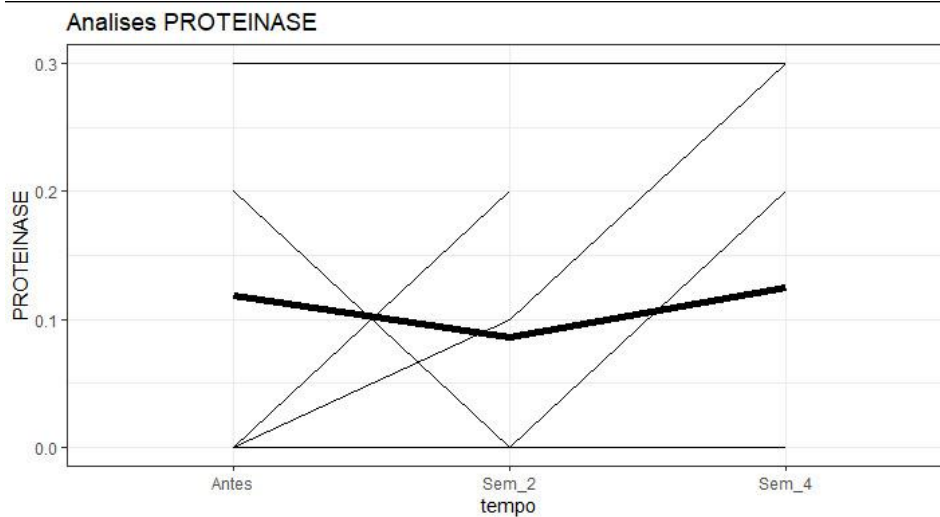


Gráfico 2 - Produção de proteinase em função do tempo antes, na segunda semana e quarta semana de tratamento.

### 5.5. Dosagem de Radiação x UFC

Nas análises geradas pelo Software R, utilizando o modelo de regressão linear misto e considerando o Indivíduo como efeito aleatório na segunda e quarta semana de tratamento, foi detectada diferença estatística entre dose de radiação e UFC conforme observado na tabela 13. A cada aumento de uma unidade de radiação, o valor médio de UFC tem um aumento de 0,132. Ou seja, com aumento da dose de radiação observou-se proporcional aumento nos valores médios de UFC.

Tabela 13 - Resultado da análise estatística para a relação dosagem de radiação e UFC utilizando o modelo de regressão misto considerando o Indivíduo como efeito aleatório.

<i>Preditores</i>	<i>Estimativas</i>	<b>UFC</b>		<i>p</i>
		<i>I.C. 95%</i>		
(Intercepto)	-311,3305	-647,6779	-25,0168	0,07
Dose de radiação	0,132	0,0390	0,2250	<b>0,005</b>
<b>Efeitos Aleatórios</b>				
$\sigma^2$	61735.21			
$\tau_{00 \text{ ID}}$	6331.57			
ICC	0.09			
$N_{\text{ID}}$	11			
Numero de observações	22			
$R^2$ Marginal / $R^2$ Condicional	0.254 / 0.323			

## 5.6. Dosagem de Radiação x Produção de Proteinase

O mesmo verificou-se para a produção de proteinase, cada aumento de uma unidade de radiação resultou no aumento de 0,00004 no valor médio da produção de proteinase. Ou seja, com o aumento da dose de radiação, observou-se um aumento proporcional nos valores médios da produção de proteinase, conforme demonstrado na tabela 14.

Tabela 14 - Resultado da análise estatística para a relação dosagem de radiação e produção de proteinase utilizando o modelo de regressão misto considerando o Indivíduo como efeito aleatório.

<i>Preditores</i>	<i>Estimativas</i>	<i>I.C. 95%</i>	<i>p</i>
(Intercepto)	-0,01631	-0,14812 – 0,11551	0,808
Dose de radiação	0,00004	0,00001 – 0,00007	<b>0,02</b>
<b>Efeitos Aleatórios</b>			
$\sigma^2$	0,00		
$\tau_{00 \text{ ID}}$	0,01		
ICC	0,75		
$N_{\text{ID}}$	9		
Numero de observações	15		
$R^2$ Marginal / $R^2$ Condicional	0.109 / 0.778		

## 6. Discussão

### 6.1. Descrição das características clínicas e epidemiológicas

Na casuística inicial de dezoito pacientes, foi observada média de idade de 55,7, +/- 17, anos em consonância com outros estudos (CHEN e WEBSTER, 1974; DENG et al., 2010; JHAM et al., 2007; AZIZE e REZAEI, 2009; DENG et al., 2010; SHRESTHA et al., 2014; AINAPUR et al., 2017; ROCHA et al., 2017; ALVARÉZ et al., 2020; NISHII et al., 2020) e maior prevalência de indivíduos do sexo masculino, corroborando com relatos de investigação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço que evidenciam o sexo masculino como o mais acometido (CHEN e WEBSTER, 1974; JHAM et al., 2007; AZIZE e REZAEI, 2009; DENG et al., 2010; SHRESTHA et al., 2014; AINAPUR et al., 2017; ROCHA et al., 2017; ALVARÉZ et al., 2020; NISHII et al., 2020). Acompanhando as mudanças relatadas nos últimos anos, verificou-se que 38,9% da casuística foi constituída por mulheres, apontando uma tendência de desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço em mulheres, o que se atribui a uma maior exposição aos fatores de risco tabagismo e etilismo. Nesse estudo, a maioria (55,6%) dos avaliados eram tabagistas, o que reforça a associação entre tabagismo e maior desenvolvimento de neoplasias cervicofaciais (DI CREDICO et al., 2019; GAŹDZICKA et al., 2019) e, destes, a metade foi do sexo feminino. As mulheres desse estudo foram maioria entre os participantes que declararam hábitos etilistas, o que vai de encontro com outros estudos que relatam maior frequência em homens (KAWAKITA e MATSUO, 2017; KAFOURI et al., 2018). Diferentemente do apontado na maior parte dos estudos já realizados que demonstram prevalência da etnia branca (ALVARENGA et al., 2008; NEVILLE, 2009), nosso estudo revelou prevalência da etnia parda/negra, o que pode ser explicado pela população do estudo apresentar intensa miscigenação. Resultado semelhante foi observado por Brener *et al.* 2006 e Santos *et al.* 2011, com prevalência de indivíduos feodermas em suas amostras da população brasileira. De acordo com Shrestha *et al.* 2014 e Tarapan *et al.* (2019), a boca foi o sítio mais afetado nas neoplasias de cabeça e pescoço; em nosso estudo, a boca e a laringe foram os sítios mais acometidos (33,3%) cada um, considerando a amostra inicial de dezoito pacientes. A alta prevalência de câncer de laringe observada em nossa casuística vai de encontro a Auperín,(2020) que, em estudo de atualização sobre epidemiologia dos cânceres de cabeça e pescoço, revelou uma redução nas taxas de incidência de câncer de laringe e nasofaringe em



todo o mundo entre 1990 e 2017. Vale ressaltar que mais da metade dos indivíduos avaliados nessa pesquisa declaram-se tabagistas e, segundo Berthiller *et al.* (2016), tal condição representa maior risco para câncer de hipofaringe e laringe. Nossos achados reforçam a importância da implementação de políticas de cessação do fumo.

Nos dois sítios prevalentes nesse estudo, laringe e cavidade oral, foi observada associação de hábitos tabagistas e etilistas, o que reforça a ideia de que a exposição simultânea ao tabaco e álcool poderia potencializar o desenvolvimento das neoplasias de cabeça e pescoço (MARZILIANO; TECKIE; DIEFENBACH, 2020; AUGUSTE *et al.*, 2020).

Essa pesquisa revelou ainda que a maioria dos indivíduos avaliados é moradora de área urbana. O nível de escolaridade prevalente foi o ensino médio completo, com renda entre um e três salários mínimos, procedentes em sua maioria da capital do Estado. Esses resultados apontam para uma maior frequência das neoplasias de cabeça e pescoço em indivíduos com grau de instrução e situação socioeconômica mais elevadas, diferente de outros estudos que associam um alto risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço a condições socioeconômicas desfavoráveis. O tamanho de nossa amostra permitiu-nos apenas descrever os dados sócio-demográficos, limitando a possibilidade de associações entre variáveis.

Conway *et al.* (2010) observaram que atividades ocupacionais manuais, renda baixa, classe social baixa, baixa escolaridade e desemprego tem relação com o maior risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Da mesma forma, Martins *et al.* (2014), em uma revisão sistemática, concluíram haver forte associação entre privação social, perfil socioeconômico, nível educacional e ocupação com câncer oral. Vale ressaltar que estudos que relacionam situações socioeconômicas e risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço são escassos, e que os medidores mais empregados são ocupação e escolaridade. Conway *et al.* (2015) observaram que a baixa renda e um menor tempo em anos de escolaridade representou um risco aumentado para o desenvolvimento da doença.

Em nossa casuística, apenas dois indivíduos residiam e desempenhavam atividades rurais relativas à agricultura. Eles apresentaram o ensino fundamental completo e incompleto como graus máximos de escolaridade. Esperava-se que um grau de instrução mais elevado estivesse relacionado ao diagnóstico precoce das neoplasias, porém não foi o que revelou nossa pesquisa, na qual, assim como a maioria dos estudos, evidenciou-se diagnóstico tardio da doença na maioria dos casos, estabelecido já nos estágios III e IV. A boca foi o sítio onde 50% dos casos foram diagnosticados no estágio III e 33,3% no estágio IV da classificação TNM.

## 6.2. Manifestações clínicas bucais na radioterapia

A radiação ionizante na região de cabeça e pescoço resulta em efeitos debilitantes que reduzem a qualidade de vida relacionada à saúde bucal dos pacientes, podendo ainda levar a complicações sistêmicas, aumentando o tempo de internação hospitalar e os custos do tratamento. Esses efeitos podem ser imediatos ou tardios em virtude do efeito cumulativo da radiação. As complicações agudas incluem mucosite, xerostomia, distúrbios do paladar e infecções fúngicas orais, já os agravos crônicos referem-se a trismo, cárie por radiação e osteorradionecrose (QUISPE et al., 2018).

A mucosite oral, definida como alteração da mucosa devido ao dano provocado pela radiação ionizante nos queratinócitos basais, é, segundo a maioria dos estudos (KUMAR et al., 2009), a complicação mais comum da radioterapia, desenvolvendo-se em 80-90% dos pacientes durante a fase inicial da radioterapia e persistindo 2 a 3 semanas pós-tratamento (ROGULJ et al., 2017). Bispo *et al.* (2018) observaram em sua amostra: mucosite (74,3%), disfagia (60 %), candidíase oral (40 %), disgeusia (22,85%) e xerostomia (14,28%).

Em nossa casuística, a mucosite oral foi observada a partir da segunda semana de tratamento radioterápico em 54,5% dos casos, no entanto, na quarta semana nenhum paciente avaliado apresentou mucosite, o que pode estar relacionado ao tratamento com laser de baixa intensidade - prática comum da equipe de odontologia hospitalar da FCECON. O laser de baixa intensidade é utilizado para tratamento da mucosite oral, com bons resultados clínicos e funcionais, reduzindo o quadro doloroso e favorecendo o processo de cicatrização (KELNER & CASTRO, 2006; FLORENTINO et al., 2016).

A xerostomia foi a complicação oral mais comum em nosso estudo e foi verificada a partir da segunda semana de tratamento radioterápico, após irradiação de 30 Gy. Ocorre devido às alterações induzidas pela radiação no parênquima das glândulas salivares maiores (BHANDARI et al., 2020). Em nosso estudo, a xerostomia esteve presente tanto na segunda (90,9%) quanto na quarta semana (90,9%) de tratamento. Resultado semelhante foi observado por Ahadian *et al.* (2017) que mostraram que, ao final da segunda semana, 100% dos pacientes apresentavam xerostomia que persistiu até o final do tratamento, no entanto, diferente de nossa casuística, observaram mucosite e candidíase oral na totalidade dos casos.

Floriano *et al.* (2017) observaram xerostomia (71,9%), mucosite (67,7%) e candidíase (32,3%). Kurnatowski *et al.* (2016) constataram que a dor, a disfagia e a odinofagia

insinuaram-se como as manifestações orais mais comuns da radioterapia e que se intensificaram com o passar das semanas de tratamento (6,98% antes, 58,1% na segunda semana e 82,1% na terceira semana do tratamento). Além disso, a mucosite esteve presente em todas as semanas de tratamento antes, na segunda semana, terceira semana e na sexta semana após a conclusão da radioterapia, com aumento progressivo da prevalência da segunda para terceira semana de tratamento e redução na sexta semana após a radioterapia. Nesse estudo não foi relatada xerostomia.

Em nossa casuística, odinofagia, disfagia e disgeusia estiveram presentes em 63,6%, 81,8% e 90,9% dos casos na segunda semana de tratamento, respectivamente, e em 36,4%, 63,6% e 72,7% dos casos na quarta semana de tratamento, respectivamente. A laserterapia, as medidas profiláticas como bochechos com clorexidina a 0,12% e com nistatina, bem como a melhora do quadro clínico dos pacientes avaliados podem estar relacionados à redução da sintomatologia na quarta semana de tratamento observada em nosso estudo. Embora tenha sido observada essa redução da sintomatologia oral, a mesma pode não ser estável e manter-se tardiamente ao tratamento, a exemplo do estudo de Baudalet et al. (2019) que observou para disfagia uma redução nos cinco primeiros anos pós-tratamento, mas aumento subsequente. Esse achado reforça as repercussões sobre a qualidade de vida dos pacientes irradiados, mesmo após o término do tratamento.

Com relação à candidíase oral como manifestação da radioterapia, os estudos, em sua maioria, têm apontado alta prevalência da doença no decorrer do tratamento em virtude das alterações na microbiota decorrentes da alteração do fluxo e qualidade salivar devido à hipossalivação ou ainda pela associação à mucosite radioinduzida que predispõe a infecções fúngicas e bacterianas. Nesses estudos, utilizou-se como critério de exclusão, além do uso recente de antibacterianos, o uso de antifúngicos. Contudo, em nosso estudo, não foi possível utilizar-se do uso prévio de antifúngicos como critério de exclusão, uma vez que o protocolo profilático institucional, aplicado a todos os pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço durante o tratamento radioterápico na FCECON, submeteu os participantes a bochechos com nistatina 5.000.000 UI/dia.

O protocolo profilático pode ter influenciado nos resultados encontrados no nosso estudo, uma vez que a nistatina é usada como medicamento tópico padrão para as infecções por *Candida*. Trata-se de um fungicida poliênico, cuja ação se dá pela ligação ao ergosterol da membrana plasmática do fungo aumentando a permeabilidade da membrana promovendo o extravasamento de componentes celulares essenciais, conduzindo à morte celular (CHANDRASEKAR, 2010); QUINDÓS et al., 2019).

Antes de o tratamento radioterápico ser instituído, observamos candidíase oral em apenas uma paciente do sexo feminino, com diagnóstico de câncer de língua em estágio IV; na segunda semana, cinco pacientes (45,5%) apresentaram candidíase oral, sendo 80% na forma Pseudomembranosa e 20% na forma de estomatite protética. Já na quarta semana, apenas um paciente (9%) apresentou candidíase oral, esta na forma pseudomembranosa. As duas manifestações clínicas mais comuns da candidíase reportadas em pacientes oncológicos são a pseudomembranosa e eritematosa (LALLA et al., 2010), ambas reportadas nesse estudo.

A redução da prevalência de candidíase oral em nosso estudo sugere a eficiência da nistatina como agente profilático da candidíase oral durante o tratamento radioterápico, tendo em vista que a maior parte dos estudos foi realizada na ausência de antifúngicos, evidenciando-se aumento da candidíase oral (RAMÍREZ-AMADOR et al., 1997; BELAZI et al., 2004; DE FREITAS et al., 2013; LONE et al., 2014; MADIYAL et al., 2016; SANTOS et al., 2018; JAHANSHIRI et al., 2018).

Há na literatura uma divergência na incidência de candidíase oral durante a radioterapia. Ahadian *et al.* (2017) relataram 100% de incidência; Thaweboon *et al.* (2008), 100%; Madiyal *et al.* (2016), 79%; Belazi *et al.* (2004), 76,9%; Raj *et al.* (2017), 57,14%; De Freitas *et al.* (2013), 55,4%; Jham *et al.* (2007), 52%; Rocha *et al.* (2018), 44%; Bispo *et al.* (2018), 40%; Lalla *et al.* (2010), 39,1%; Epstein *et al.*, (1993), 33,3%; Nishii *et al.*, (2019), 31%; e Redding *et al.*, (1999), 27%. A semelhança clínica entre a candidíase oral e hiperqueratose reacional da mucosa à radiação ionizante dificulta o diagnóstico clínico, podendo explicar a aparente divergência nos referidos trabalhos.

### **6.3. Leveduras identificadas e fatores de virulência no tratamento radioterápico**

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota oral normal. O equilíbrio entre a colonização e a infecção por *Candida* pode ser afetado pela imunossupressão e pela radioterapia empregada no tratamento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, além dos fatores relacionados à patogenicidade do próprio fungo. Ademais, nos últimos anos, tem-se observado uma mudança na epidemiologia de *Candida* nesses pacientes, que também vêm apresentando-se colonizados por *Candida* não *albicans*. Por sua vez, radioterapia causa danos no tecido da glândula salivar levando à hipossalivação, o que contribui para o crescimento excessivo de espécies fúngicas, portanto, existe uma clara relação entre hipossalivação e presença de candidíase (ALVARÉZ et al., 2020).

Foi feito neste estudo uma avaliação da frequência, a identificação de espécies e dos fatores de virulência de *Candida* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos em um centro de referência da cidade de Manaus-AM antes, durante e ao final da quarta semana do tratamento radioterápico. Em Março de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a Pandemia de COVID-19, com isso Países do mundo inteiro adotaram a paralisação das atividades consideradas não essenciais e o isolamento social na tentativa de conter a transmissão do Novo Coronavírus. Nesse contexto, embora tenham sido avaliados um total de dezoito pacientes, somente foi possível a avaliação nos três períodos de tempo de onze deles, a etapa de coleta dos dados foi interrompida devido à paralisação das atividades na FCECON e no ILMD em cumprimento do isolamento social. Os pacientes avaliados receberam uma dose média de  $25,75 \pm 8,28$  (cGy) na segunda semana e  $44,56 \pm 5$  cGy na quarta semana, dosagem essa que está de acordo com a dosagem média de outros estudos (BONAN et al., 2007; AINAPUR et al., 2017; RAJ et al., 2017; JAHANSHIRI et al., 2018; ALVARÉZ et al., 2020).

O crescimento de UFCs a 37° C foi observado em 72,7% das amostras antes do tratamento radioterápico, 63,6% das amostras na segunda semana e em 54,5% na quarta semana, considerando-se o a amostragem de onze pacientes. O maior percentual de espécies antes do tratamento vai ao encontro dos achados de Andrade et al. (2009) que, ao avaliarem fungos associados a tumores de cabeça e pescoço, identificaram como fungos predominantes na colonização: *C. albicans* e *C. parapsilosis*, além de *C. guilliermondi* e *C. tropicalis*. *Candida albicans* foi espécie mais isolada em nossos três períodos de avaliação, resultado superior ao observado por Jham et al. (2007) onde metade dos pacientes estavam colonizados por *C. albicans*, exclusivamente, por Suryawanshi et al. (2012) que também observaram que 26,16% dos pacientes eram micologicamente positivos para *Candida* antes da radioterapia, e por Alvaréz et al. (2020) que apontaram 45,8% de isolamento de *Candida* antes do tratamento.

A diferença no percentual pode estar relacionadas às metodologias de coleta das amostras. Alguns estudos utilizam o semeio direto por meio do *swab* e outros utilizam o método de enxague oral. Da mesma forma que neste estudo, Ramirez-Amador et al. (1997); Redding et al. (1999); Nicolatou-Galitis et al. (2001); Belazi et al. (2004); Suryawanshi et al. (2012); De Freitas et al. (2013); Ainapur et al. (2017); Jahanshiri et al. (2018); Shokohi et al. (2018); e Tarapan et al. (2019) observaram prevalência de *C. albicans*; entretanto, Jain et al. (2016) e Raj et al. (2017) observaram predominância da espécie *C. tropicalis* em seus isolados, 42,8% e 28,57%, respectivamente.

Em nosso estudo, embora em menor número, foram também isoladas as espécies *C. tropicalis* (9%, antes do tratamento), *C. guilliermondi* (9%, antes do tratamento) e *Candida* sp. (9%, na quarta semana), corroborando estudos afirmativos para isolamento de *Candida* não *albicans* em pacientes imunossuprimidos e irradiados na região de cabeça e pescoço. Belazi *et al.*, (2004) observaram *C. glabrata* (8%), *C. kefyr* (5%), *C. tropicalis* (3%), *C. krusei* (3%); Jain *et al.*, (2016) relataram *C. tropicalis* (42,8%); Jham *et al.*, (2007) reportaram *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. lusitanae*; Jahanshiri *et al.*, (2018) apontaram *C. tropicalis* (21.66%), *C. glabrata* (15%), *C. kefyr* (5%) e *C. dubliniensis* (1.66%); De Freitas *et al.* (2013) referiram *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* e *C. kefyr*. *C. tropicalis* foi isolado comum na maior parte dos estudos.

Shrestha *et al.* 2014, em um estudo caso controle, observaram presença de espécies *C. albicans* tanto nos pacientes em tratamento radioterápico quanto nos pacientes do grupo controle. Porém, notou que *Candida* não *albicans* identificadas foram somente isoladas nos pacientes irradiados, sugerindo a colonização por *Candida* não *albicans* nessas condições de imunossupressão e radioterapia. *Candida* não *albicans* isoladas nesses pacientes foram *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Da mesma forma, Patel *et al.* (2017) verificaram que usuários de próteses e pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentaram variabilidade de espécies de *Candida* quando comparados ao grupo controle. Embora tenhamos observado que a espécie *C. albicans* foi espécie isolada nos três períodos estudados, nosso desenho metodológico não permite prever se as espécies pertencem à mesma cepa ou a cepas diferentes, o que configura uma limitação do estudo.

Levando em consideração que todos os pacientes faziam uso de nistatina no decorrer das avaliações, aventa-se que isso esteja relacionado à redução nos valores médios das UFCs na segunda semana quando comparada à quarta semana de tratamento quando. Os estudos sugerem um aumento da colonização pela radioterapia (JHAM *et al.*, 2007; DAMBROSO *et al.*, 2009; SURYAWANSHI *et al.*, 2012; DE FREITAS *et al.*, 2013; SHRESTHA *et al.*, 2014; AINAPUR *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018; SHOKOHI *et al.*, 2018; ALVARÉZ *et al.*, 2020). Tais achados são corroborados pelo modelo de regressão linear misto utilizado neste estudo que detectou diferença estatística ( $p < 0,005$ ), apontando para um aumento dos valores médios de UFC a medida em que há aumento da dose de radiação.

Suryawanshi *et al.* (2012) observaram um aumento de  $100,24 \pm 59,11$  UFC antes da radioterapia para  $724 \pm 53,69$  UFC durante a radioterapia, considerando que o aumento

acentuado na segunda avaliação seria sugestivo de infecção por *Candida* durante a radioterapia. O aumento da colonização durante o tratamento radioterápico pode ser explicado pela hipossalivação após o comprometimento das glândulas salivares pela radiação. Müller *et al.* (2019) vão de encontro a esses achados; analisando as alterações microbiológicas da saliva de pacientes com câncer de cabeça e pescoço antes, durante e após a radioterapia, observaram que não houve alteração na população de *Candida*.

Esteve incluído nos objetivos deste estudo, a investigação dos fatores de virulência produzidos por *Candida* nos três períodos de tempo. Foram avaliadas a produção de proteinase e as atividades de fosfolipase, urease e hemolisina. Acredita-se que o aumento de infecções orais por *Candida* durante o tratamento radioterápico esteja relacionado, além das alterações no microambiente oral, aos fatores de virulência dos fungos.

Não foram identificadas em nossas amostras atividades de fosfolipase, hemolisina ou urease, porém, foi observada intensa produção de proteinase. Estudos consideram *C. tropicalis* e *C. glabrata* como as principais cepas emergentes no desenvolvimento de infecções em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (JHAM *et al.*, 2007; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW *et al.*, 2014). Porém, em nosso estudo, não foi isolada *C. glabrata*, além disso, os isolados de *C. tropicalis* não estiveram relacionados à produção de fatores de virulência. *C. guilliermondi* foi isolada antes do tratamento e apresentou o menor Pz (0,07), sendo classificada como muito forte produtora de proteinase. *C. guilliermondi* é espécie emergente associada à onicomicoses. Há escassez de estudos que avaliaram os fatores de virulência de *Candida* nas mesmas condições, tais trabalhos restringiram-se à colonização, o que dificulta a comparação de resultados.

Jahanshiri *et al.* (2018), utilizando a mesma metodologia, estudaram a produção de proteinase, fosfolipase e formação de biofilme de *Candida* em pacientes durante a radioterapia e verificaram que todos os isolados produziram biofilme e proteinase e 81,04% dos isolados foram produtores de fosfolipase. A maior produção de biofilme foi verificada nos isolados de *C. tropicalis*, além de alta produção de proteinase. Da Silva *et al.* (2017) corroboram os achados do grupo de Jahanshiri, verificando alterações na morfologia das colônias, maior aderência e formação de biofilme pós-irradiação de *C. tropicalis in vitro*. O estudo da equipe de Jahanshiri foi realizado sem a presença de antifúngicos. Em nosso estudo, isolou-se *C. tropicalis* apenas das amostras colhidas antes da radioterapia, o que sugere que esse fungo foi sensível à nistatina, confrontando os achados de Amorim (2012) que observou sensibilidade de *C. tropicalis* à nistatina e resistência ao fluconazol.

A maior parte de nossos isolados foram *C. albicans* fortemente produtoras de proteinase, com um aumento da produção observado na segunda semana de tratamento radioterápico, quando a dose média de radiação foi de 25,75 +- 8,28 centigreys (cGy), o que coincide com o período de redução do fluxo salivar e conseqüentemente a xerostomia que ocorrem após 1800 Gy (ROTHWELL, 1987). Ilkhanizadeh-Qomi *et al.* (2020) investigaram a atividade proteolítica de *C. albicans* isoladas de candidíase orofaríngea de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e tiveram como resultado atividade de proteinase em todas as cepas. Vinte e oito cepas (87,5%) apresentaram atividade potente de proteinase e quatro cepas (12,5%) atividade moderada. Ademais, a maioria dos isolados (53,1%) revelaram forte atividade de fosfolipase, onze (34,3%) isolados apresentaram atividade moderada de fosfolipase e quatro (12,5%) isolados não apresentaram atividade de fosfolipase.

Ramla, Sharma e Patel (2016), investigaram as propriedades de virulência e susceptibilidade antifúngica de *C. albicans* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante a terapia radioterápica em comparação a indivíduos saudáveis, e à semelhança de nosso estudo observou quantidades elevadas de *C. albicans* intensa atividade produtora de proteinase, além de variabilidade de *Candida* não *albicans* quando comparado ao grupo controle e produção intensa de fosfolipase em comparação aos indivíduos saudáveis este foi associado ao tempo de quimioterapia.

No que diz respeito à intensa atividade produtora de proteinase nos isolados de *Candida* frente à radioterapia na segunda semana de tratamento, nosso estudo está em consonância com os demais achados da literatura. O modelo de regressão linear misto considerando o indivíduo como efeito aleatório detectou diferença estatística entre dose de radiação e os valores médios de produção de proteinase ( $p < 0,02$ ). Na segunda semana de tratamento houve redução dos valores médios de PZ indicando maior produção de proteinase. Na quarta semana houve um aumento dos valores médios de Pz indicando menor produção de proteinase.

No entanto, na contramão dos demais estudos, não observamos atividade produtora de fosfolipase. Tal fator de virulência pode ter sido atenuado pela administração do antifúngico durante o tratamento. A exposição ao antifúngico parece não ter tanta influência na produção de proteinase na segunda semana de tratamento, visto que houve um aumento da produção nesse período, coincidindo com aumento da dosagem de radiação e com as manifestações clínicas de candidíase oral em 45,5% dos pacientes.



#### 6.4. Achado incidental de *Exophiala dermatitidis*

Durante a investigação de *Candida* neste estudo, foi isolada a levedura negra de *Exophiala dermatitidis* a partir da amostra inicial de dezoito pacientes, colhida em uma paciente, 61 anos, sexo feminino, parda, procedente de Caracas, Venezuela. A paciente recebeu o diagnóstico de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado em estágio IV localizado na orofaringe, amígdala palatina (Figura 17 A e B). Não apresentava histórico de tabagismo nem etilismo, tampouco doenças de base.



Figura 17- a e b- Aspecto clínico da lesão de carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado em estágio IV de origem em amígdala palatina.

O tratamento instituído foi apenas a radioterapia por meio do acelerador de partículas em 35 frações de 200 cGy. A amostra foi semeada em meio Chromagar *Candida* e cresceu na forma de levedura de coloração negra (Figura 18). Dessa forma, foi feito o sequenciamento de rDNA 18S que revelou se tratar de *Exophiala dermatitidis*. Foram aplicados testes de fatores de virulência para a produção de proteinase, fosfolipase, hemolisina e urease. O fungo demonstrou positividade para a produção de urease e negatividade para os demais fatores de virulência (Figura 19).

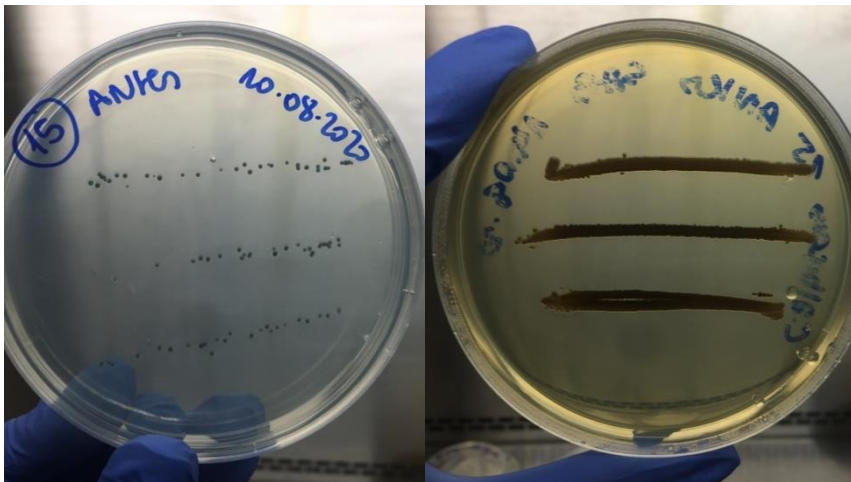


Figura 18- Amostras semeadas em meio Chromagar *Candida* (a) e em SAB (b). Foi observado crescimento leveduriforme de coloração negra.

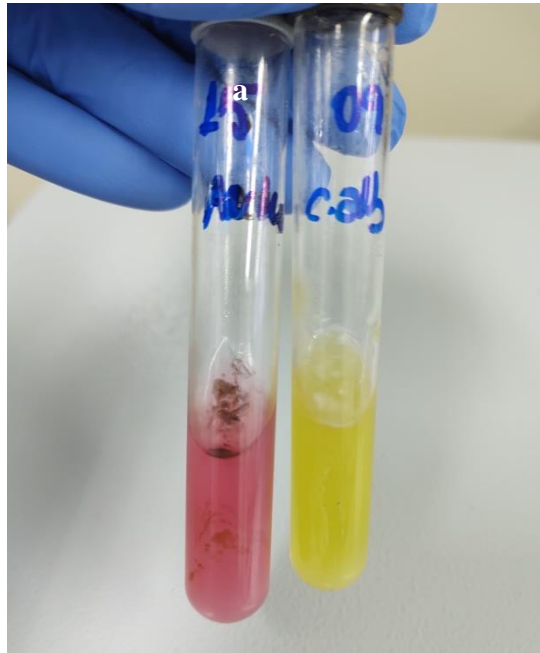


Figura 19- Cultura de *Exophiala dermatitidis* e *C. albicans* em ágar Christensen. Teste positivo para *E. dermatitidis* evidenciado pela mudança na coloração do meio para vermelho-fúcsia.

A incidência de doenças fúngicas é maior em indivíduos em situação de imunossupressão. Nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, a principal levedura relacionada às infecções é *Candida*, porém, nos últimos anos tem-se observado, concomitantemente aos isolados de *Candida*, o isolamento de outras espécies como *Aspergillus* e *Trichosporon* (KIGNEL e BIRMAN, 2000; BORAL et al., 2017). Em consonância, Andrade (2009) identificou feohifomicose associada a carcinoma de células escamosas de lábio. *Exophiala dermatitidis* é um patógeno oportunista causador de feohifomicose em pacientes imunossuprimidos e infecções do sistema nervoso de indivíduos saudáveis das regiões asiáticas, tendo sido primeiramente identificado na mucosa jugal de uma mulher japonesa em 1937 (KIRCHHOFF et al., 2019).

Esses fungos apresentam melanina em sua parede celular, o que lhe confere patogenicidade. São caracterizados por seu caráter dimórfico, podendo passar do estado de levedura para o estado de hifa (SAV et al., 2016; KIRCHHOFF et al., 2017; KIRCHHOFF et al., 2019). É raramente isolado do ambiente e acredita-se ter origem nas florestas tropicais (SUDHADHAM et al., 2008). Na região Amazônica, Alves (2015), em um estudo investigativo de fungos melanizados de amostras ambientais, isolou *Exophiala sp.* a partir de solo de floresta, folha de açazeiro e espinhos da planta Mari-fecha-a-porta e de Laranjeira. Souza (2020) observou a presença desse gênero em espinhos de limoeiro. *Exophiala*, com frequência, é encontrado colonizando o trato respiratório de pacientes com fibrose cística,

muito embora, na maioria das vezes, não conferindo sintomatologia alguma (KONDORI et al., 2011).

No caso aqui relatado, observamos o acometimento raro da região oral. Suspeitamos que deva-se à grande extensão do tumor que culminou com a proximidade à cavidade nasal. Outros estudos apontam para o isolamento desse gênero em máquinas de lavar louças (GUMRAL et al., 2016; ZUPANČIČ et al., 2016). Em micologia médica, as leveduras negras são mais associadas ao gênero *Exophiala* e a *Exophiala dermatitidis* é a espécie mais isolada.

As leveduras negras têm alcançado importância clínica nos últimos anos devido à sua capacidade de causar infecções superficiais, subcutâneas, cutâneas e, de forma mais rara, sistêmicas. Nos pacientes com câncer, pode ser isolada de forma concomitante a outras leveduras como *Candida*. Taj-Aldeen et al. (2006) isolaram *E. dermatitidis* do aspirado endotraqueal de uma paciente com câncer e portadora de doença pulmonar, a cultura revelou crescimento de *E. dermatitidis* e *Candida krusei*. Em nosso estudo, a cultura da amostra evidenciou crescimento apenas de *E. dermatitidis*.

A capacidade do fungo causar infecção, da mesma forma que para *Candida*, está relacionada à relação de equilíbrio entre a resposta imunológica do hospedeiro e os fatores de virulência do fungo. Vários estudos têm sido feitos no sentido de investigar os fatores de virulência das leveduras negras na tentativa de prevenir de infecções.

Sav et al. (2016), investigaram os fatores de virulência produção de urease, fosfolipase, DNase, catalase, proteinase, hemolisina e formação de biofilme de oito cepas clínicas e duzentos e dezoito amostras de máquina de lavar louças. A atividade de proteinase foi observada em quatro isolados de *E. dermatitidis* a partir das amostras coletadas em máquinas de lavar e em travessas de madeira; e atividade de DNase, em três isolados das amostras de máquinas de lavar. Nenhum dos isolados a partir de espécimes clínicos mostrou atividade de proteinase ou DNase. Nenhum dos isolados foi positivo para atividade de fosfolipase e todos foram positivas para urease e catalase, corroborando nosso estudo que foi positivo para urease e negativo para as demais atividades enzimáticas testadas. A urease é enzima catalizadora da hidrólise da ureia em ácido carbâmico e amoníaco, tóxicos para as células do hospedeiro.

Sav et al. (2016) também investigaram a produção de biofilme, observando que 70% dos isolados produtoras de biofilme, a partir das amostras da máquinas de lavar louças, eram compostos por *E. dermatitidis*, não sendo observada formação de biofilme nos isolados de amostras clínicas.

A formação de biofilme está relacionada à resistência aos antifúngicos, nesse sentido, Kirchhoff *et al.* (2017) investigaram a formação de biofilme de *E. dermatitidis* de isolados clínicos de pacientes com e sem FC, e isolados ambientais. Em comparação com *C. albicans*, 92% dos isolados clínicos produziram biofilme, e 36% dos isolados formaram biofilmes com uma biomassa igual ou superior à biomassa dos biofilmes formados por *C. albicans*, e ainda, os isolados de pacientes sem FC exibiram maior biomassa de biofilme quando comparados aos pacientes com FC.

Além disso, testaram atividade antibiofilme de substâncias naturais e sintéticas, e verificaram que, da mesma forma que para *Candida*, a micafungina exerceu melhor atividade antibiofilme contra *E. dermatitidis* que o voriconazol. Já o Farnesol, composto natural antimicrobiano, utilizado para inibir a formação de biofilme de *Candida*, não foi eficaz contra *E. dermatitidis*.

Em nosso estudo, não foi possível proceder à investigação da colonização e fatores de virulência de *E. dermatitidis* durante o tratamento radioterápico. Estudos nesse sentido são importantes para a implementação de protocolos profiláticos ou mesmo terapêuticos tendo em vista o aumento de estudos relatando isolamento desse fungo em pacientes imunocomprometidos.

A melanina presente na parede celular das leveduras negras é considerada um mecanismo de resistência frente à resposta imune do hospedeiro. Nesse sentido Schultzhaus *et al.* (2020) investigaram o papel da melanina na resistência à radiação gama e observaram que a melanina não confere resistência à radiação. Contudo, notaram que a sobrevivência à radiação é determinada por mudanças do estado metabólico anterior e atual das células, mecanismos de reparo do DNA, idade e densidade da cultura.

O mecanismo de resistência dos fungos à radiação ainda não é bem compreendido. Esses resultados talvez possam ser extrapolados para outros fungos como *Candida*, que, a exemplo de nosso estudo, esteve presente em amostras durante o tratamento radioterápico. Mais estudos são necessários para a compreensão de como a radiação age nos fungos. O direcionamento profilático e terapêutico adequado das manifestações fúngicas em pacientes em tratamento radioterápico depende do esclarecimento desse mecanismo.

Em suma, o achado incidental de *E. dermatitidis* aqui relatado indica que, embora *Candida* seja o gênero mais comumente encontrado colonizando a cavidade oral, em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, outras leveduras podem ser isoladas. *E. dermatitidis* foi capaz de crescer à 37° C e produzir urease, sugerindo habilidade adaptativa de causar infecções. Mais estudos são necessários para investigar a colonização e fatores de virulência dessa e de outras leveduras em pacientes submetidos a tratamento radioterápico.

## 7. Conclusões

- O perfil epidemiológico dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos na FCECON tem semelhança ao perfil observado na maior parte dos estudos no que diz respeito à predileção pelo sexo masculino e média de idade.
- Em contrapartida, quanto às variantes socioeconômicas os resultados apontaram para uma maior frequência das neoplasias de cabeça e pescoço em indivíduos com grau de instrução e situação socioeconômica um pouco mais elevados.
- O câncer de laringe e o de boca tiveram alta prevalência nos cânceres de cabeça e pescoço.
- O Carcinoma de Células escamosas foi o tipo histológico mais frequente entre os pacientes.
- O diagnóstico dos cânceres de cabeça e pescoço na cidade de Manaus-AM é feito de forma tardia, a maioria dos casos sendo diagnosticados nos estágios III e IV.
- Tabagismo esteve presente na maioria dos pacientes avaliados sugerindo que esse hábito representa um risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço.
- A radioterapia induz alterações na saúde bucal, aqui foram observadas mucosite, xerostomia, candidíase oral, odinofagia, disgeusia e disfagia.
- A xerostomia foi a complicação oral mais comum da radioterapia
- De forma geral, os efeitos da radioterapia na saúde bucal podem ser observados já na segunda semana de tratamento.
- Mucosite esteve presente na segunda semana de tratamento.
- Os estudos em sua maioria tem como resultado uma alta prevalência da Candidíase oral no decorrer do tratamento radioterápico.
- Embora tenha sido observada candidíase na segunda e quarta semana de tratamento esta foi pouco frequente, reforçando o sucesso na terapia profilática com nistatina aplicada a todos os pacientes.
- *Candida* está presente em tumores de cabeça e pescoço antes e no decorrer do tratamento radioterápico.
- Foram isoladas as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi* e *Candida sp.*
- *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos três períodos de tempo avaliados
- *Candida* não *albicans* estiveram presentes nos pacientes com câncer de cabeça pescoço com maior frequência antes do início do tratamento.

- Há aumento dos valores médios de UFC a medida em que há aumento da dose de radiação, ou seja, a radiação parece induzir uma maior colonização por *Candida*.
- Os isolados desse estudo foram forte produtores de proteinase, e *C. guillermondi* foi a espécie de maior atividade produtora.
- Os isolados foram produtores de proteinase nos três períodos de tempo avaliados.
- O modelo de regressão linear misto considerando o indivíduo como efeito aleatório detectou diferença estatística entre dose de radiação e os valores médios de produção de proteinase ( $p < 0,02$ ). Maior produção foi observada na segunda semana de tratamento em comparação à quarta semana.
- Outras espécies de leveduras com potencial de virulência podem ser isoladas de pacientes com Câncer de cabeça e pescoço.
- *E. dermatitidis* ocorre na cavidade oral de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

## 8. Considerações Finais

- Há uma escassez de estudos abordando fatores de virulência de espécies principalmente de *Candida* não *albicans* e outras leveduras colonizadoras da cavidade oral de pacientes com câncer de cabeça e pescoço durante a radioterapia.
- Dessa forma, este trabalho expõe a necessidade de estudos relacionados à colonização e infecção por *Candida* e outras leveduras durante o tratamento radioterápico. Uma maior compreensão do mecanismo de resistência dos fungos à radiação e produção de fatores de virulência nas mesmas condições também se faz necessária.
- Sugerimos que os pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço sejam avaliados periodicamente quanto à colonização e infecção fúngica na cavidade bucal para a implementação de medidas profiláticas.

## 9. Referências bibliográficas

- AHADIAN, H. et al. Oral Complications of The Oromaxillofacial Area Radiotherapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 3, mar. 2017.
- AINAPUR, M. M. A. R. et al. An *in vitro* study of isolation of candidal strains in oral squamous cell carcinoma patients undergoing radiation therapy and quantitative analysis of the various strains using CHROMagar. **J Oral Maxillofac Pathol.** v. 21, n. 1, p. 11-17, 2017.
- ALMEIDA, S. R.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Res.** p. 1000-1012. 2009.
- ALVARENGA, L. DE M. et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.** p. 6. 2008.
- ALVES, M. J. **Estudo de fungos melanizados em amostras ambientais de áreas rurais do Amazonas e avaliação da sua relação com os fungos melanizados causadores de micoses.** 2015. 102 f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia), Instituto Leônidas e Maria Deane/ FIOCRUZ e Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, 2015.
- ANDRADE, D. E. **Terapêutica medicamentosa em odontologia.** 3. ed. São Paulo . Artes Médicas, 2014.
- ANDREOLA, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219–226, 1 set. 2016.
- AOKI, S.; ITO KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; MASUHARA, T. Comparative pathogenicity of wild- types trains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **ZolBakt.** v. 273, p. 332-343.1990.
- ARAÚJO NETO, L. A.; TEIXEIRA, L. A. De doença da civilização a problema de saúde pública: câncer, sociedade e medicina brasileira no século XX. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 12, n. 1, p. 173–188, jan. 2017.
- AUGUSTE, A. et al. Joint effect of tobacco, alcohol, and oral HPV infection on head and neck cancer risk in the French West Indies. **Cancer Med.** v.9, n. 18, p. 6854-6863, 2020.
- AUPÉRIN, A. Epidemiology of head and neck cancers: an update. **Curr Opin Oncol.** v. 32, n. 3, p. 178-186, 2020.
- AZIZI A.; REZAEI, M. Prevalence of *Candida* species in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.** v.3, n. 3, p.78-81,2009.



BASCONES-MARTÍNEZ, A.; MUÑOZ-CORCUERA, M.; GÓMEZ-FONT, R. Efectos secundarios bucales de la radioterapia y quimioterapia en el cáncer en la región cervicofacial. **Medicina Clínica**, v. 141, n. 2, p. 77–81, jul. 2013.

BAUDELET, M. et al. Very late xerostomia, dysphagia, and neck fibrosis after head and neck radiotherapy. **Head Neck**. v. 41, n. 10, p. 3594-3603, 2019.

BELAZI, M. et al. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence,azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 6, p. 347–351, dez. 2004.

BEN-YOSEF, R.; ZEIRA, M.; POLACHECK, I. The effect of radiation therapy on fungal growth: results of *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Infection**, v. 50, n. 5, p. 450–452, jun. 2005.

BERTHILLER, J. et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. **Int J Epidemiol**. v. 45, n. 3, p. 835-45, 2016.

BHANDARI ,S. et al. Radiotherapy-induced oral morbidities in head and neck cancer patients. **Spec Care Dentist**. v. 40, n. 3, p. 238-250, 2020.

BISPO, M. S. et al. Frequência de comorbidades associadas ao tratamento radioterápico de cabeça e pescoço. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* v. 17, n. 2, p. 185-189, 2018.

BONAN, P. R. F. et al . Colonização e espécies de *Candida* em pacientes submetidos à radioterapia cervicofacial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 43, n. 6, p. 407-412, 2007 .

BOÑAR-ÁLVAREZ, P. et al. Assessment of saliva and oral candidiasis levels 12, 24 and 36 months after radiotherapy in patients with head and neck cancer. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg.**v. 20, p. 30228-7, 2020.

BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genet Biol**. v. 111, p. 92-107, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.439/GM, de 08 de dezembro de 2005. Institui a Política Nacional de Atenção Oncológica: promoção, prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação e cuidados paliativos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 76, Seção1, p. 80-81,09 dez., 2005.

BRASIL . **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2006.

BRASIL. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BRENER, S.; JEUNON, F.A.; BARBOSA, A. A, GRANDINETTI, H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras Cancerol**. v. 53, p. 63-69, 2007.

CAETANO, D. S. F et al. Limitation of mouth opening after radiotherapy for head and neck. **Rev Gaúch Odontol**. v.64, n.1, p. 24-29, jan./mar. 2016.

CAMPANA, G. I.; GOIATO, C. M. TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO. p. 7, 2013.

CASTELO BRANCO, P. V. G et al. Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com AIDS e indivíduos hígidos. **Revista de Patologia Tropical**.v.41, n. 4, p. 427-441, out/dez. 2012.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **J Antimicrob Chemother**. v. 66, n. 3, p. 457-65, 2011.

CHEN, T. Y.; WEBSTER, J. H. Oral Monilia study on patients with head and neck cancer during radiotherapy. **Cancer**. v. 34, p.246–249, 1974.

CONWAY, D. I. et al. Components of socioeconomic risk associated with head and neck cancer: a population-based case-control study in Scotland. **Br J Oral Maxillofac Surg**. v. 48, n. 1, p.11-7, 2010.

CONWAY, D. I. et al. Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. **Int J Cancer**. v. 136, n. 5, p.1125-39, 2015.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsd* or *ffiioleo*-resin. **Toxicon**, v.40, n.8, p.1231-4, 2002.

COX, G. M. et al. Urease as a Virulence Factor in Experimental Cryptococcosis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 443–448, 1 fev. 2000.

CURADO, M. P.; BOYLE, P. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol: **Current Opinion in Oncology**, p. 1, mar. 2013.

CURADO, M. P.; HASHIBE, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer: **Current Opinion in Oncology**, v. 21, n. 3, p. 194–200, maio 2009.

CURIONI, A. O et al. Valor do protocolo diagnóstico e terapêutico no tratamento do câncer da cabeça e pescoço no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, São Paulo. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**. v.41, n. 4, p. 159-162, outubro / novembro / dezembro. 2012.

DAMBROSO, D et al. Radioteraphy effect on frequency of *Candida* spp. and on virulence of *C. albicans* isolated from the oral cavity of head and neck câncer patients. **Rev Ciênc Farm Básica Aplic.** v. 30, n. 2, p. 153-159. 2009.

DA SILVA, E. M. et al. Radiation used for head and neck cancer increases virulence in *Candida tropicalis* isolated from a cancer patient. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 783, dez. 2017.

DE FREITAS, E. M. et al. Oral *Candida* species in head and neck cancer patients treated by radiotherapy. **Auris Nasus Larynx**, v. 40, n. 4, p. 400–404, ago. 2013.

DENG, Z. et al. Oral candidiasis in patients receiving radiation therapy for head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg.** v.143, p.242-247, 2010.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

DE ROSSI, T et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde.** v. 32, n. 1, p. 15-28, jan/jun, 2011.

DI CREDICO, G. et al. Joint effects of intensity and duration of cigarette smoking on the risk of head and neck cancer: A bivariate spline model approach. **Oral Oncology**, v. 94, p. 47–57, jul. 2019.

DE SOUZA, R. C. et al. Avaliação da ocorrência de fungos demáceos em espinhos de limoeiro-taiti (*citrus latifolia tanaka*) no município de Soure-Pa / Evaluation of the occurrence of demaceous fungus in spines of lemon-taiti (*citrus latifolia tanaka*) in Soure-Pa municipality. **Braz. J. Hea. Rev.** v. 3, n. 5, p. 14894-14910, 2020.

DOMINGOS, P. A. D. S.; PASSALACQUA, M. L. D. C.; DE OLIVEIRA, A. L. B. M. Câncer bucal: um problema de saúde pública. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 26, n. 1, p. 46, 28 nov. 2014.

DOURADO MARTINS, J. et al . Determinantes sociais de saúde e a ocorrência de câncer oral: uma revisão sistemática de literatura. **Rev. salud pública**, Bogotá , v. 16, n. 5, p. 786-798, 2014 .

EPSTEIN, B. J.; FREILICH, M. M. F.; LEE, N. D. Risk factors for oropharyngeal candidiasis in patients who receive radiation therapy for malignant conditions of the head and neck. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology.** v. 76, n. 2, p. 169- 174. august. 1993.

FILHO, M. R. DE M. et al. Quality of life of patients with head and neck cancer. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 1, p. 82–88, jan. 2013.

FLORENTINO, A. C. A. et al. Tratamento da mucosite oral com laser de baixa potência: revisão sistemática da literatura. **Rev. Ciênc. Med.** v. 24, n. 2, p. 85-92, 2015.

FLORIANO, D. D. F. et al. Complicações orais em pacientes tratados com radioterapia ou quimioterapia em um hospital de Santa Catarina. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 29, n. 3, p. 230, 26 jul. 2018.

FOURIE, R. et al. Iron at the Centre of *Candida albicans* Interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 185, 5 jun. 2018.

FREITAS, D. A. et al. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista CEFAC**, v. 13, n. 6, p. 1103–1108, 15 jul. 2011.

GAZDZICKA, A. L. S. et al. Epigenetic modifications in head and neck cancer. **Biochem Genet.** v. 58, p. 213-244, 2020.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239–247, mar. 2013.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, jun. 2010.

GÓMEZ, G. J. Á. et al. Alteraciones en la cavidad bucal en pacientes tratados con radioterapia de cabeza y cuello. Medellín, Colombia. **Revista Odontológica Mexicana**. v. 21, n. 2, p. 87-97. 2017.

GUMRAL, R. et al. Dishwashers provide a selective extreme environment for human-opportunistic yeast-like fungi. **Fungal Divers.** v. 76, p. 1–9, 2006

HOLMES, V. S. T et al. Factores relacionados com la aparición y la clasificación de la mucositis oral inducida por la radiación. **Revista Cubana de Estomatología**. v. 51, n. 1, p. 71-79. 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Institucional**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/institucional>. Acesso em: 18 mai. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que é câncer?** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 20 jun. 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Tratamento do câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento/radioterapia>. Acesso em: 8 jul. 2019.

ILKHANIZADEH-QOMI, M. et al. Aspartyl Proteinase and Phospholipase Activities of *Candida albicans* Isolated From Oropharyngeal Candidiasis in Head and Neck Cancer Patients. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v.13, n. 9,p. e10522, 2020.

JAHANSHIRI, Z. et al. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p. 361–366, jun. 2018.

JAIN, M. et al. The Oral Carriage of Candida in Oral Cancer Patients of Indian Origin Undergoing Radiotherapy and/or Chemotherapy. *J Clin Diagn Res.*v.10, n. 2, p. ZC17-ZC20, 2016.

JHAM, B. C. et al. Candida oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. **Oral Surg Oral Med Oral Patjol Oral Radiol Endod.** V. 103, p. 355-358, 2010.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, mar. 2011.

KAWAKITA, D.; MATSUO, K. Alcohol and head and neck câncer. **Cancer Metastasis Rev.** v. 36, p. 425-434, 2017.

KELNER, N.; CASTRO, J. F. L. Laser de baixa intensidade no tratamento da mucosite oral induzida pela radioterapia: relato de casos clínicos. **Rev Bras Cancerol.** v.53, n. 1, p. 29-33, 2007.

KFOURI, S. A. et al . Fração de câncer de cabeça e pescoço atribuível ao tabaco e ao álcool em cidades de três regiões brasileiras. **Rev. bras. epidemiol.** v. 21, 2018 .

KIGNEL, S.; BIRMAN, G. E. Aspectos fúngicos do câncer bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.46, n. 3,p. 279-282. 2000.

KIRCHHOFF, L. et al. Biofilm formation of the black yeast-like fungus *ExopHiala dermatitidis* and its susceptibility to antiinfective agents. **Sci Rep.** v. 7, p. 42886, 2017.

KIRCHHOFF, L. et al. *ExopHiala dermatitidis*: Key issues of an opportunistic fungal pathogen. **Virulence.** v. 10, n. 1, p. 984-998, 2019.

KOGA-ITO, C. Y. et al. Virulence Factors and Antifungal Susceptibility of Candida *albicans* Isolates from Oral Candidosis Patients and Control Individuals. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 219–223, abr. 2006.

KONDORI, N. et al. High rate of Exophiala dermatitidis recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. **J Clin Microbiol.** v. 49, n. 3, p. 1004-9, 2011.

KURNATOWSKI, P.; MOQBIL, S.; KACZMARCZYK, D. Signs, symptoms and the prevalence of fungi detected from the oral cavity and pharynx of radiotherapy subjects with head and neck tumors, and their susceptibility to chemotherapeutics. **Ann Parasitol.** v. 60, n. 3, p. 207-13, 2014.

LACAZ, C. D. A et al. **Tratado de micologia médica.**9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LALLA, R. V. et al. A systematic review of oral fungal infections in patients receiving cancer therapy. **Support Care Cancer.** v. 18, n. 8, p. 985-92, 2010.

- LEE, I. R.; MORROW, C. A.; FRASER, J. A. Nitrogen regulation of virulence in clinically prevalent fungal pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 345, n. 2, p. 77–84, ago. 2013.
- LEITE, D.P.; PIVA, M.R.; FILHO, P.R.S. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 44, n. 1, p. 12-17, 2015.
- LINARES, C. E. B. et al. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 203–206, ago. 2007.
- LONE, M. S. et al. Oral *Candida* colonization and infection in cancer patients and their antifungal susceptibility in a tertiary care hospital. **Int. J. of Adv. Res.** v. 2, n. 5, p. 541-550, 2014.
- MADIYAL, M. K. et al. Clinical and microbiological profile of *Candida* isolates from oral candidiasis in patients undergoing radiotherapy for head and neck malignancy. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 9, n. 9, p. 197-200, 2016.
- MANNS, M.J.; MOSSER, M. D.; BUCKLEY, R. H. Production of Hemolytic Factor by *Candida albicans*. **Infection and Immunity**. v. 62, n. 1, p. 5154-5156. 1994.
- MARTA, N. G et al. Câncer de cabeça e pescoço e radioterapia: breve contextualização. **Diagn Tratamento**. v. 16, n. 3, p. 134-136. 2011.
- MARTA, N. G. Radiobiologia: princípios básicos aplicados à prática clínica. **Diagn Tratamento**. v. 19, n. 1, p. 45-47. 2014.
- MARZILIANO, A.; TECKIE, S.; DIEFENBACH, M. A. Alcohol-related head and neck cancer: Summary of the literature. **Head Neck**. v. 42, n. 4, p. 732-738, 2020.
- MONDEN, N. et al. A review of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition). **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 49, n. 7, p. 589–595, 1 jul. 2019.
- Müller, V. J. et al. Change of saliva composition with radiotherapy. **Archives of Oral Biology**. v.106,p. 104480, 2019.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 400–428, 1 set. 2003.
- NEVILLE, B. W et al. **Patologia oral e Maxilofacial**. 5 ed. Rio de Janeiro:Elsevier,2009.
- NICOLATOU-GALITIS, O. et al. Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. **J Oral Pathol Med**. v. 30, n. 8, p. 471-80, 2001.

NICOLATOU-GALITIS, O. et al. Oral candidiasis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy with amifostine cytoprotection. **Oral Oncology**, v. 39, n. 4, p. 397–401, jun. 2003.

NICOLATOU-GALITIS, O. Oral Mucositis, Pain and Xerostomia in 135 Head and Neck Cancer Patients Receiving Radiotherapy with or without Chemotherapy. **The Open Cancer Journal**, v. 4, n. 1, p. 7–17, 31 mar. 2011.

NISHII, M. et al. Factors associated with severe oral mucositis and candidiasis in patients undergoing radiotherapy for oral and oropharyngeal carcinomas: a retrospective multicenter study of 326 patients. **Support Care Cancer**. v. 28, n. 3, p. 1069-1075, 2020.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 185–200, 2013.

PAIVA, B. E. D. M et al. Complicações orais decorrentes da terapia antineoplásica. **Arquivos em Odontologia**. v.46, n. 1, janeiro/março. 2010.

PEIXOTO, V. J et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v. 8, n. 2, p. 75-82, jun-ago. 2014.

PINTO, M.; UGÁ, M. A. D. Custo do tratamento de pacientes com histórico de tabagismo em hospital especializado em câncer. **Rev Saúde Pública**. v. 45, n. 3, p. 575-82, 2011.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.20, n.7, 1982.

PROCOP, G. W.; ANDERSON-DAVIS, H.; VOLZ, P. A. Cobalt 60 Radiation and Growth of *Candida* Species/Kobalt-60-Bestrahlung und das Wachstum von *Candida*-Arten. **Mycoses**, v. 31, n. 9, p. 466–470, 24 abr. 2009.

QUINDÓS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v. 24, n. 2, p. e172-e180, 2019.

QUISPE, R. A. et al. Case-control study of oral disease indexes in individuals with head and neck cancer after antineoplastic therapy. **Einstein (São Paulo)**, v. 16, n. 3, 6 ago. 2018.

RAJ, S. et al. A study of changes in the oral fungal flora of patients on radiotherapy for head and neck malignancies and their correlation with funguria and fungemia. **Indian J Cancer**. v. 54, n. 1, p. 39-42, 2017.

RAMIREZ-AMADOR, V. et al. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 84, n. 2, p. 149–153, ago. 1997.

RAMLA, S.; SHARMA, V.; PATEL, M. Influence of cancer treatment on the *Candida albicans* isolated from the oral cavities of cancer patients. **Supportive Care in Cancer**, v. 24, n. 6, p. 2429–2436, jun. 2016.

RAY-CHAUDHURI, A.; SHAH, K.; PORTER, R. J. The oral management of patients who have received radiotherapy to the head and neck region. **British Dental Journal**, v. 214, n. 8, p. 387–393, abr. 2013.

REDDING, S. W. et al. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. **J Clin Microbiol**. v. 37, n. 12, p. 3896-3900, 1999.

REDDING, S. W. et al. *Candida dubliniensis* in radiation-induced oropharyngeal candidiasis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 91, n. 6, p. 659–662, jun. 2001.

REDDING, S. W. The role of yeasts other than *Candida albicans* in oropharyngeal candidiasis: **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 673–677, dez. 2001.

REDDING, S. W. et al. *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 97, n. 1, p. 47–52, jan. 2004.

ROCHA, F.G.C.W. et al. Ocorrência de candidíase oral em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço submetidos aos tratamentos antineoplásicos. **Rev Ciênc Méd Biol**. v. 16,n. 3, p. 318-322, 2017.

ROGULJ, A. A. et al. Oral complications of head and neck irradiation. **Libri Oncol**. v. 45, v. 2-3, p. 89–93, 2017.

ROLIM, A. E. H.; COSTA, L. J. DA; RAMALHO, L. M. P. Repercussões da radioterapia na região orofacial e seu tratamento. **Radiologia Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 388–395, dez. 2011.

ROSSONI, R. D. et al. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **Brazilian Oral Research**, v. 27, n. 6, p. 484–489, dez. 2013.

ROTHWELL, B. R. Prevention and treatment of the orofacial complications of radiotherapy. **The Journal of the American Dental Association**, v. 114, n. 3, p. 316–322, mar. 1987.

RUTHERFORD, J. C. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 5, p. e1004062, 15 maio 2014.

SANTOS, C. C. et al. Condutas práticas e efetivas recomendadas ao cirurgião dentista no tratamento pré, trans e pós câncer bucal. **J Health Sci Inst**. v. 31, n. 4, p. 368-72, 2013.

SANTOS, P. S. S. et al. The impact of oral health on quality of life in individuals with head and neck cancer after radiotherapy: the importance of dentistry in psychosocial issues. **Acta Odontol. Latinoam.**, v. 30, p. 6, 2017.

SARI, J.; NASILOSKI, K. S.; GOMES, A. P. N. Oral complications in patients receiving head and neck radiation therapy: a literature review. **RGO - Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 62, n. 4, p. 395–400, dez. 2014.

SAV, H. et al. Virulence markers of opportunistic black yeast in *Exophiala*. **Mycoses**. v. 59, n. 6, p. 343-50, 2016.



SCHULTZHAUS, Z. et al. The response of the melanized yeast *Exophiala dermatitidis* to gamma radiation exposure. **Environmental Microbiology**.v. 22, n. 4, p. 1310-1326, 2020.

SHOKOHI, T. et al. *Candida infanticola* and *Candida spencermartinsiae* yeasts: Possible emerging species in cancer patients. **Microb Pathog**. v.115, p. 353-357, 2018.

SHRESTHA, M. et al. An assessment of candidal colonization and species differentiation in head and neck cancer patients receiving radiation. **J Nepal Health Res Council**. v. 12, n. 28, p. 156-61, 2014.

SIDRIM J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan p. 265-274. 2004.

SILVEIRA, A. et al. Oncologia de Cabeça e Pescoço: enquadramento epidemiológico e clínico na avaliação da Qualidade de Vida Relacionada com a Saúde. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 15, n. 1, p. 38–48, mar. 2012.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C.; INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (EDS.). **TNM: classification of malignant tumours**. 6th ed ed. New York: Wiley-Liss, 2002.

SUDHADHAM, M. et al. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. **Stud Mycol**. v. 61, p. 145-155, 2008.

SURYAWANSHI, H. et al. Oropharyngeal candidosis relative frequency in radiotherapy patient for head and neck cancer. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2012.

TAJ-ALDEEN, S. J. et al. Isolation of *Exophiala dermatitidis* from endotracheal aspirate of a cancer patient. **Mycoses**. v. 49, n. 6, p. 504-9, 2006.

TAVERNA, C. et al . Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro , v. 108, n. 2, p. 178-185, 2013.

TEIXEIRA, M. F. S.,[ et al] (1996). Determinação qualitativa de proteases: método de cup-plate modificado. **Rev. UFAM**, Série: Ciências da Saúde, v. 4/5, n. 1/2, p. 39-45

TEIXEIRA, L. A. O câncer na mira da medicina brasileira. v. 2, n. 1, p. 14, 2009.

TEIXEIRA, L. A.; PORTO, M. A.; NORONHA, C. P. **O Câncer no Brasil: passado e presente**. Rio de Janeiro: Outras Letras Editora, 2012.

THAWEBOON, S. et al. Oral colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. **Quintessence Int**. v. 39, n. 2, p.52-7, 2008.

TOLEDO, H. V.; FERRAGUT, M. A.; DE ALMEIDA, D. B. Noções Básicas de Radiobiologia: O Que um Neurocirurgião Precisa Saber? p. 7, 2014.

VIEIRA, C. A. Comparative study of *Candida* species: antifungal susceptibility and virulence genes. v. 23, n. 54, p. 14, 2018.

WAGNER, S. et al. Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer. **Oncology Research and Treatment**, v. 40, n. 6, p. 334–340, 2017.

WANG, H.; XU, Y. C.; HSUEH, P.R. Epidemiologia da candidemia e susceptibilidade a antifúngicos em espécies de *Candida* invasoras na região Ásia-Pacífico. **Futuro Microbiol.** v.11, p.1461-1477, out. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Observatory**. Geneva: WorldHealthOrganization2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>. Acesso em 25 jul. 2019.

ZHANG, X. et al. The Biology of Aging and Cancer. **The Cancer Journal**, v. 23, n. 4, p. 5, 2017.

ZUPANČIČ, J. et al. The Black Yeast *Exophiala dermatitidis* and Other Selected Opportunistic Human Fungal Pathogens Spread from Dishwashers to Kitchens. **PLoS One**. v. 11, n. 2, p. e0148166, 2016

## APÊNDICE I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (De acordo com a Resolução nº466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidada (o) a participar, como voluntário, de uma pesquisa de saúde bucal. A pesquisa chama-se **“Estudo dos fatores de virulência e da frequência de leveduras do gênero *Candida* em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a tratamento antineoplásico atendidos em um centro de referência da cidade de Manaus”**

As pesquisadoras responsáveis são **Giselle Diniz Guimarães da Silva, e-mail: giselledinizsilva@gmail.com**, sob a orientação da prof. Dr<sup>a</sup> **Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, e-mail: ormezinda.fernandes@fiocruz.br**, vinculadas à **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, localizado na Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus-AM, - CEP: 69057070, telefone: (92) 36212323; (92) 3621-2304; 3621-2356.**

Nessa pesquisa uma escova será passada em sua boca antes e depois de 1 mês terminar do seu tratamento. Serão avaliados na mesma oportunidade seus dentes e gengivas. Quando necessário, serão realizadas fotografias de sua boca. As informações colhidas nesta pesquisa ajudarão a melhorar atividades de planejamento, de diagnóstico, tratamento e seguimento de pacientes no Departamento de Cabeça e Pescoço, radioterapia e quimioterapia da FCECON, trazendo benefícios para a população que utiliza o serviço.

A pesquisa não apresenta risco físico, você tem pleno direito de não ser examinado. Existe risco referente à perda do anonimato devido à utilização dos seus dados na ficha de exame. Porém, para diminuir este risco, asseguramos que a própria pesquisadora e o auxiliar, que fará as anotações na ficha clínica, serão treinados para garantir ao máximo o sigilo dos participantes. A sua identidade será sempre mantida em sigilo e as informações obtidas serão analisadas em conjunto com a dos demais participantes, não sendo divulgada a identificação do participante.

Asseguramos, ainda, que após concluído o estudo serão destruídas as fichas clínicas com os dados dos participantes. Você tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo. Você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa e também nada será pago por sua participação.

Sempre que você assim o desejar, poderá pedir mais informações sobre a pesquisa para a pesquisadora do projeto. Será disponibilizada uma via para cada participante da pesquisa e outra ficará sobre posse da pesquisadora (item IV.3.f, IV.5.d, Res. 466/12). Caso aceite fazer parte do estudo assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra será arquivada para a pesquisa

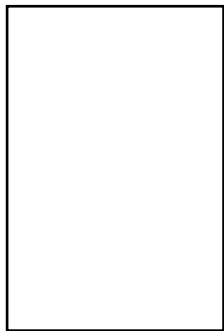
Consentimento Pós-informação

Eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar deste estudo do departamento de cirurgia de cabeça e pescoço da Fundação CECON. Fui devidamente informado e esclarecido pelos pesquisadores e colaboradores sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis benefícios decorrentes de minha participação. Compreendi quais são as intenções do estudo, seus desconfortos, garantias de confidencialidade e de esclarecimentos. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Manaus, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_

---

Assinatura do participante



---

Assinatura do  
responsável legal

## APÊNDICE II

### DADOS INICIAIS

Data do registro: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Turno: Matutino( ) Vespertino ( ) Noturno( )

Nº \_\_\_\_

Registro \_\_\_\_\_ Médico \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

Sexo: F( ) M ( )

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Cor da Pele: \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Área: Rural ( ) Urbana ( )

Procedência: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Tel:( ) \_\_\_\_\_

Renda em R\$: \_\_\_\_\_

### Dados relativos ao tumor

Tabagista: ( ) S ( ) N Etilista: ( ) S ( ) N

Diagnóstico \_\_\_\_\_ histológico:

Localização Primária do Tumor: \_\_\_\_\_

Estadiamento (TNM) \_\_\_\_\_

Tratamento proposto: RT exclusiva ( ) Cirurgia ( ) Cirur + RT ( ) RT + QT ( )  
 Cirur+ RT + QT ( )

OBS: \_\_\_\_\_

Protocolos \_\_\_\_\_ de

RT: \_\_\_\_\_

Dosagem

(cG): \_\_\_\_\_

---

---

Histórico de câncer na família: ( ) S ( ) N

Uso de Medicamentos: ( ) S ( ) N \_\_\_\_\_

Comorbidades: ( ) S ( ) N Se sim:

Qual(is)? \_\_\_\_\_

---

---

### **Exame Clínico**

Uso de Prótese: ( ) S ( ) N

Mucosite: ( ) S ( ) N

Candidíase Oral: ( ) S ( ) N

Classificação: Pseudomembranosa ( )

Eritematosa ( )

Estomatite protética( )

Queilite angular ( )

Glossite romboidal mediana( )

Hiperplásica Crônica( )

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

---

---

## RETORNO APÓS 1 MÊS DO INÍCIO DA RT

Nº \_\_\_\_\_ Registro \_\_\_\_\_  
 Médico \_\_\_\_\_  
 Nome: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Data do registro: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Turno: Matutino( ) Vespertino ( )  
 Noturno( )  
 Nº Sessão RT: \_\_\_\_\_ Qt.de Sessões a realizar:-

### Exame Clínico

Xerostomia? ( ) S ( ) N  
 Uso de Prótese: ( ) S ( ) N  
 Mucosite: ( ) S ( ) N  
 Candidíase Oral: ( ) S ( ) N  
 Classificação: Pseudomembranosa ( )  
                   Eritematosa ( )  
                   Estomatite protética( )  
                   Queilite angular ( )  
                   Glossite romboidal mediana( )  
                   Hiperplásica Crônica( )

OBSERVAÇÕES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ANEXO I

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO  
NORTE - UNINORTE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E DA FREQUÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA EM PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO SUBMETIDOS A TRATAMENTO ANTINEOPLÁSICO ATENDIDOS EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DA CIDADE DE MANAUS

**Pesquisador:** Giselle Diniz Guimaraes da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 15628119.0.1001.0010

**Instituição Proponente:** CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

**Patrocinador Principal:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.483.267

#### Apresentação do Projeto:

A terapêutica utilizada no tratamento de neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço promovem efeitos deletérios ao paciente afetando diretamente sua qualidade de vida. Entre os efeitos indesejados estão a mucosite e as infecções fúngicas ocasionadas por leveduras do gênero Candida que ocorrem devido à diminuição do fluxo salivar e alteração da microbiota bucal. As infecções da mucosa oral por fungos é frequente em pacientes sob tratamento antineoplásico devido à imunossupressão. Embora a espécie Candida albicans seja a mais comumente relacionada às infecções orais, estudos tem demonstrado que as espécies de Candida não albicans podem estar presentes e causar infecção em pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço sob tratamento quimio e radioterápico o que torna relevante o estudo a cerca dos fatores de virulência dessas espécies.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar fatores de virulência e a frequência de leveduras do gênero Candida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço submetidos a tratamento antineoplásico atendidos em um centro de referência da cidade de Manaus.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os Riscos e Benefícios apresentados nesta presente pesquisa estão em conformidade com o

<b>Endereço:</b> Avenida Joaquim Nabuco,1232 -Unidade I			
<b>Bairro:</b> Centro		<b>CEP:</b> 69.010-060	
<b>UF:</b> AM	<b>Município:</b> MANAUS		
<b>Telefone:</b> (92)3212-5198	<b>Fax:</b> (92)3212-5010	<b>E-mail:</b> cep@uninorte.com.br	



Continuação do Parecer: 3.483.267

exigido pela resolução CNS 466/12, garantindo a não maleficência, autonomia, justiça, equidade e beneficência dos sujeitos pesquisados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem relevância científica e adota métodos coerentes e adequados para os objetivos propostos.

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

A Folha de Rosto, Termo de Anuência, TCLE e Projeto de pesquisa foram apresentados e estão em conformidade com o exigido pela resolução CNS 466/12

**Recomendações:**

Recomendo a este colegiado a aprovação da presente pesquisa

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

Não foram detectadas nenhuma pendência ou inadequação, segundo a resolução CNS 466/12.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Não foram detectadas nenhuma pendência ou inadequação, segundo a resolução CNS 466/12. Assim, recomenda-se a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1363178.pdf	02/06/2019 16:15:10		Aceito
Outros	Curriculo_Lia.pdf	02/06/2019 16:13:52	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Ormezinda.pdf	02/06/2019 16:13:43	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Outros	Curriculo_Giselle.pdf	02/06/2019 16:13:27	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_colaborador.pdf	02/06/2019 16:05:38	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_pesquisador_responsavel.pdf	02/06/2019 16:04:18	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	02/06/2019 16:00:54	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	26/05/2019 17:32:34	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito

**Endereço:** Avenida Joaquim Nabuco,1232 -Unidade I  
**Bairro:** Centro **CEP:** 69.010-060  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3212-5198 **Fax:** (92)3212-5010 **E-mail:** cep@uninorte.com.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO  
NORTE - UNINORTE



Continuação do Parecer: 3.483.267

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.docx	26/05/2019 17:32:26	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	26/05/2019 17:28:15	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	26/05/2019 17:26:59	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_Institucional.pdf	26/05/2019 17:12:12	Giselle Diniz Guimaraes da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 02 de Agosto de 2019

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Elton Araújo da Silva**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Joaquim Nabuco,1232 -Unidade I  
**Bairro:** Centro **CEP:** 69.010-060  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3212-5198 **Fax:** (92)3212-5010 **E-mail:** cep@uninorte.com.br