

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

SUANNI LEMOS DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE NITROSAMINA POR LEVEDURAS ISOLADAS EM
NEOPLASIA MALIGNA BUCAL E ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO
FLUCONAZOL E EXTRATO DE *Indigofera suffruticosa***

Recife
2014

SUANNI LEMOS DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE NITROSAMINA POR LEVEDURAS ISOLADAS EM
NEOPLASIA MALIGNA BUCAL E ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO
FLUCONAZOL E EXTRATO DE *Indigofera suffruticosa***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Recife
2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB-4/1728

Andrade, Suanni Lemos de

Produção de nitrosamina por leveduras isoladas em neoplasia maligna bucal e atividade antifúngica de fluconazol e extrato de *Indigofera suffruticosa* / Suanni Lemos de Andrade. – Recife: O Autor, 2014.

179 f.: il., fig, tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadora: Rejane Pereira Neves

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2014.

Inclui referências e anexos

1. Boca- câncer 2. *Candida* 3. *Indigofera* I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orient.) II. Neves, Rejane Pereira (coorient.) III. Título

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-295

SUANNI LEMOS DE ANDRADE

**PRODUÇÃO DE NITROSAMINA POR LEVEDURAS ISOLADAS EM
NEOPLASIA MALIGNA BUCAL E ATIVIDADE ANTIFUNGICA DO
FLUCONAZOL E EXTRATO DE *Indigofera suffruticosa***

Tese apresentada ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de doutora.

Aprovada em 27 / 02 /2014.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves
Universidade Federal de Pernambuco

Profa Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves Lima Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Guilherme Maranhão Chaves
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

*Aos meus pais, Ceres Maria Moreira de
Lemos Lyra e Marcos Antônio Gomes de
Andrade, **dedico.***

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço ao **DEUS** de minha iluminação, compreensão e constituição, por sua orientação, direcionamento e discernimento nos meus estudos. Auxiliando-me em todos os momentos. Acolhendo-me nas incertezas e dúvidas. E, ao longo de toda essa trajetória, proporcionando-me Paz, Tranquilidade e Harmonia, por permitir ingressar no **curso de Doutorado em Ciências Biológicas**, através da **Universidade Federal de Pernambuco**, participando de todas as etapas com **LUZ, FORÇA, AMOR e EQUILÍBRIO**, culminando na defesa desta tese.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**, ao **CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS** e ao **DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA**, pela promoção e realização deste **DOUTORADO**.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**, aos Coordenadores e a Secretária Adenilda, bem como, a todos os professores deste Programa, os quais nos permitiram a ampliação do conhecimento.

A **FUNDAÇÃO DE AMPARO À CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO ESTADO DE PERNAMBUCO (FACEPE)**, que tem como missão, “promover o desenvolvimento científico e tecnológico do Estado de Pernambuco, através do fomento à ciência, tecnologia e inovação, mantendo estreita sintonia com o atendimento às suas necessidades sócio-econômicas”.

À **UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS (UEA)**, pela grande oportunidade em compor o quadro permanente, como docente desta Unidade, em especial, à **ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE (ESA)**, ao **Magnífico Reitor Cleinaldo Costa**, ao Diretor **Darlison**, ao prof. **Dr. Lioneu**, aos coordenadores do curso de Medicina, aos meus queridos colegas de trabalho e à **técnica Lenice**, pela permissão, suporte e colaboração. A todos que, direta ou indiretamente, proporcionaram a realização desta conquista, meu MUITO OBRIGADA!

À minha orientadora **Dra Vera Lúcia de Menezes Lima**, agradeço a oportunidade, confiança, amparo e compreensão, frente aos acontecimentos no decorrer do curso, como também, na superação de todas as dificuldades enfrentadas. Atribuindo voto de confiança ao estudo, ora realizado e conclusivo.

À minha co-orientadora professora **Dra Rejane Pereira Neves**, por todos os ensinamentos e por todo o incentivo, apoio, auxílio e votos de confiança. Por acreditar, sempre, na minha capacidade e desenvoltura em atingir mais este degrau de conhecimento. Agradeço também toda sua dedicação, compromisso e carinho. OBRIGADA POR TUDO!

Ao **Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP)**, e seus setores envolvidos no ensino e pesquisa; À querida **Solange**, sempre atenciosa e disposta a colaborar com nossa pesquisa; No Departamento de Patologia, com a atenção carinhosa da **Dra Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima** e as técnicas **Rose** e **Marciana**; A Todos os funcionários agradáveis e atenciosos do bloco cirúrgico, especialmente, **Djalma** e **Ana Cleide**. Ao **Sr. MANO** e toda equipe do arquivo, bastante tenciosos e colaborativos. Ao chefe deste serviço, o **Dr. Bartolomeu Melo**, e aos médicos do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCP, especialmente, ao **Dr. Paulo Bentes**, **Dr. Christiano Paiva**, **Dr. Brasiliense**, **Dr. Luis Mário**, **Dr. Leonardo Arcoverde**, **Dr. Mauro Seffer**, **Dr. Marllus** e **Dra Luciana** pela colaboração e apoio de forma especial, a nossa pesquisa, disponibilizando seus pacientes, realizando conosco, as coletas, sempre atenciosos e receptivos; Às queridas assistentes dos cirurgiões de Cabeça e de Pescoço **Luciana** e **Cleide** pela incrível colaboração e amizade.

À amiga e cirurgiã de Cabeça e Pescoço **Dra Fátima Matos**, por sua colaboração científica, orientação e incentivo em nossa pesquisa.

Ao **Professor Nicodemos Teles de Pontes Filho**, por sua colaboração nos ensinamentos, de forma atenciosa e dedicada ao nosso estudo.

Aos que fazem o Laboratório de Micologia Médica, ao chefe do laboratório **Prof. Armando Marsden**, pelos seus grandes ensinamentos e descontração. À **Profa Oliane Magalhães**, sempre disposta a nos ensinar. Aos técnicos do departamento de Micologia **Rubens**, **Eliane**, pela colaboração em nossa pesquisa.

A grande equipe que compõe a micologia médica e a todos os amigos do departamento de micologia, especialmente, **Elvislene**, **Nadyr**, **Danielle Bounafina**, **Heloísa**, **Ildy Brandão**, **Carol Sanuzi**, **Carol Silva**, **Ana Maria**, **Evellin**, **Walter**, **Silvio**, **Frans**, **Pamella**, **Michael**, **André** e **Melina**. O meu

muito Obrigado, pela colaboração em meus experimentos, por compartilhar os conhecimentos, por toda Amizade. Ainda, por todo Suporte, Compreensão e Dedicação, para engrandecimento e conclusão deste estudo.

Aos amigos da Micologia **Danielle Macêdo, Fabíola Cahu, Reginaldo Gonçalves** por compartilhar conhecimentos, pelas parcerias nos experimentos, pelo suporte na pesquisa e por vezes orientação. Vocês são meus exemplos, muito obrigada!

Aos amigos **Helder Vieira, Vanessa Karina, Marcelo Brasileiro**, pela força, auxílio e grande ajuda científica nos momentos delicados e de sufoco.

Minha grande-pequena amiga **Keila Mendes**, por todo apoio, incentivos, injeções de ânimo e foco. Sempre presente nos momentos de dificuldade (de Manaus a Recife), contribuindo cientificamente e fraternamente. Muito Obrigada!

Agradeço em especial, aos meus pais, **Marcos Antônio Gomes de Andrade** e **Ceres Maria Lemos de Andrade**, POR TUDO!!! Ensinaamentos de Vida, Amor, Compreensão, Carinho e Amparo em minhas escolhas e decisões. Ao meu avô **Severino Andrade**, por todo amor e carinho, que recebo até hoje do meu VOINHO! Aos meus Irmãos: **Arthur Andrade, Suastra Lemos** e **Thais Lemos**. Aos meus amados sobrinhos **Thiago** e **Alexandre**, e ao meu afilhado **Viktor Taul**. AMO MUITO VOCÊS!

A toda minha família, tios, primos e parentes; em especial a minha tia/mãe e grande amiga **Maria do Carmo Lemos Lacerda**, pelas orientações, cumplicidade, carinho, amor e amizade; E também, a minha tia/madrinha/mãe **Célia Maria Lemos Felix**, pela paciência, carinho, amor e incentivo em todos os momentos de minha vida. OBRIGADA POR TUDO, AMO VOCÊS!

À família **Fernandes**, em Manaus, que jamais esquecerei o apoio e carinho, MUITO OBRIGADA!

Aos amigos de Manaus **Rosângela, Ariane, Elisa, Marcos Bonson, Glaucea, Mirna e Jansen**, presentes e participantes em minha Vida, em todos os momentos, com parceria, cumplicidade, paciência e amizade, proporcionando, todo suporte necessário, para efetiva realização desta conquista.

Aos amigos micologistas **Ormezinda** (Fiocruz) e **Ana Claudia** (INPA), por toda amizade e colaboração em meu início de carreira.

A todos os amigos, que guardo no coração, os quais são importantes em minha Vida, incluindo, os grandes amigos de **RECIFE** e de **MANAUS**, que proporcionaram tantas alegrias e “ombro amigo”, colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento e aperfeiçoamento deste estudo.

Existem amigos, que **DEUS** coloca em nossas vidas, para atuarem como **ANJOS...** Para vocês meus amigos que em muitos momentos fazem o papel de **ANJO**. **MUITO OBRIGADA!**

O senhor é o meu pastor e nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranqüilas, refrigera minha alma; Guia-me pelas veredas da justiça, por amor ao seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temerá mal algum, porque tu estás comigo; Tua vara e teu cajado me consolam, preparas uma mesa perante mim na presença de meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias e habitarei na casa do senhor por longos dias.

RESUMO

Neoplasia maligna bucal se desenvolve a partir do revestimento epitelial da mucosa da boca. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, ocorrem 640.000 casos de câncer oral por ano, sendo o sexto tipo mais incidente e responsável por 10% de todos os tumores malignos no mundo. Diversos fatores estão envolvidos na carcinogênese, incluindo as infecções por micro-organismos. As leveduras podem desencadear mecanismos cancerígenos por metabolizar substâncias cancerígenas, como as nitrosaminas. Infecções fúngicas em pacientes portadores de câncer bucal são induzidas pelo desequilíbrio imunológico devido à terapia antineoplásica, assim como pela virulência do agente etiológico. A virulência das espécies de *Candida* pode ser determinada pela capacidade de aderência, proliferação, produção de enzimas como a protease, formação de tubo germinativo e resistência a drogas antifúngicas, o que torna importante a busca de novas alternativas terapêuticas, como a planta *Indigofera suffruticosa*. O objetivo deste trabalho é estudar a relação da produção de nitrosamina, testar a susceptibilidade antifúngica *in vitro* de drogas convencionais e do extrato de *I. suffruticosa* em leveduras isoladas de neoplasia maligna bucal. Amostras foram isoladas de lesões malignas bucais através de biópsia, em seguida processadas para a realização de exame direto e cultura. As leveduras isoladas foram purificadas e posteriormente identificadas através da taxonomia clássica e automação. Em seguida, foram verificados fatores de virulência das leveduras quanto à produção de tubo germinativo, aderência às células epiteliais orais, detecção de protease e sensibilidade a antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, nistatina e o extrato de *I. suffruticosa*). Foram coletadas 68 amostras clínicas em pacientes que apresentavam tumores bucais. Ocorreu o predomínio do gênero masculino, da tumoração na língua e do tipo histológico Carcinoma escamocelular. Um paciente apresentou paracoccidioidomicose que simulava clinicamente lesões neoplásicas. Das amostras clínicas obtidas em tumores bucais, foram isoladas 14 espécies de leveduras, sendo *Candida albicans* (7), *C. famata* (2), *C. tropicalis* (3), *C. lusitaniae* (1), *C. parapsilosis* (1). Destas apenas os isolados *C. famata* (7085) e *C. tropicalis* (7090) não formaram tubo germinativo. Todos os isolados foram capazes de aderir às células epiteliais orais, sendo que 57% apresentaram forte aderência, 14% moderada e 29% fraca aderência. *C. famata* (7085), *C. tropicalis* (7092) e *C. albicans* (7098) não apresentaram atividade proteásica. Com relação ao teste de susceptibilidade a antifúngicos, todas as leveduras foram sensíveis às drogas nistatina e anfotericina B. Os isolados *C. albicans* (7094) e *C. famata* (7096) apresentaram resistência ao fluconazol. A proteína inibe o crescimento de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com CIM de 64, 32, 8 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Leveduras isoladas em tumores bucais apresentam perfis diversos quanto a patogenicidade e susceptibilidade a drogas antifúngicas. Anfotericina B, nistatina e fluconazol podem ser utilizadas no tratamento de infecções fúngicas da mucosa oral ou sistêmicas em pacientes com câncer de boca. Contudo, se faz importante o diagnóstico micológico em pacientes com suspeita de câncer oral, devido ao perfil clínico que pode simular o câncer e as de infecções associadas.

Palavras-chave: Câncer bucal, *Candida*, drogas antifúngicas.

ABSTRACT

Malignant oral neoplasm develops from the epithelial lining of the mucosa of the mouth. According to the World Health Organization, there are 640,000 cases of oral cancer, the sixth type being more accessible and responsible for 10% of all malignancies in the world. Several factors are involved in carcinogenesis, including microorganism infections. Yeasts can initiate cancer mechanisms by metabolizing carcinogens, such as nitrosamines. Fungal infections in patients with oral cancer are induced by immunological imbalance due to antineoplastic therapy, as by virulence of the etiological agent. The virulence of *Candida* species can be determined by the ability of adhesion, proliferation, production of enzymes such as protease, formation of germ tubes and resistance to antifungal drugs, which makes it important to search for new therapeutic alternatives, such as the *Indigofera suffruticosa*. The objective of this work is to study the relationship of nitrosamine production, to test the *in vitro* antifungal susceptibility of conventional drugs and *I. suffruticosa* extract in yeast isolated from oral malignant neoplasia. Samples were isolated from oral malignant lesions by biopsy, then processed for direct examination and culture. The isolated yeasts were purified and later identified through classical taxonomy and automation. Afterwards, yeast virulence factors were verified for germ tube production, adhesion to oral epithelial cells, protease detection and antifungal sensitivity (amphotericin B, fluconazole, nystatin and *I. suffruticosa* extract). A total of 68 clinical samples were collected in patients with oral tumors. The predominance of the male gender, of the tumor in the tongue and of the histological type squamous cellular Carcinoma. One patient had paracoccidioidomycosis that clinically mimicked neoplastic lesions. From the clinical samples obtained in oral tumors, 14 yeast species were isolated, being *Candida albicans* (7), *C. famata* (2), *C. tropicalis* (3), *C. lusitaniae* (1) and *C. parapsilosis* (1). Of these, only *C. famata* (7085) and *C. tropicalis* (7090) isolates did not form germ tubes. All isolates were able to adhere to oral epithelial cells, with 57% showing strong adhesion, 14% moderate and 29% poor adherence. *C. famata* (7085), *C. tropicalis* (7092) and *C. albicans* (7098) showed no protease activity. Regarding the antifungal susceptibility test, all yeasts were sensitive to the drugs nystatin and amphotericin B. Isolates *C. albicans* (7094) and *C. famata* (7096) showed resistance to fluconazole. The protein inhibits the growth of *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* with CIM of 64, 32, 8 and 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. Yeasts isolated from oral tumors have different profiles regarding pathogenicity and susceptibility to antifungal drugs. Amphotericin B, nystatin and fluconazole may be used in the treatment of fungal infections of the oral or systemic mucosa in patients with oral cancer. However, the mycological diagnosis is important in patients with suspected oral cancer, due to the clinical profile that can simulate the cancer and the associated infections.

Keywords: Oral cancer, *Candida*, antifungal drugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Estrutura química da nitrosamina.	25
Figura 2 – Esquema relacionando a promoção do câncer oral por nitrosação de <i>Candida</i> .	28
Figura 3 – Histopatologia com coloração de HE e PAS de leucoplasia por <i>Candida</i> . Pseudohifas de <i>Candida</i> foram invadindo o epitélio da hiperplasia (A e B) e displasia (C e D). Seta mostra pseudo-hifas <i>Candida</i> .	36
Figura 4 – Estágios de <i>Candida albicans</i> na progressão da infecção oral.	42
Figura 5 – Formação de tubos germinativos	43
Figura 6 – Adesão forte e fraca (A e B respectivamente) de espécies de <i>Candida</i> em células epiteliais bucais de humano.	45
Figura 7 – Representação ilustrativa da espécie <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill.	52

CAPITULO I

Figura 1 - Histological diagnosis showing Paracoccidioidomycosis. Yeasts at different developmental stages, 400X (a and b); foreign body giant cell (*) and yeasts (↑) HE-400X (c); yeast cell (↑) and Langerhans type giant cell (*), HE-200X (d); outbreaks of fungal proliferation, HE-200X (e); fungal proliferation (↑) and areas of fibrosis (*), PAS-200X (f).	66
Figura 2 – Serological diagnosis by double immunodiffusion revealing a reagent serum (patient letter d) against <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> antigen (a) presented as a band of precipitation. (b): Positive serum control; (c , e , f and g): Negative tests.	66

CAPITULO II

Figura 1 – Diversidade das lesões em cavidade oral: lesões ulcerativas, vegetantes e crostosas. A: lesão de assoalho de boca lesão; B: Palato mole à esquerda; C: Lábio inferior; D: Lateral de língua à direita; E: rebordo gengival superior a esquerda; F: Loja amigdaliana esquerda. 82

Figura 2 – Leveduras aderidas à célula epitelial. Em **A**: fraca aderência; **B**: forte aderência. 83

CAPITULO III

Figura 1 – Chitin affinity chromatography of protein material from aqueous extract of *I. suffruticosa*. Unbound fraction washed with 0.15 M NaCl. Single peak the bound fraction eluted with 2.0 M acetic acid. 95

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

CAPITULO II

Table 1 - Achados fúngicos em lesões bucais correlacionando localização tumoral com espécie isolada.	84
Table 2 - Capacidade de aderências dos isolados as células epiteliais orais.	85
Table 3 - Resultado do teste enzimático quanto à produção de proteases de leveduras isoladas de neoplasia bucal.	86
Table 4 - Formação de Tubo germinativo por espécies de <i>Candida</i> .	87
Table 5 - Suceptibilidade de espécies de <i>Candida</i> isoladas de neoplasia bucal frente a antifúngicos.	88

CAPITULO III

Tabela 1 - Antifungal activity of <i>Indigofera suffruticosa</i> extract, <i>Indigofera suffruticosa</i> isolate protein, Amphotericin B and fluconazole against eight <i>Candida</i> clinical strains stocked in URM Culture Collection.	96
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
N-NO	Grupo funcional nitroso
4QNO	4-nitroquinoline-1-oxide
PCM	Paracoccidioidomicose
HE	Hematoxilina-eosina
PAS	Ácido Periódico-Schiffer
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CO2	Concentração para inibir 70% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
SPA	Aspartil Proteinases
MIC	Concentração Inibitória Mínima
CYP450	Hemoproteína Citocromo P450
AcF	Fração de acetato de etila
AqF	Fração aquosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	
2.1 Epidemiologia do câncer	20
2.2 Carcinogênese bucal e Fatores de Predisposição	21
2.2.1 Produção de nitrosamina por <i>Candida</i>	25
2.3 Tipos de câncer de boca	29
2.4 Tratamento e complicações do câncer bucal	30
2.5 Câncer bucal associado a infecções fúngicas	34
2.6 Infecção bucal por <i>Candida</i> secundárias ao tratamento do câncer	37
2.7 Câncer bucal associado à colonização e infecção por <i>Candida</i>	38
2.8 Potencial patogênico das espécies de <i>Candida</i>	41
2.8.1 Formação de tubo germinativo	42
2.8.2 Aderência às células epiteliais	43
2.8.3 Detecção de enzimas	46
2.9 Susceptibilidade às drogas antifúngicas	48
2.10 Alternativas terapêuticas de <i>Indigofera suffruticosa</i> como potencial antifúngico	51
3 OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral	54
3.2 Objetivos específicos	54
CAPITULO I: Paracoccidioidomicose oral simulando Carcinoma: relato de caso	55
CAPITULO II: Candidíase associadas ao câncer oral e fatores de virulência dos agentes etiológicos	67
CAPITULO III: Atividade antifúngica de proteína de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill frente a espécies de <i>Candida</i>	89
CAPITULO IV: Produção de nitrosamina por espécies de <i>Candida</i> na promoção do câncer bucal: Um estudo de revisão	102
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
REFERÊNCIAS	122
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

O câncer configura-se como um problema de saúde pública de âmbito mundial, afetando os países independentemente dos seus níveis de desenvolvimento (FERNANDES et al., 2008; OSTERNE et al., 2008). A expressão da doença pode ocorrer de várias formas e nas mais variadas regiões do corpo como, por exemplo, na boca. Neoplasias malignas bucais, assim como as inúmeras doenças localizadas na cavidade oral, comumente se desenvolvem a partir do epitélio de revestimento e cerca de 640 mil novos casos surgem a cada ano (FARDINI et al., 2004).

Ao analisar os dados apenas do Brasil, de todos os tipos de câncer que são diagnosticados nos limites cabeça e pescoço, praticamente 40% dos casos estão localizados na região da cavidade oral. Esse número representa uma elevada incidência da doença e tem conduzido o país a apresentar uma das maiores taxas do mundo (CARDOSO et al., 2005; INCA, 2006).

A etiologia do câncer é multifatorial, podendo ser resultado de vários fatores envolvidos de forma isolada ou mesmo combinados. Características genéticas, má higienização, imunossupressão, infecções virais pelo papiloma-vírus I e deficiências nutricionais são geralmente citados como agentes causadores da doença. No entanto, a maioria dos casos está relacionada com o consumo acumulativo do álcool e do tabaco (KIGNEL; BIRMAN, 2000; FARDINI et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2003).

Os tratamentos instituídos para as neoplasias malignas incluem procedimentos invasivos como radioterapia, quimioterapia e cirurgia, os quais favorecem a imunossupressão e, conseqüentemente, o desenvolvimento de infecções fúngicas (NAGY et al., 2000). De fato, diversos fatores inerentes aos fungos estão diretamente ligados com seu potencial patogênico (SANJAYA et al., 2011), porém, a sua aderência que é facilitada em tecidos debilitados, constitui a primeira etapa para influenciar na relação com o hospedeiro dando início a patogênese das infecções do epitélio (KEMMELMEIER et al., 2011).

Em certos estados clínicos, a micose pode simular um câncer oral, uma vez que há semelhança das lesões com neoplasias (MENESES-GARCÍA et al., 2002; SHIBATA et al. 2011; KURAI et al., 2012). Contudo, foram constadas possíveis associações de neoplasias e fungos, especialmente espécies de

Candida (CAWSON, 1969; KIGNEL; BIRMAN, 2000; McCULLOUGH et al., 2002; SPOLIDORIO et al., 2003), além de *Paracoccidioides brasilienses* (SHIKANAI-YASUDA et al., 2008), sendo este último considerado raro.

As leveduras são mencionadas como organismos nitrosantes, ou seja, capazes de liberar nitrosaminas, compostos formados a partir da reação de aminas ou aminoderivados e possuem alto potencial cancerígeno (KROGH, 1990; SANCHES-FILHO et al., 2003). Todavia, ainda permanece obscuro o papel exercido pelos fungos, especialmente as leveduras, e os danos que podem causar em relação a neoplasias bucais. Tal fato deve-se há escassez de estudos que relacionem esses microrganismos com a doença.

Em relação ao gênero *Candida*, vários fatores são considerados na caracterização do potencial de virulência dos microrganismos como os tubos germinativos e exoenzimas. Os primeiros marcam o início das hifas em algumas espécies e são especialmente incriminados na patogênese da candidíase (HUDSON et al., 2004; SAMARANAYAKE et al., 2009). Já os catalizadores estão ligados diretamente com o fator virulência, e tem sido considerado um dos mais importantes fatores para espécies de *Candida* (ÁLVARES et al., 2007).

O surgimento de leveduras patógenas e com resistência secundária aos antifúngicos sintéticos provocou a necessidade da aplicação de métodos para avaliar a susceptibilidade a essas drogas. O National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) regularizou um método de referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica pelo CLSI M27-A3

Os últimos anos têm se caracterizado pela retomada aos estudos com produtos naturais, na tentativa de se obter novos princípios ativos/modelos para síntese de novas drogas, demonstrando que a necessidade por substâncias fitoterápicas alternativas permanece (QUEIROZ et al., 2008). Além disso, a utilização de fitoterápicos pode ser uma excelente opção em se obter resposta antifúngica eficaz, com ausência de toxicidade e efeitos indesejáveis (LEITE et al., 2006).

A *Indigofera suffruticosa* é uma espécie de Fabaceae que tem despertado interesse por sua utilização popular no tratamento de inflamações e

epilepsias. Estudos com este vegetal apresentam eficácia como antimicrobiano e antitumoral (LEITE et al., 2006; VIEIRA et al., 2007).

A alta incidência das neoplasias malignas bucais, o elevado número de infecções secundárias por *Candida spp*, desperta a busca pelo conhecimento do perfil patogênico das espécies e a susceptibilidade aos antifúngicos por esses microrganismos. Estas leveduras têm sido as principais causas de infecções em pacientes com câncer bucal, tornando-se preocupante, diante das limitadas e tóxicas drogas antifúngicas utilizadas. Assim, tornam-se necessários estudos aprimorados no perfil desses fungos e a busca por novas condições de tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do câncer bucal

O estabelecimento do câncer ocorre a partir do desenvolvimento de células que sofrem mutação, como causa de danos em um ou mais genes de uma única célula, tornando-a capaz de multiplicar-se rapidamente (INCA, 2006). De todas as regiões anatômicas afetadas pela neoplasia na região de cabeça e pescoço, a cavidade oral é a que apresenta maior número de casos (40%). Na sequência surge a laringe (25%), seguida da faringe (15%) e das glândulas salivares (7%). As demais localidades representam 13% da doença (CARDOSO et al., 2005; CASTRO et al., 1999).

O câncer de boca é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo o sexto tipo de câncer de maior incidência no mundo (OLIVEIRA et al., 2006), é responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando em torno de 12% de todas as causas de morte no cenário mundial (GUERRA et al. 2005; SILVESTRE; JERONYMO 2007; INCA, 2011).

Os tumores malignos da região de cabeça e pescoço acometem 5% do total de casos das neoplasias malignas na população brasileira e a incidência do câncer oral no país é considerada uma das mais altas do mundo (SCHWARTZ et al., 2008; TINCANI et al., 2000). As lesões malignas nos tecidos bucais mais prevalentes no Brasil abrangem: lábios, mucosa bucal, gengivas, língua, palato duro e assoalho de boca (LONGO et al., 2011). No município de São Paulo, o câncer de língua, foi o que mais resultou em maior número de óbitos entre as neoplasias de boca e orofaringe nos anos de 1998 e 2002. Ainda foram observados casos de morte em decorrência de neoplasias na mucosa oral e vestíbulo da boca, mas em menor proporção (BIAZEVIC et al., 2006). Em relação ao câncer oral, para o ano de 2012, foram estimados aproximadamente 14.200 casos em todo território nacional. Destes, cerca de dez mil detectados apenas nos homens (INCA, 2011).

As neoplasias dos sítios anatômicos que abrangem a cavidade bucal são definidas como: câncer oral, câncer de boca e câncer bucal. Vários tipos de interações entre as localizações anatômicas são abordados em estudos

específicos, principalmente nos estudos epidemiológicos (GRONBERG; GLICK, 2008; OLIVEIRA, 2006). Apesar das diversas definições, alguns trabalhos se referem à cavidade bucal excluindo lábios e glândulas salivares. Assim, observa-se falta de consenso entre especialistas em relação à classificação das neoplasias bucais.

No âmbito da política nacional da saúde, o estudo da epidemiologia do câncer de boca deve ser compreendido de forma unificada, bem como as diferentes localizações anatômicas que abrange a boca. Esta exigência deve-se ao fato dos cânceres de lábio, cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua oral, assoalho da boca) e orofaringe (úvula, palato mole e base da língua) serem submetidos aos mesmos fatores de risco, ações preventivas e expansão tumoral entre as partes contíguas da boca (MS, 2002). Contudo, em relação à orofaringe, incluindo ainda a região das tonsilas e faringe posterior, evidenciou-se que as características clínicas, o prognóstico da lesão e a resposta aos tratamentos radioterápicos são distintos para as regiões (OLIVEIRA et al., 2006). Por fim, foi destacado que o câncer bucal é uma denominação que engloba o câncer de lábio (extra oral) e cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua e assoalho de boca) (SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

2.2 Carcinogênese Bucal e Fatores de Predisposição ao câncer

A origem das lesões neoplásicas está associada à ação de fatores endógenos como genéticos, bem como, fatores coadjuvantes a exemplo da má higienização, imunossupressão, infecções virais pelo papiloma-vírus I e deficiências nutricionais. Outros fatores predisponentes exógenos como alimentação inadequada, inatividade física, promiscuidade sexual, exposição excessiva à radiação ultravioleta e exposição à aflatoxina também favorecem o desenvolvimento do câncer (FARDINI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; SPOLIDORIO et al., 2003).

Na carcinogênese bucal há uma rede complexa de fatores envolvidos que dependem de variações individuais em resposta a um potencial conhecido ou desconhecido, sendo estes agentes indutores denominados carcinógeno (GIGLIOTTI et al., 2008; SOARES DE LIMA et al., 2005; LOUREIRO et al.,

2002). É um processo lento e complexo da exposição repetitiva aos agentes causadores, sendo classificada por etapas conhecidas como **iniciação** (alteração irreversível do DNA), **promoção** (mudança genética na célula iniciada alterando a expressão dos genes que regulam a diferenciação) e **progressão** (lesão pré-maligna tornar-se maligna). Nesta última fase, ocorre o crescimento desordenado das células, invadindo tecidos e até mesmo conduzindo à metástase (LONGO et al., 2011; LOUREIRO et al., 2002).

O consumo cumulativo do álcool e do tabaco estão relacionados à maioria dos casos, pois são dois fatores de risco muito importantes, apesar do câncer de boca ser uma doença multifatorial. Mesmo sendo fatores independentes, o etilismo e tabagismo possuem ação simultânea, e potencializam o risco do câncer o que torna difícil avaliar o efeito dos dois agentes isoladamente (GIGLIOTTI et al. 2008; INCA, 2006; REIDY et al. 2011; TANAKA et al. 2011; TINCANI et al. 2000). Esse sinergismo pode resultar no aumento da permeabilidade da mucosa oral, devido à ação do álcool, que facilitaria a passagem de carcinógenos derivados do tabaco para o interior das células atuando no DNA (GIGLIOTTI et al., 2008; SILVESTRE; JERONYMO, 2007). Os efeitos independentes e conjuntos do fumo e do álcool observados em pesquisa de caso-controle no estado de São Paulo, região sudeste do Brasil, enfatizam a indução dos carcinógenos estudados (ANTUNES et., 2013).

Embora o câncer oral seja o resultado de interações de múltiplas etiologias, o consumo excessivo do álcool acarreta vários danos a região bucal além do aumento da permeabilidade da mucosa. Podem ocorrer mudanças displásicas como ceratose, aumento na densidade da camada de células basais e vários níveis de danos teciduais (BRANDES-FILHO; LOPES, 2005), além de possíveis atrofia epitelial da mucosa, genotoxicidade e alteração do fluxo salivar (REIDY et al., 2011). Essas lesões comprometem a integridade e, conseqüentemente, o funcionamento adequado do tecido, estando propício ao surgimento de uma neoplasia.

Por vezes, as neoplasias malignas são precedidas por lesões pré-cancerosas, tais como leucoplasia, eritroplasia e displasias severas (TANAKA et al., 2011). Em um grupo de 277 portadores de alcoolismo e outras drogas associadas foram observadas lesões ou alterações na mucosa bucal diretamente relacionada ao uso do álcool em 65 (23%) dos indivíduos

estudados. Foram observados casos de queilite actínica, leucoplasia bucal, eritroplasia e líquen plano, entre as lesões pré-malignas (FERNANDES et al., 2008).

Das lesões supracitadas, a leucoplasia é a mais comum, representadas por manchas ou placas esbranquiçadas que não são removidas à raspagem. Outra lesão clássica é a eritroplasia que se caracteriza com coloração avermelhada, destacando-se perante a mucosa. As eritroplasias apresentam altas taxas de transformação maligna. Quando ocorre associação das áreas vermelhas com brancas ou pontos granulares esbranquiçados sobrepostos a região vermelha, as lesões são denominadas eritroleucoplasia, leucoeritroplasia ou leucoplasia salpicada. Ambas as lesões são assintomáticas (HOSNI et al., 2009).

Pontes e colaboradores (2001) apresentaram um caso clínico raro de paciente com 36 anos, do sexo feminino, com lesão na mucosa gengival vestibular e lingual, com aspecto de placas leucoplásicas e eritoplásicas, que após a biópsia incisional, confirmou tratar-se de Carcinoma epidermóide.

De acordo com Hosni e colaboradores (2009), os quais realizaram um estudo a partir da revisão de prontuários de pacientes que realizaram biópsia oral 17.831 casos, revisados nos prontuários de biópsia oral. Foram evidenciados treze casos de lesões pré-malignas, sendo dois com eritroplasia homogênea e onze com leucoplasia salpicada. Concluíram que essas lesões exibem alterações histopatológicas que vão de displasia epitelial a carcinoma invasivo, o que confirma a alta malignidade.

Todavia, mesmo que a relação do consumo crônico do álcool e câncer bucal esteja de certa forma estabelecida, a patogênese dessa malignidade oriunda de bebidas alcoólicas não é bem instituída. Isto deve-se a observações que, nem todas as pessoas, que desenvolvem esta doença, a necessariamente ingerem álcool, bem como, indivíduos consumidores de longo prazo não apresentam este tipo de neoplasia (REIDY et al., 2011). De fato, o próprio álcool já foi considerado livre de ser um produto cancerígeno quando analisado isoladamente (AIPC, 1988). Porém, ficou constatado que o acetaldeído, principal metabólito do etanol, é um agente cancerígeno e de maior importância dentro da combinação álcool e neoplasias orais (CARRARD et al. 2008; GIGLIOTTI et al. 2008).

Uma das formas de oxidação direta do etanol é por meio dos microrganismos da microbiota de cavidade oral. Algumas bactérias e leveduras possuem a capacidade de metabolizar álcool em acetaldeído, surgindo novas especulações quanto ao papel dos microrganismos na patogênese do câncer. Em condições *in vitro*, isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram capazes de produzir alto teor de acetaldeído oriundo do etanol, enquanto que *C. glabrata* obteve um desempenho melhor na obtenção do produto a partir da glicose. *C. albicans*, por sua vez, apresentou ser eficiente na produção do agente cancerígeno de ambas as fontes (NIEMINEN et al., 2009).

Os microrganismos *C. albicans* e *Neisseria sp* têm se destacados na produção de acetaldeído por possuírem alta atividade da enzima álcool desidrogenase, estando mais presentes na microbiota bucal de indivíduos alcoolistas (CARRARD et al. 2008). Desta forma, a higienização inadequada e o alto consumo alcoólico elevam o teor de acetaldeído, justificando assim a incidência de câncer bucal nos indivíduos que apresentam estes comportamentos (REIDY et al, 2011).

Neste sentido, a ação metabólica de microrganismos para produção de substâncias indutoras do câncer, como leveduras do gênero *Candida*, deve ser avaliada, evidenciando a necessidade de estudos relacionados a presença de fungos, neste sítio, acometido pelo câncer e a ação promotora de neoplasias destes microrganismos (BONAN et al., 2007; O'GRADY; READE, 1992).

Além das bebidas alcoólicas, o uso de colutórios, conhecidos como enxaguantes bucais, tem levantado uma preocupação entre os especialistas, pois na grande maioria, o álcool é utilizado como solvente de princípios ativos na composição do produto (BLANC et al., 2008). Em indivíduos saudáveis e não fumantes, os níveis de acetaldeído pós uso de colutórios com álcool, foram correspondentes aos encontrados após o consumo de bebidas alcoólicas. Assim, a sua utilização diária possivelmente expõe os indivíduos ao risco de desenvolver um câncer na região oral (LACHENMEIER, 2009).

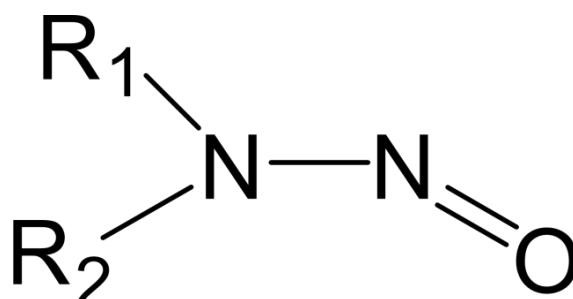
A relação que associa o câncer bucal com o tabagismo é variável de acordo com a intensidade do consumo de cigarros diários, assim como pela longa duração do hábito de fumar os diversos tipos de cigarros como o cigarro de palha, cachimbo, charutos e os industrializados conhecidos como tradicionais (SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

No tabaco já foram encontradas mais de 60 substâncias carcinogênicas e o ato de fumar permite a combustão de vários produtos cancerígenos. A alteração que ocorre na mucosa bucal decorre da presença dessas substâncias associadas à exposição contínua ao calor desprendido pela combustão do fumo. O tabaco sem fumaça (rapé e tabaco para mascar) também pode favorecer o aparecimento da doença devido a um contato mais prolongado dos resíduos deixados entre bochecha e língua (SILVESTRE; JERONYMO, 2007). Nas células epiteliais que revestem a mucosa do trato aerodigestivo, ocorre o processo de degradação do tabaco que resulta em elementos como fonte de nitrosamina, os quais atuam na promoção do câncer bucal (KIGNEL; BIRMAN, 2000).

2.2.1 Produção de Nitrosamina por *Candida*

As nitrosaminas são compostos variados formados a partir de uma reação das aminas ou aminoderivados com agentes nitrosantes, as quais possuem alto potencial cancerígeno. Sua característica estrutural comum é a presença do grupo funcional N-NO incluindo nitrosaminas e nitrosamidas (Figura 1) (SANCHES FILHOS et al., 2003).

Fig. 1. Estrutura química da nitrosamina



Estudos observacionais com as exposições de nitrosamina são altamente complexos, havendo a ocorrência simultânea de diversos fatores

(PEREIRA, 2008). Em humanos, é certo que a exposição ocorre pela inalação e ingestão de nitrosaminas pré-formadas ou pela nitrosação endógena (OLIVEIRA et al., 2005). Estas substâncias geralmente se formam em meio ácido (pH 3) tanto no ambiente como *in vivo*. Embora os alimentos e o tabaco sejam importantes fontes de exposição dos compostos N-nitrosos, estes parecem originar-se *in vivo* através da reação do nitrato com as aminas. Cerca de 5% do nitrato ingerido é transformado em nitrito na saliva e misturados às aminas encontram-se junto ao suco gástrico condições ideais para formar a nitrosamina. (SANCHES-FILHOS, 2002).

Nitrosaminas e seus precursores podem estar presentes em uma vasta variedade de produtos naturais ou bens manufaturados, agrotóxicos, tabaco, detergentes, inibidores de ferrugem, artigos de borracha, solventes, medicamentos, plásticos, produtos em couro, têxteis e cosméticos. Nos alimentos, os compostos N-nitrosos são utilizados largamente como aditivos alimentares, principalmente em alimentos não cozidos, atuando nos produtos industrializados favorecendo qualidades de aroma, sabor, textura e preservação do produto. No entanto, o uso é discutível por serem conhecidos como potentes cancerígenos, indicados por alguns estudos com relação entre a ingestão de nitrosaminas e o risco a diferentes tipos de câncer (DIETRICH et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005).

As nitrosaminas podem surgir como produtos de reação entre o nitrito ingerido ou formado, reagidos com as aminas secundárias ou terciárias e amidas presentes nos alimentos. A ingestão do nitrito deve ser restringida, pois este pode agir no organismo sobre a hemoglobina e produzir a metamioglobina, que inibe a função normal do sangue em transportar oxigênio (GIRI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2005). Nitrosaminas que atingem a corrente sanguínea humana podem surgir ou partir de fontes endógenas, sintetizadas no estômago a partir de precursores ingeridos por alimentos, ou de fontes exógenas, sendo absorvido já pré-formado (GIRI et al., 2013).

As nitrosaminas têm sido associadas ao desenvolvimento de câncer, especialmente, de tumores localizados no trato respiratório, no sistema digestivo, na bexiga, no cérebro e principalmente na cavidade oral de fumantes (PEREIRA, 2008). De fato, o tabagismo é a maior fonte exógena de exposição

às nitrosaminas que são formadas por processo de nitrosação da nicotina durante a fermentação (GIRI et al., 2013).

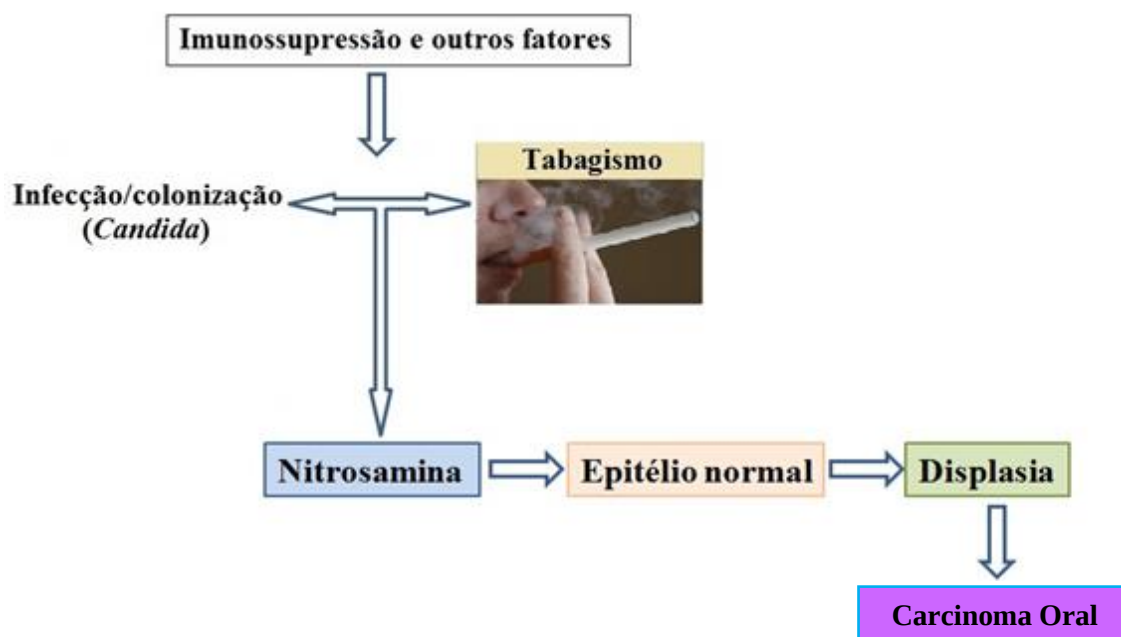
Outra via de formação das nitrosaminas é através do processo bioquímico de nitrificação e desnitrificação por microrganismos. Bactérias isoladas, procedidas de infecções humanas podem também catalisar a nitrosação de aminas *in vitro* (GIRI et al., 2013; PEREIRA, 2008). Acredita-se que há coparticipação de microrganismos na carcinogênese, além disso, a carga polimicrobiana causada por biofilmes na cavidade oral, podem também possuir interações mutagênicas com a saliva, agindo como cofatores na carcinogênese (MEURMAN, 2010).

Possivelmente, espécies de *Candida* apresentam um importante papel na carcinogênese oral, baseado no fato de que certas espécies têm maior potencial de nitrosação, elaborando assim, compostos de nitrosaminas que desempenham um papel relevante na iniciação da carcinogênese (SANJAYA et al., 2011). Essa capacidade de produzir nitrosaminas foi observada especialmente em *Candida albicans* isolada de lesões pré-cancerosas, com destaques também para *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Torulopsis glabrata*. A aceitação do potencial de *Candida* na promoção de malignidade foi fortalecida quando observou-se que as maiores produtoras de nitrosamina foram as isoladas de lesões pré-cancerosas mais avançadas (KROGH; HOLMSTRUP et al., 1987). Em um modelo experimental utilizando várias combinações da solução cancerígena 4QNO (4-nitroquinoline-1-oxide), foi possível observar a prevalência da indução do carcinoma escamocelular oral quando combinaram 4QNO com *C. albicans* (O'GRADY; READ, 1992).

A ação de *Candida* como agente promotor de neoplasias, ficou fortemente evidenciando, em um caso real de um paciente idoso, acometido de candidíase esofágica, recorrentes por 12 anos, após diversos tratamentos com antifúngicos sem sucesso. Após o surgimento de linfonodos cervicais, diagnosticou-se um carcinoma de células escamosas associado à infecção por levedura do gênero *Candida*. Possivelmente, a infecção em longo prazo do epitélio esofágico pela levedura e subsequente exposição prolongada à nitrosaminas, podem explicar o desenvolvimento do carcinoma, uma vez que o paciente não apresentava fatores de risco evidentes ao câncer como tabagismo, alcoolismo e predisposição genética (DELSING et al., 2012).

A hipótese da atuação de espécies de *Candida* na promoção de lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral tem sido abordada, em especial na capacidade de *C. albicans* na nitroação para formar nitrosaminas a partir dos seus precursores. Estas nitrosaminas agem no epitélio normal, levando ao desenvolvimento de displasia e de carcinoma oral, sugerindo o papel promotor do gênero *Candida* (Figura 2). Contudo, ressalta-se que a ação carcinogênica ocorre concomitante a outros fatores tais como violação da integridade epitelial e uso de carcinógenos como tabaco. Além disso, a capacidade de produzir neoplasia diretamente, sem a ação de outros fatores de risco ainda não está completamente esclarecida (SANJAYA et al., 2011).

Fig. 2. Esquema relacionando a promoção do câncer oral por nitroação de *Candida*.



Modificado de Sanjaya et al., (2011).

2.3 Tipos de câncer de boca

O câncer é desenvolvido a partir de diversos tipos celulares que compõem o organismo. Assim, quando tem início em tecidos epiteliais (pele ou mucosa) é denominado carcinoma. Se iniciar em tecido conjuntivo (osso, músculo ou cartilagem), denomina-se sarcoma. Os vários tipos de câncer possuem a

capacidade de invasão de tecidos, em órgãos vizinhos ou distantes, fenômeno conhecido como metástase (INCA 2006; SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

A maioria das lesões malignas localizadas nos tecidos bucais são carcinomas (até 95% dos casos), tumores de origem epitelial chamado de carcinoma epidermóide, que decorre da proliferação desordenada do epitélio de revestimento bucal. Os outros tipos de tumores que podem ocorrer na cavidade oral, embora apresentem menor incidência, são os tumores salivares (das glândulas salivares menores e da sublingual), os sarcomas (de origem vascular, musculares e ósseos) e o melanoma de mucosa (INCA, 2011).

O carcinoma epidermóide, também chamado de espinocelular ou de célula escamosa, está associado ao consumo de álcool e tabaco. Este tipo classifica-se em: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (INCA 2011; LONGO et al., 2011). Geralmente, essa neoplasia se caracteriza pelo rompimento do epitélio, com formação de uma úlcera de consistência e base endurecidas. Exibindo normalmente um fundo granuloso e grosseiro, com bordas elevadas circundando a lesão. Em casos raros, podem apresentar consistência mole, como ocorre comumente nas lesões herpéticas, traumáticas e nas aftas. Do ponto de vista clínico, pode-se classificar as lesões da boca em ulceradas, nodulares e vegetantes (MS, 1996; SILVESTRE; JERONYMO, 2007).

As lesões ulceradas são divididas em superficial (quando se situam paralelamente ao plano do epitélio), infiltrantes (quando invadem os tecidos subjacentes) e infiltrante destrutiva (quando, além da infiltração, ocorre perda de tecido e a lesão se aprofunda, constituindo-se numa lesão endofítica). As lesões nodulares caracterizam-se por serem recobertas de mucosa normal e geralmente representam lesões benignas ou malignas de glândulas salivares menores. Já as lesões vegetantes se exteriorizam e por isso, são denominadas exofíticas (MS, 1996).

O melanoma de mucosa oral é uma neoplasia de baixa prevalência, representando cerca de 0,5% de todos os tumores malignos orais. Os locais de maior incidência são o palato duro (40%), seguido do palato mole e gengiva; língua e soalho de boca são menos comuns. Apresentam características clínicas com o surgimento de lesões hiperpigmentadas, com

coloração variável de cinza ao negro e de vermelho ao roxo (MARTA et al., 2007).

2.4 Tratamento e complicações do câncer bucal

Os diferentes tratamentos dos mais variados tipos de cânceres permitem a remoção de células e tecidos neoplásicos, e vêm passando por grandiosos avanços, principalmente com as novas drogas utilizadas na quimioterapia, na radioterapia, as vacinas, os transplantes de medula óssea entre outros. Entretanto, a escolha do tratamento deve ser adequada de acordo com o caso clínico (LONGO et al. 2011; SAPOLINIK, 2003). Para o câncer de boca, são preconizados: radioterapia, quimioterapia e cirurgia, além das possíveis associações destas três formas, e a escolha desse tratamento depende do grau histológico, da localização da lesão, do estadiamento e das condições físicas do paciente (VOLPATO et al., 2007; SANTOS et al., 2010).

A terapia fotodinâmica tem se apresentado como alternativa eficaz para o tratamento de lesões neoplásicas dos tecidos bucais. Neste procedimento, ocorre a administração de um fármaco não tóxico, por via sistêmica, local ou tópica, seguida da aplicação de uma dose específica de luz visível sobre a região a ser tratada. Para os tumores de boca, os fármacos fotossensibilizadores mais utilizados são os derivados de porfirinas. O emprego da aplicação da terapia fotodinâmica promove a morte das células tumorais tanto por mecanismos de necrose quanto por mecanismos de apoptose, ao mesmo tempo em que estimula o sistema imune a procurar e destruir metástases, sem causar danos ao paciente (LONGO et al., 2011; PERUSSI, 2007). Apesar dos resultados promissores obtidos com essa técnica, no Brasil, encontra-se liberada para utilização apenas na pesquisa clínica.

No tratamento cirúrgico para o câncer de cavidade oral é realizada a ressecção da massa tumoral e de outros tecidos circunjacentes, chamado de margem de segurança, e dos linfonodos cervicais, procedimento conhecido como esvaziamento cervical. A cirurgia é a opção de escolha para os casos de carcinoma epidermóide nos seus estágios iniciais, sendo que em estágios mais avançados, recomenda-se a utilização conjunta de quimioterapia ou radioterapia (LONGO et al., 2011; VOLPATO et al. 2007).

A quimioterapia compreende o uso de substâncias citotóxicas, que podem ser feitas por diversas drogas e apresenta algumas variáveis relacionadas com o tipo de fármacos, a dose e a frequência do tratamento, além do uso de outras terapias concomitantes. Estes fármacos interferem nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares e tem como princípio a destruição de células tumorais malignas, porém também causam injúria às células normais, provocando complicações variadas como: cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, depressão da medula óssea, além de outros efeitos colaterais (AVRELLA; GOULART, 2008; SAPOLINIK, 2003).

A radioterapia é uma modalidade terapêutica para o tratamento loco-regional do câncer, destruindo as células neoplásicas, assim como as células normais que se encontram na região próximas ao tumor. Quando essa radiação é preconizada para tumores de boca e na região de cabeça e pescoço, produz algumas alterações ao indivíduo, que dependem da fonte, do campo e das doses de radiação (BONAN et al. 2007; SANTOS et al., 2010).

No tratamento com radioterapia, as lesões malignas bucais estão associadas a diferentes reações adversas, afetando de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes e podendo interferir no tratamento. Esta terapia comumente conduz à infecção na mucosa oral por espécies de *Candida*, com redução da função salivar e destruição do tecido glandular pela radiação, uma vez que, pode ocorrer lesão dos tecidos normais, especialmente nos quais as células normalmente se reproduzem rapidamente (ALMEIDA et al., 2009; BONAN et al., 2007; DAHIYA et al., 2003; JHAM; FREIRE, 2006; NAGY et al., 2000; RAMIREZ-AMADOR et al., 1997; SAMUELS, 2004).

Dentre as complicações orais associadas ao tratamento do câncer, os mais comuns são: estomatite, infecções, sangramento, mucosite, dor, cáries, trismo, ageusia e xerostomia. Contudo, no tratamento radioterápico para o câncer bucal ocorrem danos em localizações de mucosa, nas glândulas salivares, nas estruturas de suporte dental e nos dentes. Sendo estas alterações possivelmente classificadas em agudas, quando se referem a mucosite ou estomatite, e crônicas, para a xerostomia, cárie de radiação, trismo, alterações no paladar, dermatite, necrose de tecidos moles e osteorradioneecrose (KELNER; CASTRO, 2007; SANTOS et al., 2010; VOLPATO et al., 2007).

A mucosite oral é um termo utilizado para descrever a alteração aguda da mucosa irradiada. É caracterizada por inflamação na mucosa apresentando dor, coloração avermelhada, com infiltrado inflamatório crônico persistente e descamação levando à ulceração (BONAN et al., 2005; GONDIM et al., 2010; VIEIRA; LOPES, 2006). Referida como um dos primeiros sinais clínicos decorrente do tratamento antineoplásico, ocorrendo em aproximadamente 40% nos pacientes que submetem a quimioterapia e em quase 100% aos submetidos a radioterapia na região de cabeça e pescoço (KELNER; CASTRO, 2007; LÔBO; MARTINS, 2009).

Esta manifestação clínica surge após alguns dias do início da quimioterapia e a partir da segunda semana de radioterapia, porém, desaparece lentamente em quatro semanas após o tratamento. Clinicamente, inicia-se apresentando hiperemia e a mucosa pode encontrar-se edemaciada. Em seguida, pode ocorrer atrofia do tecido, descamação úmida, formação de eritemas, hiperqueratinização, ulceração e até necrose da mucosa. Comumente, um quadro de infecção secundária da úlcera por *Candida albicans* pode estar presente. Também, pode-se observar eritema de intensidade variável, e discreto desconforto bucal (KELNER; CASTRO, 2007; LÔBO; MARTINS, 2009; VOLPATO et al. 2007).

Os fatores que contribuem para severidade da mucosite ligado à radioterapia são: a duração e o tipo de radiação, o volume tecidual irradiado e dose diária, além de condições ligadas ao paciente, como a idade, condição clínica bucal alterada como cárie e precariedade da higiene oral. O início da mucosite, se dá em torno da segunda semana após o início do tratamento radioterápico. Entre a primeira e a terceira semana depois do término do tratamento pode ocorrer melhora clínica (ALMEIDA et al., 2009; VIEIRA; LOPES, 2006; RUBIRA et al., 2007).

A mucosite interfere de forma negativa sobre a qualidade de vida do paciente e aumenta o custo do tratamento. Em alguns casos, como na mucosite severa, onde ocorre a necessidade de um ajuste no tratamento ou até mesmo a interrupção da radioterapia ou quimioterapia, pode haver a redução do controle local do tumor e das taxas de sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (KELNER; CASTRO, 2007; LONGO et al., 2011; VIEIRA; LOPES, 2006).

Na última década, houve um aumento nos estudos quanto à prevenção e tratamento da mucosite oral devido à radioterapia. Para reduzir o desenvolvimento da mucosite severa e de microrganismos, indica-se uma higiene oral qualificada através da utilização do fio dental, escovação dos dentes após as refeições, tratamento das cáries, avaliação das próteses dentárias. O bicarbonato de sódio contribui deixando o ambiente oral alcalino, dessa forma inibindo a proliferação de candidíase oral e bacteriana (ALBUQUERQUE; CAMARGO, 2007).

A laserterapia para mucosite oral é a aplicação de laser em baixa intensidade considerada não invasiva. Observouse-se com essa abordagem a redução da severidade da mucosite e uma boa aceitação por parte dos pacientes (VIEIRA; LOPES, 2006). Além disso, a terapia a laser favorece a atividade celular, reduzindo a inflamação da lesão, obtendo uma reparação rápida (KELNER; CASTRO, 2007).

Os danos provocados pelas glândulas salivares ocasionados pela radioterapia, levam a secreção de saliva diminuída. Essa hipossalivação é denominada xerostomia, uma das sequelas mais frequentes da radioterapia, que ocorre devido a radiosensibilidade elevada das glândulas salivares. Uma diminuição na quantidade e qualidade da saliva pode afetar a microbiota oral, a qual sofrerá variações. Por fim, estas variações também ocorrem durante a quimioterapia, levando a um grande desequilíbrio do ecossistema microbiano oral (MEURMAN, 2010; NIEMINEN et al., 2009; RUBIRA et al. 2007).

Os efeitos da radiação foram observados em cem pacientes com tumores bucais e os sintomas mais referidos foram boca seca, disfagia (dificuldade de deglutir) e disgeusia (diminuição do paladar). Com a evolução das doses de radiação, surgiu a mucosite e com o prolongamento do tempo de tratamento, houve o favorecimento do aumento da candidíase atrófica (RUBIRA et al., 2007).

Diante dos estudos controversos que investigam o controle da microbiota bucal em pacientes com câncer, os cuidados na saúde oral são importantes, durante e após o tratamento do câncer, devido às complicações que ocorrem nesses pacientes comprometendo a nutrição, a qualidade de vida e o prognóstico dos mesmos (KELNER et al., 2007; MEURMAN, 2010).

2.5 Câncer bucal associado a infecções fúngicas

A presença de fungos em tumores é estudada desde a década de 50, quando através de técnicas citológicas observou-se a presença de esporos de fungos e outras estruturas em vários tipos de neoplasias (CAWSON, 1969; DILLER; FISHER, 1950; MESCON et al., 1951). A possível associação entre *Candida* e neoplasia oral foi primeiramente descrita em 1960 e estudos posteriores apresentaram a relação de carcinoma oral com a presença de outros fungos (CAWSON, 1969; McCULLOUGH et al., 2002). *Candida* também sido relacionada com carcinoma recorrente de língua em um paciente após um período de quinze anos do primeiro tratamento para curar uma hiperplasia do tipo nodular por hemiglossectomia e esvaziamento radical associado a quimioterapia (SHIBATA et al., 2011).

Em 1993 foi descrita a presença de *Paracoccidioides brasiliensis* associado ao câncer, sendo considerada de rara ocorrência naquele período (SHIKANAI-YASUDA et al., 2008). Posteriormente, um estudo detalhado de casos clínicos de Paracoccidioidomicose (PCM) foi realizado e constatou-se 25 casos com diagnóstico dessa infecção em associação com câncer (RODRIGUES et al., 2010). A presença dessa micose também foi relatada no Japão em um paciente com hábito tabagista e etilista que residiu por um longo período na América do Sul. A lesão apresentava-se ulcerada na orofaringe, refratária a diversos tratamentos e que simulava um carcinoma (KURAI et al., 2012). Estudos apontam que essa simulação pode ocorrer devido ao caráter crônico e progressivo das lesões ulceradas orais, as quais podem ser semelhantes a neoplasias. Qualquer ulceração crônica da mucosa oral e de difícil cicatrização por mais de duas semanas, pode ser considerada uma neoplasia maligna ou uma infecção inespecífica, sendo esclarecido o caráter da lesão através de uma biópsia adequada (MENESES-GARCÍA et al., 2002).

A associação entre os microrganismos e o câncer oral pode apresentar uma relação pela inflamação que é uma característica fundamental em muitas doenças crônicas, com destaque para câncer bucal. Malignidades gastrointestinais demonstraram grande quantidade de citocinas e fatores de crescimento liberados pelas células durante a inflamação, que poderiam influenciar na indução do câncer (MEURMAN, 2010). Nos casos de PCM ativa,

a incidência do câncer pode ser atribuída à disfunção da imunidade celular. Assim, a contínua estimulação de células epiteliais e do sistema mononuclear fagocitário por antígenos fúngicos pode afetar a vigilância celular, causando transformações celulares malignas (RODRIGUES et al. 2010).

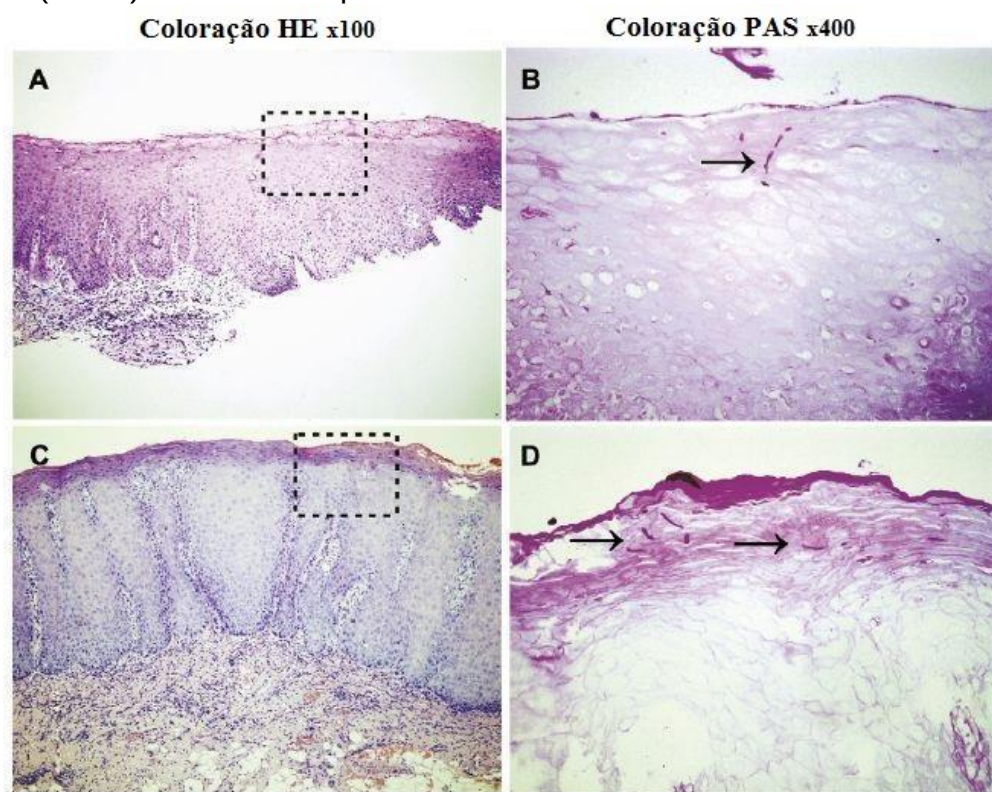
A elevada incidência e associação de fungos em neoplasias de cavidade oral têm exigido pesquisas que possam emitir diagnóstico preciso de fungos presentes no sítio acometido pelo câncer e a ação promotora de neoplasias destes microrganismos. Neste sentido, tem sido descrita a atividade cancerígena de extratos obtidos a partir de *C. parapsilosis*, *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp. e *Scopulariopsis* sp. (RODRIGUES et al., 2010). Observou também que 44,6% dos casos, numa amostra de 223 biópsias de lesões orais variadas, ocorreu presença de leveduras. Estes resultados reforçam o papel das leveduras no desenvolvimento das neoplasias (McCULLOUGH et al., 2002).

Espécies de *Candida*, podem causar lesões bucais secundariamente a líquen plano, leucoplasia e principalmente carcinoma. Sua presença em carcinomas é interpretada como colonização secundária da mucosa previamente alterada. Alterações epiteliais da fase oral mucosa, tais como trauma, maceração, atrofia, hiperplasia e displasia, podem comprometer a barreira mucosa e predispor a infecção por *Candida*. Essa invasão tem sido sugerida como um fator de risco significativo na transformação maligna de leucoplasia oral (SPOLIDORIO et al., 2003). Hifas de *Candida* invadindo a superfície do epitélio perpendicularmente foram visualizadas. Além disso, elas estabeleceram associação com as coleções de leucócitos polimorfonucleares na formação de microabscessos (WU et al., 2013).

A existência de uma forte associação entre a infecção por *Candida* e a hiperplasia inflamatória cada vez mais vem sendo aceita no meio científico. Essa associação, algumas vezes, pode ser considerada a etiologia da lesão; todavia a infecção por *Candida* não só causa hiperplasia epitelial, mas também pode induzir atipia epitelial conduzindo à alteração maligna (BADAUY et al., 2005; SITHEEQUE; SAMARANAYAKE, 2003). No estudo com 832 biópsias, a frequência de infecção por *Candida* em lesões malignas bucais de diversos graus de displasias ajuda a corroborar a associação. Os dados permitiram confirmar a prevalência dessa levedura, sendo constatado ao histopatológico

leucoplasias com hiperqueratose (SPOLIDORIO et al., 2003). Uma avaliação em 396 pacientes com leucoplasia oral, oriunda por *Candida* foi observada em 59 pacientes (Figura 3). Constatou-se, ainda, que a infecção por *Candida* predominou na correlação com a presença de displasia bucal severa (WU et al., 2013). Assim, a presença frequente de *Candida* em lesões leucoplásicas é considerada o tipo de lesão pré-cancerígena mais associada à cavidade bucal (SILVA et al., 2007; VUCKOVIC et al., 2004).

Fig 3. Histopatologia com coloração de HE e PAS de leucoplasia por *Candida*. Pseudohifas de *Candida* foram invadindo o epitélio da hiperplasia (A e B) e displasia (C e D). Seta mostra pseudo-hifas *Candida*.



Modificado de WU et al., 2013.

2.6 Infecção bucal por *Candida* spp. secundária ao tratamento do câncer

Diferentes mecanismos terapêuticos isolados ou combinados têm sido utilizados no tratamento do câncer favorecendo o desenvolvimento dessas infecções, as quais constituem a maior causa de morbidade e mortalidade (CARDOSO et al., 2005; KELNER; CASTRO, 2007; OSTERNE et al., 2008; PANCERA et al., 2004; SAWADA et al., 2006; SCHWARTZ et al., 2001). A candidíase oral é a infecção fúngica mais comum observada na boca, sendo considerada de importante incidência, classificadas como pseudomembranosa, eritematosa, leucoplásica, mucocutânea, podendo disseminar para a forma sistêmica (NAVAS et al., 2009).

Existem variantes clínicas da candidíase orofaríngea como pseudomembranosa que caracteriza com placas discretas e base eritematosa encontrado na mucosa bucal, da garganta, da língua ou da gengiva; já na eritematosa há manchas vermelho lisa no palato duro ou mole, dorso da língua, ou da mucosa bucal; quanto a hiperplásica com manchas brancas firmemente aderidas a mucosa bucal bilateral, língua ou palato e, por fim, a quelite angular que é uma lesão fissurada vermelho nos cantos da boca (COLLINS et al., 2011). Essas infecções ocorrem durante e após a terapia antineoplásica acarretando uma série de danos ao paciente e é destacada pela participação de espécies fúngicas. Pesquisas efetuadas em pacientes com neoplasias demonstraram que a maioria deles são acometidas por várias espécies de *Candida*, destacando-se *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (MOYSÉS NETO et al. 1997; RIBEIRO et al. 2003; BENSADOUN et al., 2011; THAWEBON et al., 2008; JHAM et al., 2007; SPOLIDORO et al., 2011; SILVA et al., 2004; CARDOSO et al., 2005; BONAN et al., 2007).

O processo de infecção por *Candida* e sua associação ao câncer inicia a partir da capacidade que as espécies colonizadoras da microbiota oral possuem em se tornar patógenas, sendo uma relação importante de ser estudada. As infecções causadas por *C. albicans* estão normalmente ligadas à formação de biofilmes, que é uma estrutura de células de leveduras, pseudo-hifas e hifas envolvidas em uma matrix extracelular (NIIMI et al., 2010). Observa-se diversos procedimentos para sanar os problemas causados por esses microorganismos e a higiene tem sido uma das principais ações na

redução da morbidade do paciente, frente ao risco de infecções sistêmicas no tratamento do câncer (NAGY et al., 2000).

2.7 Câncer bucal associado à colonização e infecção por *Candida*

Para esclarecer a associação entre colonização e infecções por *Candida* em pacientes com câncer, se faz importante salientar que esta levedura é a principal comensal residente na microbiota da mucosa digestiva e da área genital. E dentre estas leveduras um grupo de oito espécies apresenta como sapróbias da cavidade oral (BENSADOUN et al., 2011; PETER et al., 2011). Um pré-requisito para o crescimento da colonização dos comensais nas superfícies mucosas é a capacidade de *Candida* em aderir a células endoteliais, enquanto a invasão e danos das células endoteliais são consideradas como outras atividades específicas da infecção (NAGLIK et al., 2011). Em pessoas saudáveis, os comensais da microflora bucal podem desempenhar um papel importante na prevenção e supercrescimento de *Candida*, inibindo a aderência desta levedura na superfície oral que levaria ao parasitismo (SANJAYA et al., 2011).

Candida albicans é a espécie mais prevalente na microbiota bucal. Tem como principal reservatório no dorso posterior da língua e apresenta em cerca de 70% a 80%, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata* (BENSADOUN et al., 2011; PETER et al., 2011; NAVAS et al., 2009). Apesar de ser um microrganismo sapróbio, espécies de *Candida* podem assumir formas patogênicas frente a determinadas condições fisiológicas e patológicas, que comprometem o sistema imunológico. Diversos autores definem vários mecanismos e fatores predisponentes que estão envolvidos em uma relação parasita-hospedeiro, dentre eles as condições endógenas ou exógenas dos hospedeiros que se tornam vulneráveis a tais infecções (AVRELLA; GOULART 2008; BENSADOUN et al., 2011).

Em casos de *Diabetes mellitus* descompensada, medicamentos que causam predisposição a xerostomia comumente utilizados por idosos como antidepressivos, diuréticos e anticolinérgicos são apontados como fatores de risco à levedurose, bem como as terapias para o câncer com destaque ao

tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço (PETER et al., 2011; SONI; WAGSTAFF, 2005; DE FREITAS et al., 2013).

Durante o tratamento radioterápico há um aumento na colonização de leveduras do gênero *Candida* devido ao comprometimento do sistema imunológico e pelos danos às glândulas salivares os quais levam à secreção diminuída de saliva. As variações na quantidade, complexidade e qualidade da microbiota oral também podem ocorrer durante a quimioterapia, levando a um grande desequilíbrio do ecossistema (ALBUQUERQUE; CAMARGO, 2007; NIEMINEN et al. 2009; MEURMAN, 2010; VIEIRA; LOPES, 2006; BONAN et al., 2007).

O diagnóstico microbiológico específico é mal estabelecido para algumas infecções fúngicas, e a interpretação de determinadas amostras torna-se problemático por causa da falta de distinção clara entre colonização e infecção (KLASTERSKY; AOUN, 2004). De qualquer forma, as infecções fúngicas invasivas, possíveis e prováveis devem estar articuladas a três elementos, ou seja, um fator do hospedeiro que identifica pacientes em situação de risco, sinais e sintomas clínicos consistentes com a entidade da doença e evidência micológica, que englobava cultura e análise microscópica (PAUW et al., 2008).

Para entender a importante diferença entre parasitismo e comensalismo na cavidade oral exames micológicos (direto e cultura) e histopatológicos são utilizados para o diagnóstico que determina a presença da doença. Os exames utilizados para o diagnóstico da candidíase oral pode ser realizado através da citologia exfoliativa, biópsias e cultura (PETER et al., 2011).

Para o diagnóstico da candidíase oral da mucosa superficial na população imunocompetente em biópsia, os organismos de hifas, são observados dentro da camada de queratina do epitélio. Na cultura, pode ser realizada uma avaliação quantitativa, através da quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) com amostras incubadas por 48 a 72 horas nas temperaturas de 25° e 30° C. No entanto, em pacientes saudáveis são encontradas de 0 a 1.000/mL UFC e em pacientes com candidíase oral podem chegar até 50.000/mL. Assim, alguns critérios são estabelecidos para diferenciar comensalismo de parasitismo, com achados estruturais

significativos no exame direto e uma cultura representativa (PETER et al., 2011).

No diagnóstico laboratorial de levedurose por *Candida*, é possível visualizar em esfregaços corados a presença de estruturas fúngicas sob a forma de células filamentosas ou gemulantes (LACAZ et al., 2002). Na candidíase devem ser observadas estruturas blastoconidiadas, associadas ou não a pseudo-hifas e pseudomicélios. Porém, ao se tratar das espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* podem ser observadas hifas verdadeiras (SIDRIM et al., 2004). Em análises teciduais, todas as espécies de *Candida* são semelhantes morfológicamente com presença de blastosporos (2-6 µm), pseudo-hifas e hifas septadas. No entanto, em microscopia se o agente etiológico for *C. albicans* e *C. tropicalis*, podem-se observar hifas verdadeiras (ALMEIDA, 2008).

C. albicans é uma das principais espécies associadas com micoses orais humanas e é a mais virulenta entre as patogênicas *Candida* spp. Isto deve-se, possivelmente, pela capacidade dela se transformar da fase de blastosporos a fase hifal, uma vez que, os tubos germinativos, que marcam o início das hifas em crescimento, estão especialmente implicados na patogênese da candidíase (SAMARANAYAKE et al., 2009). Esta levedura possui a capacidade de invadir o tecido local aderindo especialmente a matriz extracelular subendotelial, conferindo a idéia que a invasão de *Candida* parece ocorrer mais provavelmente em tegumento danificado (SONI; WAGSTAFF, 2005).

De fato, na microbiota, colônias de *Candida* são controladas pela ecologia e integridade dos tecidos. No entanto, os diversos microrganismos presentes ajudam a prevenir a adesão da mucosa e a sua integridade. Diferentemente, alterações nesta ecologia ou lesões na mucosa podem promover o crescimento excessivo destas leveduras (SONI; WAGSTAFF, 2005). Uma vez desenvolvida, candidíase oral pode permanecer confinada na cavidade bucal acometendo a mucosa, pode progredir para candidíase esofágica, ou ainda pode se disseminar desenvolvendo a candidíase sistêmica (DAVIES et al., 2008).

A microbiota bucal com suas centenas de microrganismos presentes e até mesmo na formação biofilme dental, apresenta ameaças aos pacientes imunossuprimidos portadores do câncer. Tal fato ocorre, devido aos microrganismos presentes, sobretudo, espécies de *Candida*, invadirem a corrente sanguínea ou disseminar localmente nos tecidos adjacente, permitindo

a agravo das lesões (MEURMAN, 2010). A transição de comensalismo (colonização) para doenças por espécies de *Candida*, pode ocorrer após alteração no ambiente bucal, favorecida por deficiência imune do hospedeiro, além da associação com os mecanismos de virulência como: Adesão, formação de tubo germinativo, dimorfismo, mudanças fenotípicas, toxinas e enzimas hidrolíticas (GIRI et al., 2013).

Em condições favoráveis específicas, qualquer levedura ou qualquer microorganismo sapróbios podem produzir uma doença invasiva nesse grupo de pacientes a serem submetidos ao tratamento (KLASTERSKY; AOUN, 2011). Contudo, torna-se necessário conhecer o potencial patogênico das espécies envolvidas no câncer bucal, para melhor avaliar a prevenção e tratamento, das infecções associadas.

2.8 Potencial patogênico das espécies de *Candida*

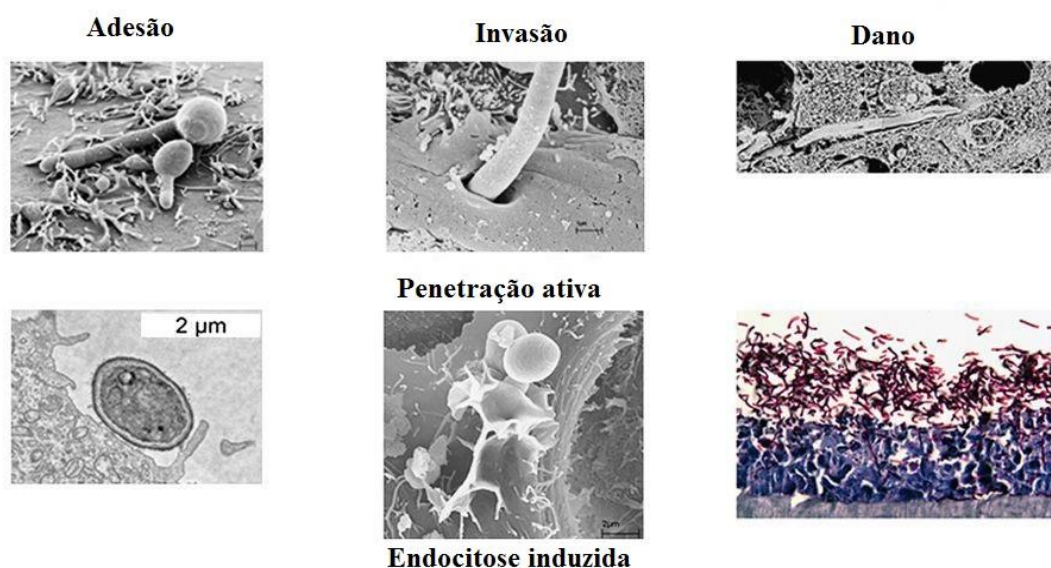
Devido ao aumento de infecções por *Candida* spp. em pacientes com câncer bucal, existe um grande interesse no estudo do perfil patogênico dessas leveduras. Uma vez que, alterações induzidas por quimioterapia e radioterapia causam alterações na microbiota oral e crescimento local do fungo. Além disso, vários fatores inócuos aos fungos estão diretamente ligados com seu potencial patogênico e capacidade de causar doenças (BENSADOUN et al. 2011; SANJAYA et al. 2011).

Vários estudos relatam que a patogenicidade da *Candida* spp. está relacionada a combinação dos diversos fatores que contribuem para a sua virulência, como: capacidade de crescimento a 37°C, variabilidade fenotípica, formação de hifas e pseudo-hifas (>200µm), formação de biofilmes, além da presença de adesinas as quais facilitam a aderência as células epiteliais e habilidade de produzir enzimas hidrolíticas como as fosfolipases. (ÁLVARES et al., 2007; AVRELLA; GOULART 2008; RIBEIRO et al., 2004; RÖRIG et al., 2010; SIDRIM, 2004). Foi observado em culturas isoladas que *C. albicans* produziram mais proteinases e fosfolipases quando comparado com as demais espécies do gênero em temperaturas de 37 °C e 42 °C. Nestas mesmas condições de temperatura, *C. parapsilosis* e *C. albicans* apresentaram

atividade hemolítica, enquanto que isolados de *C. dubliniensis* e *C. krusei* não obtiveram resultados positivos (RÖRIG et al., 2010).

Candida albicans é a principal comensal do homem e a mais frequente dentre as que causam doenças. Sua interação com o hospedeiro pode ser considerada como uma relação entre alguns fatores de virulência, que contribuem para a sobrevivência geral do fungo, associados com a adesão, invasão, dano celular e indução/evasão (Figura 4), além dos mecanismos de defesa do hospedeiro (ÁLVARES et al., 2007; NAGLIK et al., 2011; SANJAYA et al., 2011).

Fig. 4. Estágios de *Candida albicans* na progressão da infecção oral.



Modificado de NAGLIK et al., 2011.

2.8.1 Formação de tubo germinativo

A capacidade de fazer a passagem de brotação para o crescimento de hifas é essencial para a virulência, sendo a formação do tubo germinativo a primeira etapa dessa mudança. Os tubos germinativos marcam o início das hifas em algumas espécies (Figura 5). No entanto, estes são especialmente incriminados na patogênese da candidíase e pode ser utilizado para avaliar a virulência dessas leveduras (HUDSON et al, 2004; SAMARANAYAKE et al., 2009).

Fig. 5. Formação de tubos germinativos



Modificado HUDSON et al., 2004.

O tubo germinativo é avaliado por um fenômeno conhecido como tigmotropismo, o qual permite que fungos do gênero *Candida* emitam largos filamentos capazes de invadir os tecidos com profundidade (RIBEIRO et al. 2004). A capacidade de mudanças morfológicas permite maior fator de virulência. Destaca-se ainda que as hifas têm mais facilidade de aderir e penetrar as células hospedeiras do que os blastoconídios (ÁLVARES et al., 2007). Assim, formação de hifas permite o contato íntimo entre fungos e a célula hospedeira, em um envolvimento chamado endocitose induzida seguido por penetração e invasão tecidual ocasionando dano ao tecido (NAGLIK et al., 2011). O estímulo do crescimento de hifas em *C. albicans* está diretamente relacionada as condições ambientais, incluindo a resposta fisiológica à temperatura de 37°C, ao pH igual ou superior a 7.0 , concentração de CO₂ em 5,5 % ou na presença de soro ou fontes de carbono (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). Porém, a formação de hifas não é necessariamente suficiente para causar danos às células e quase certamente não é o único fator que contribui para a destruição do tecido (NAGLIK et al., 2011).

2.8.2 Aderência a células epiteliais

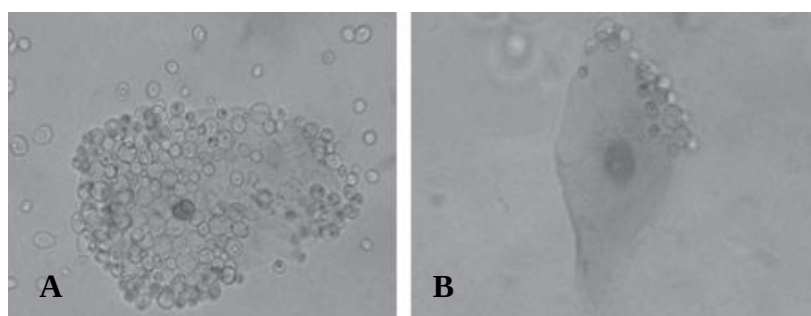
A capacidade de um microrganismo aderir é a primeira etapa que influencia na relação com o hospedeiro dando início na patogênese das infecções dos tecidos epiteliais. Verifica-se, desta forma, que a aderência é um dos principais fatores de virulência nos fungos (KEMMELMEIER et al., 2011). Contudo, alguns microrganismos não invasivos ficam apenas aderidos e outros

utilizam a aderência como o primeiro passo para a invasão tecidual e desenvolvimento da doença (ÁLVARES et al., 2007). A progressão da infecção por *Candida* em células epiteliais bucais é caracterizada por três fases distintas: adesão, invasão via duas rotas diferentes (penetração ativa e endocitose induzida) e dano tecidual (NAGLIK et al., 2011). Foi demonstrado que *C. albicans* isolada antes e nos intervalos mensais de cada ciclo de quimioterapia antineoplásica oral de um idoso de 77 anos de idade apresentou maior capacidade de se aderir ao epitélio (KEMMELMEIER et al., 2011).

A capacidade de formar biofilme é uma propriedade específica de cada isolado, o que desempenha um papel importante na persistência da infecção pela levedura (KEMMELMEIER et al., 2011). Contudo, a variação no potencial de aderir às superfícies entre as espécies de *Candida* é relativa e intrínseca de cada uma, por exemplo, *C. albicans* adere melhor que *C. tropicalis* ou *C. parapsilosis* (SONI; WAGSTAFF, 2005). A adesão é mediada por adesinas que são macromoléculas presente na superfície do microrganismo e estabelece uma ligação com os receptores das células eucarióticas. Um microrganismo pode expressar uma ou mais adesinas. No caso da *C. albicans*, a mesma pode produzir várias dessas moléculas, porém existe uma manoproteína que está primariamente ligada nas reações de adesão (ÁLVARES et al., 2007).

Para que ocorra a aderência de *Candida* nos tecidos epiteliais humanos vários mecanismos estão envolvidos, e essa ligação à célula do hospedeiro ocorre em uma complexa relação com diversos componentes (LIMA-NETO et al., 2009). Na figura 6 é possível observar os estágios de aderência em células do epitélio oral por espécies de *Candida*. *C. albicans* demonstrou-se ter mais capacidade de aderir às células epiteliais orais com relação à outra espécie do mesmo gênero. Além disso, quando irradiadas, células sobreviventes desta espécie apresentaram uma rápida proliferação. Também, foi analisado que as células de *Candida* são mais aderentes aos queratinócitos obtidos a partir de pacientes que submeteram a terapia de câncer bucal, do que as células obtidas a partir de indivíduos saudáveis (UETA et al., 2001).

Fig. 6. Adesão forte e fraca (A e B respectivamente) de espécies de *Candida* em células epiteliais bucais de humano.



Modificado de LIMA-NETO et al. 2009.

A camada mais externa da parede celular de *Candida* é coberta com polissacáridos hidrófilos, tais como manana ou galactomanana. Estas mananas na superfície de fungos tem função de adesinas, que estão envolvidas na adesão celular do hospedeiro (SATO et al., 2013). A presença de mananas na parede fúngica é o principal componente responsável pela capacidade de aderência, além do que, as mananas que promovem a depressão da imunidade (CAMARGO et al., 2008).

Na aderência da cavidade oral, as proteínas presentes na parede celular de levedura interagem com açúcares terminais das glicoproteínas das células epiteliais humanas, as quais, participam como receptoras. Assim, acredita-se que em fumantes, o tabaco permite o aumento da queratinização da mucosa bucal, acentuando a capacidade de adesão de *C. albicans*, e tal adesão, pode influenciar a patogenicidade do organismo em desenvolvimento de lesões pré-câncer e infecções secundárias (SANJAYA et al., 2011).

A capacidade de formar biofilmes é outra forma de estudar aderência pelas leveduras (ÁLVARES et al., 2007). Os biofilmes podem desenvolver frequentemente uma variedade de biomateriais incluindo cateteres vascular e urinário, em próteses (orais, de quadril, mamas) válvulas, implantes, lentes oculares, entre outros (BÜRGERS et al., 2010; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009; KEMMELMEIER et al., 2011; RICICOVA et al., 2010). A saliva também é um componente que pode influenciar significativamente no processo de adesão do fungo a um substrato. A mucina salivar pode servir como um receptor para adesão de *C. albicans*, ao passo que, a albumina pode atuar como um agente

bloqueador no complexo processo de adesão da levedura (BÜRGERS et al., 2010).

Todas as formas morfológicas de leveduras como: células de leveduras e pseudohifas permitem a formação de biofilme. Além disso, a secreção de exoenzima maior durante a formação de biofilme é outro importante aspecto (KARKOWSKA-KULETA et al., 2009). Ainda assim, os biofilmes por *Candida* tornam-se resistentes à perfusão de agentes antifúngicos em superfícies mucosas inertes, como próteses, podendo colaborar para uma incapacidade terapêutica. Assim, a frequente administração de drogas e os efeitos adversos associados, junto com a possível imunodeficiência, oculta o surgimento de resistência aos medicamentos, também, podem prejudicar o tratamento das infecções, conduzindo à recorrência crônica (SAMARANAYAKE et al., 2009).

Em geral, os biofilmes microbianos (bacterianos ou fúngicos) são atualmente um grave problema na medicina, principalmente, pelo aumento a sua resistência frente à defesa do hospedeiro e as terapias antimicrobianas convencionais, muitas vezes resultando em infecções invasivas graves e persistentes (BÜRGERS et al. 2010; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

2.8.3 Detecção de enzimas

As exoenzimas estão ligadas diretamente com o fator virulência dos fungos e têm sido consideradas um dos mais importantes fatores de virulência para espécies do gênero *Candida* (ÁLVARES et al. 2007). As principais enzimas produzidas por leveduras deste gênero que contribuem para a capacidade de invasão são as Aspartil Proteinases (Saps) e as Fosfolipases (ÁLVARES et al., 2007; CALDERONE; FONZI 2001; RÖRIG et al., 2009).

Os efeitos enzimáticos de fosfolipase e proteinase são importantes, pois, promovem a degradação dos componentes da membrana celular. A fosfolipase se localiza na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, causando danos ao epitélio. Quanto à proteinase, tem a capacidade de inativar moléculas do sistema imune e degradar as proteínas do hospedeiro. Estas enzimas apresentam importância nas infecções de mucosa e induzem o processo inflamatório (CAMARGO et al. 2008; KANTARCIOGLU; YÜCEL 2002; OLIVEIRA et al. 1998). A produção de proteinase é considerada

para melhorar a capacidade do organismo de colonizar e penetrar nos tecidos, e para evadir o sistema imune do hospedeiro através da degradação de um número de proteínas importantes que defendem o hospedeiro como as imunoglobulinas, complemento e citocinas (KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002). Além disso, a capacidade de *Candida* para produzir proteases pode ajudar a romper a superfície de queratina do tegumento, o que pode ser importante como resistência dos fungos no assalto oxidativo dos neutrófilos (SONI; WAGSTAFF, 2005). Vale ressaltar, que a secreção de fosfolipases e algumas proteases é expressa especificamente na Candidíase Orofaríngea, e não é visto durante a colonização (BENSADOUN et al., 2011).

Diversos estudos comprovam que SAPs demonstram um considerável desempenho no papel das infecções por espécies de *Candida* e principalmente em *C. albicans* (HUBE 1996; KRETSCHMAR et al., 1999; SONI; WAGSTAFF, 2005). Existem pelo menos nove isoenzimas produzidas por *C. albicans*, codificadas por uma família multigênica (de Sap1 até Sap9). O padrão da expressão *in vitro* destas isoenzimas sugere que os membros da família dos genes podem dar a Sap papéis distintos durante a infecção por *Candida* em diferentes locais do corpo (KRETSCHMAR et al, 1999; SANGLARD et al., 1997). Saps podem ter papéis auxiliares na promoção da adesão, da mesma forma, que a atividade proteolítica extracelular, pode afetar a adesão às células hospedeiras e, portanto, pode ajudar o fungo para persistir em superfícies de acolhimento e de penetrar em tecidos mais profundos (HUBE, 1996).

As investigações com atividade de fosfolipase e protease em espécies de *Candida* isoladas de diferentes sítios anatômicos são importantes para esclarecer a sua contribuição para a virulência de fungos associados com micoses invasivas (KANTARCIOGLU; YÜCEL et al., 2002). Os danos causados pela invasão fúngica aos tecidos de pacientes portadores de câncer bucal constituem, portanto, uma das grandes preocupações por parte dos profissionais durante o tratamento destes pacientes, que buscam, amenizar e controlar os efeitos secundários decorrentes da radioterapia e da quimioterapia (SENA et al., 2009). Assim, se faz importante o entendimento dos diversos fatores de virulência destas leveduras, para estabelecer estratégias de controle com antifúngicos e prevenção (RÖRIG et al., 2009).

2.9 Susceptibilidade às drogas antifúngicas

Várias drogas antifúngicas são utilizadas no tratamento de micoses e são classificadas de acordo com sua atuação exercida sobre as células dos fungos como os polienos (anfotericina B, nistatina); nucleósidos análogos (pirimidinas-fluorotinas/5-fluorocitosina), azóis (miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomícinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos (CARDOSO, 2004).

Os antifúngicos do grupo triazólico são comumente utilizados no tratamento de micoses e também aplicados profilaticamente, pois apresentam menos toxicidade com relação aos poliênicos. Os azólicos interferem na biossíntese do ergosterol, o esteroide presente em maior quantidade na membrana plasmática dos fungos (ZARDO; MEZZARI, 2004). Já os polienos formam complexos com o ergosterol e rompem a membrana plasmática, aumentando a permeabilidade da membrana com a formação de canais ou poros, libertando o conteúdo citoplasmático e consequentemente morte celular (CARDOSO, 2004; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

A anfotericina B é a droga poliênica mais potente e bastante eficaz para o tratamento de infecções fúngicas e apesar de ser considerada uma droga de referência para a maioria das micoses, principalmente as sistêmicas, a sensibilidade dos patógenos a este antifúngico o torna um importante elemento no tratamento de infecção fúngicas. Por outro lado, liga-se ao colesterol da membrana das células humanas, alterando-as e provocando efeitos adversos. Contudo, a sua toxicidade implica no uso limitado (MARTINEZ, 2006; MEZZARI, 2004; UETA et al., 2001).

Certos números de antifúngicos são eficazes agentes terapêuticos, utilizados topicamente ou sistemicamente e estão disponíveis para a administração oral de candidíase. Estes vão desde os clássicos polienos como a nistatina e a anfotericina B, até o grupo azol - antimicóticos, que inclui os imidazóis e os triazóis mais recentes (SAMARANAYAKE et al., 2009). No caso do tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. é limitado a um número pequeno de agentes antifúngicos, o que inclui poliênicos como nistatina e anfotericina B; azólicos, entre eles o cetoconazol, itraconazol e

fluconazol; e derivados azólicos recentes, como o voriconazol e o posaconazol (AVRELLA; GOULART, 2008).

Em controvérsia, esse método terapêutico utilizado durante muitos anos através de antifúngicos tópicos, tais como a nistatina oral e a anfotericina oral B apresentam certas desvantagens para o paciente como: gosto desagradável e necessidade de múltiplas aplicações diárias (SENA et al., 2009). A nistatina, um fungistático e fungicida isolado de cepas de *Streptomyces noursei*, é semelhante a anfotericina B, porém é altamente tóxica quando administrada por via sistêmica e consequentemente, não adequada para infecções sistêmicas por *Candida* (CASTRO et al., 2006).

Os azólicos, se dividem em imidazólico (o miconazol e o cetoconazol) e Triazólico (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e ravuconazol), podem ter ação fungistática ou fungicida apresentando uma melhor solubilidade e menor nefrotoxicidade comparada aos polienos, porém, menos potentes que os mesmos. Os triazólicos possuem mecanismos de ação semelhantes, agindo especialmente no citocromo CYP450 da parede celular do fungo (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; MARTINEZ, 2006; SENA et al., 2009).

O uso excessivo dos azóis na terapêutica desencadeou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis. Por isso, tem sido frequente o reconhecimento de isolados de leveduras com suscetibilidade diminuída ou resistência aos antifúngicos. Esta resistência pode ser clínica ou *in vitro*. Relatos de resistência entre espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, ocorre especialmente durante a administração medicamentosa a longo prazo (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; CASTRO et al. 2006; PETER et al., 2011; MARTINEZ, 2006; ZARDO; MEZZARI, 2004). Observou-se que *C. krusei* é resistente ao fluconazol e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados de *C. glabrata* são variáveis, porém frequentemente maiores do que para *C. albicans* (ZARDO; MEZZARI, 2004).

O fluconazol tem sido o medicamento mais estudado para o tratamento de infecções fúngicas oportunistas em pacientes oncológicos na região de cabeça e pescoço, apresentando melhores resultados e eficácia em debelar tais infecções (SENA et al., 2009). Contudo, a profilaxia com fluconazol deve

ser reservada para pacientes com risco de desenvolverem fungemia (ZARDO; MEZZARI, 2004).

O surgimento de leveduras com resistência secundária aos antifúngicos, provocou a necessidade da aplicação de métodos para avaliar a sensibilidade a essas drogas (SENA et al., 2009). Para aprimorar os estudos com susceptibilidade dos fungos aos agentes terapêuticos, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com o objetivo de normatizar as metodologias utilizadas, regularizou um método de referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica M27-A3 (CARDOSO, 1994). Este método baseia-se na exposição de leveduras a uma série de soluções de concentrações crescentes de um antifúngico preparado num meio de cultura sintético, o RPMI. E, é feita, recorrendo à determinação da viabilidade, atividade ou crescimento das células de leveduras, quando em contato com o agente (CARDOSO, 1994; CLSI, 2008). Para o CLSI, o método de diluição em caldo, é o de referência, com uma reprodutibilidade intra e interlaboratorial acima de 90%. (ZARDO; MEZZARI, 2004).

A radiação perto das glândulas salivares, comum em pacientes com câncer bucal, diminui a salivação. Tais alterações no microambiente oral favorecem a colonização por fungos, e o uso repetitivo de antifúngicos azólicos, induz ao surgimento de espécies de *C. não-albicans* a eles resistentes. No entanto, torna-se possível em alguns doentes tratados com sucesso para o câncer bucal, desenvolverem um novo carcinoma primário no local da mucosite crônica por *Candida*, causada por espécies de *Candida* não-albicans (NIEMINEN et al., 2009).

A busca de novos princípios ativos medicamentosos como antifúngicos, vem sendo realizada, a partir de estudos baseados em sínteses de novas drogas, como também, fitoterápicos, os quais, tem sido uma excelente alternativa no ensaio de novos antifúngicos com reduzidos efeitos colaterais. (LEITE et al., 2006; FERREIRA, 2012).

2.10 Alternativa terapêutica de *Indigofera suffruticosa* como potencial antifúngico

As novas alternativas medicamentosas utilizando fitoterápicos, vêm apontando vantagens devido ao baixo custo no preparo, como também, o conhecimento científico das plantas medicinais (MOLINA et al., 2010). Populações rurais e urbanas ainda utilizam ervas medicinais tradicionais para tratamento de doenças e cuidados com a saúde. Sendo estas, manipuladas durante séculos, desde os primórdios da humanidade. Diversas plantas, são tradicionalmente usadas, no tratamento de infecções, e nessas, podem ser encontradas novas propostas a drogas antifúngicas (FERREIRA, 2012 et al., 2006).

No Brasil, a utilização de ervas medicinais tem na prática indígena suas bases, que influenciada pela cultura africana e portuguesa, disseminou uma cultura popular e é utilizada indiscriminadamente. Atualmente, os estudos com plantas surgem em busca de novas drogas que apresentem maior eficácia e reduzido efeito colateral (ALVES; SILVA, 2003; MOLINA et al., 2010; LEITE et al., 2006).

Atualmente, diversas plantas, vegetais e ervas usadas na medicina popular e tradicional são consideradas como uma das principais fontes de descoberta e desenvolvimento para droga de quimioprevenção contra o câncer, por exemplo, a *Indigofera suffruticosa*, conhecida também por anil, índigo e anleira (VIEIRA et al., 2007). Esta planta herbácea pertencente à família Fabaceae típicas de regiões tropicais e subtropicais, encontrada no cerrado brasileiro (Figura 7). É uma espécie conhecida por apresentar uma fonte rica de flavonóides derivada de glicosídeo quercetina e alcalóides, com várias propriedades e utilidades (LUIZ-FERREIRA et al., 2011; CHEN et al., 2013).

Fig. 7. Representação ilustrativa da espécie *Indigofera suffruticosa* Mill.



(Acesso: www.hear.org/.../full/starr-030202-0088.jpg)

Além de apresentar, utilização na medicina popular, designada para tratamentos de inflamações e epilepsia, a *I. suffruticosa* é utilizada na indústria têxtil como corante natural (LEITE et al., 2006; VIEIRA et al., 2007; CHEN et al., 2013). Outros estudos também apontam sua atividade antimicrobiana e antitumoral, visto que, os extratos de *I. suffruticosa*, têm propriedades promissoras na alternativa contra o câncer (VIEIRA et al., 2007; CHEN et al., 2013). Extratos aquoso e etanólico de *I. suffruticosa* sobre a expressão de anticorpos específicos e o nível de glutathione, utilizando células hepáticas de rato através de mecanismos molecular, implicou na indução de fase II enzimas de desintoxicação e conteúdo de glutathione (CHEN et al., 2013).

Verificou-se que, o extrato aquoso de folhas desta herbácea não apresentou efeitos citotóxicos, apenas, baixa toxicidade em doses elevadas. Além disso, apresentaram redução na atividade tumoral em ratos (VIEIRA et al., 2006). Ainda, os extratos aquosos atuaram como agentes gastroprotetor, enquanto que, extratos metanólicos com fração de acetato de etila, mostraram-se eficazes na inibição das lesões gástricas induzidas nos ratos. Isto mostra

uma visão para o mecanismo de citoproteção gástrica e o papel ativo de flavonóides e alcalóides apresentados em AcF de *I. suffruticosa* (LUIZ-FERREIRA et al., 2011). Assim, acredita-se que, está é uma planta promissora para estudos futuros na obtenção de novas drogas com funções terapêuticas.

Já com relação a atividade antimicrobiana, foram testados extratos de *I. suffruticosa*, obtidos por infusão e maceração contra cinco espécies de bactérias e 17 amostras fúngicas, pelo método de difusão ágar-sólido. Apenas o extrato aquoso, apresentou graus variáveis na atividade antibacteriana e antifúngica contra vários microrganismos testados. O extrato aquoso obtido por infusão apresentou resultados contra *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum Canis*, enquanto o extrato orgânico não mostrou atividade (LEITE et al., 2008).

Diante do exposto, torna-se indispensável o conhecimento da conduta terapêutica empregada, no que tange a eficácia dos fármacos diante da grande diversidade de fungos resistentes. Mesmo que o uso indiscriminado dos agentes antifúngicos tenha aumentado e favorecido, cada vez mais, o desenvolvimento de resistência dos fungos, principalmente a *Candida* spp.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a relação da produção de nitrosamina, e a susceptibilidade antifúngica *in vitro* de fluconazol e do extrato natural de *Indigofera suffruticosa* Mill em culturas de leveduras isoladas de neoplasia maligna bucal.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar espécimes clínicos em pacientes com neoplasia maligna bucal;
- Realizar microscopia direta e análise histológica de secções teciduais de neoplasias maligna bucal;
- Isolar e identificar fungos dos espécimes clínicos;
- Correlacionar dados como sexo, idade, localização da lesão ao diagnóstico micológico e tipo de neoplasia bucal;
- Estudar a relação da produção de nitrosamina por leveduras, através da revisão de literatura;
- Avaliar o perfil patogênico dos isolados com relação a: aderência, formação de tubo germinativo e produção de protease;
- Coletar, preparar e obter extrato de *Indigofera suffruticosa*;
- Determinar *in vitro* a atividade antifúngica de fluconazol e extrato de *I. suffruticosa*.

Artigo 1 submetido à revista Mycopathologia

ISSN: 0301-486X

Fator de Impacto:1.489; Qualis: B2

Oral paracoccidioidomycosis mimicking carcinoma: a case report

Andadre, SL^{1,2}; Brandão, ISL¹; Carvalho Neto PB²; Pontes Filho, NT¹; Neves, RP¹; Macêdo, DPC¹; Menezes, VLL¹.

¹ Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

² University of Amazonas Stats (UEA), Brazil.

³ Cancer Hospital of Pernambuco (HCP), Brazil.

* Correspondence to: Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima,

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP: 50670-901. Phone: 81 2126.8546, Fax: 81.2126.8540

Email: vlml@ufpe.br

* Correspondence to: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP: 50670-420. Phone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480

E-mail: rejadel29@yahoo.com.br

Abstract

Paracoccidioidomycosis is a fungal infection, endemic to South American countries, which can affect the lungs, skin and mucous membranes. It commonly develops mucosal injuries of the oropharynx, pharynx and mouth, especially in regions such as hard palate, soft palate and dental alveolus, causing alveolar bone destruction, ulcerative and infiltrative lesions. These oral lesions of paracoccidioidomycosis have been, in some cases, difficult to diagnose since are simulating carcinoma. Thus we report a case of paracoccidioidomycosis mimicking oral carcinoma in a male patient attended at a Brazilian oncologic service, presenting an ulcerated and infiltrating lesion in the palate. Three biopsies were performed in four months, however with inconclusive results and only after the fourth exam the histopathological data were consistent to paracoccidioidomycosis. The diagnosis was confirmed by the double immunodiffusion technique. Amphotericin B was administrated with success. The differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and oral cancer is essential and must be always reported.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; dimorphic fungi; oral cancer.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis, of inflammatory characteristic, caused by the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* [1]. Since the mycelial phase, known as the infective form, is found in soil and vegetation, the main route of contamination is by inhalation, initially with no clinical symptoms. The yeast or parasitic phase occurs at 37°C by thermal conversion [2, 3].

This dimorphic fungus is found in humid tropical and subtropical regions, with higher occurrences of PCM in southeastern Mexico, Central America, and South America. Brazil accounts for over 80% of all reported cases [2, 4].

PCM mainly affects rural workers, of all ages, however is more frequently between 30-50 years old, with a predominance of males. The PCM lesions are primarily located in the lungs since the major route of infection is by inhalation, however may also occur in the gut or by skin trauma. Initially, this infection is characterized by common symptoms of several lung disease, such as cough, sputum, dyspnea, anorexia, and hemoptysis [3, 4].

The PCM presents various clinical aspects once it may spread to organs or systems, including the skin and mucosa. The clinical forms of the disease are classified into acute and subacute (juvenile type). Moreover the chronic form (adult type) occurs in 90% of individuals above 30 years old, being considered unifocal or multifocal when commits one or more bodily sites, respectively [5, 6].

The mucosal lesions comprehend the region of oropharynx, pharynx as well as oral cavity, including areas of hard palate, soft palate, dental sockets, among other locations. Commonly, it causes progressive destruction of alveolar

bone with variable morphology, specially the infiltrative or ulcerative form, with infiltrated borders [2, 7].

The clinical and morphological diversity of PCM demands a differential diagnosis along with tuberculosis, Hodking disease, and other systemic and subcutaneous mycoses [4].

In this context, ulcerative lesions of paracoccidioidomycosis are very similar to the mouth intracavitary tumors such as squamous cell carcinoma [4]. Therefore, these oral lesions of PCM have been difficult to diagnose, in some cases, which requires a more detailed histopathological analysis [2].

This disease can progress silently, presenting signs and symptoms similar to other granulomatous diseases, which may delay diagnosis and effective treatment, and contribute to high rates of morbidity and mortality [4]. Thus, the study of clinical cases is justified by the similarity between the evolution of PCM and neoplasia. Therefore, the present study aimed to report a case of paracoccidioidomycosis mimicking oral carcinoma.

Patient and Methods

Case report

Male patient, 63 years old, resident in the countryside of Pernambuco, Brazil, retired farmer, currently working as general services assistant, was attended in the clinic of Head and Neck of Cancer Hospital of Pernambuco, presenting palate injury over about a year ago. At the moment, the patient reported smoking and alcohol consumption over a period of approximately 50

years, consuming about 10 cigarettes per day, however he had quit smoking two years ago.

In preliminary clinical examination, the patient presented ulcerative-infiltrative and vegetating lesion on the hard palate and absence of cervical lymph node involvement. Given his clinical history of smoking and alcohol consumption, and also physical examination, the diagnostic hypothesis was malignancy. The patient underwent histopathology evaluation which showed ulceration, acute and chronic mucosal inflammation, reaching the submucosal mucous glands, with no evidence of neoplasia.

After 30 days, a new biopsy indicated the presence of granulation tissue. The patient complained of difficulty in swallowing, anorexia and expansion of lesion, being hospitalized for 48 hours. During this period a new biopsy was performed, however the report was inconclusive. The patient was discharged home. After two days, at ambulatory service, a third biopsy was performed showing a chronic inflammatory process with giant-cell reaction, cells of foreign body type and Largerhans. Still in search of a diagnosis, a fourth biopsy was performed and after three days, the patient was admitted at the emergency department for outpatient care with severe dyspnea and impaired general condition. The last biopsy revealed the presence of areas with nonspecific chronic inflammation, fibrosis, and chronic granulomatous inflammatory process with typical *Paracoccidioides* yeast-like cells (Fig 1).

The mycological diagnosis was also conducted at the Department of Mycology of the Federal University of Pernambuco. The double immunodiffusion technique was used and confirmed the case of

paracoccidioidomycosis, with anti- *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in titers of 1:16 (Fig 2).

After seven months, the patient's condition deteriorated, with development of pulmonary disability, difficulty of swallowing, severe cough, fever, dyspnea, cyanosis, anictericia, dehydration, malnourishment and pallidness. Treatment was initiated with rocephin and amphotericin B with a dose of 100mg/day followed by cumulative doses until 2,000mg/day, and also a high calorie and protein diet via nasogastric tube. The respiratory tract infection was treated with clindamycin and tazocin for 10 and 12 days, respectively.

After 42 days, amphotericin B therapy was suspended and replaced by sulfamethoxazole/trimethoprim 1.600/1.600mg and cefepime hydrochloride for 10 days, as secondary prophylaxis. The patient was discharged home after 56 days of treatment, remaining in regular monitoring for control of cure, without relapse of the disease. At the moment, the patient presents residual PCM with destruction of palate.

Discussion

Paracoccidioidomycosis is considered the most diagnosed systemic mycosis in Latin America, with prevalence in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina [8]. Uncommonly Kurai et al. (2012) reported a case of PCM in Japan but the authors considered it an imported disease once this infection was acquired during a trip to South American [9].

Our patient was a farmer and this occupation is considered an important risk factor for the acquisition of this mycosis. Usually, the association between

the agricultural professions with PCM is discussed [2]. Although the patient had presented the typical epidemiological characteristics of PCM as gender and profession, the diagnosis was delayed and challenging to the staff. Moreover, the male sex predominance in PCM is also due to the protective action of hormonal factor- β estradiol in women [2].

Regarding the location of the lesions, the patient had our presented jugal mucosa commitment, followed by the soft palate and lungs, characteristic of multifocal disease. The oral lesions are more frequently described in PCM, according to Ferreira et al. [10]. However, we believe that only these clinical conditions are not conclusive, especially in oral cancer patients, once clinical and histopathological aspects difficult the differential diagnosis.

Based on the reported case is imperative the accurate analysis of infiltrative and ulcerative lesions in the oral cavity when the patient is smoking and alcohol addicted. In this case, the presence of *P. brasiliensis* caused an extensive and unusual histological damage with cellular transformation mimicking a neoplastic tissue although the association of PCM and cancer had been observed [11, 4]. Also PCM lesions can be misdiagnosed as pharyngeal cancer due to the onset of a refractory ulcer [9].

The atypical cases of PCM must always be reported once this fungal infection may precede lung cancer in smokers [4] as occurred in a 53 years old woman whose lesions were simulating lung metastasis. During the diagnostic process she underwent to radiological exam which revealed multiple bilateral pulmonary nodules, suggestive of metastasis. However, lung histopathological findings were compatible with PCM [12].

Also, cases of PCM had already been diagnosed by histopathological examination, in which the patients presented granulomatous and ulcerative oral lesions, with concomitant pulmonary involvement, mimicking squamous cell carcinoma [11]. The incisional biopsy of mouth has been recommended in these cases, and an adequate and well analyzed biological material is essential to establish a correct diagnosis [13]. In our study four biopsies were performed to rule out malignancy and confirm PCM.

In the present case, PCM was also confirmed after the serologic testing double immunodiffusion. This technique is commonly used for detection and titration of antibodies, likewise to the diagnosis, being also useful to prognosis and monitoring of patients during and after treatment [10, 13].

The therapy of choice of our patient was amphotericin B, still considered the drug of choice for many systemic mycoses treatment. Although this drug may cause harmful side effects, in the reported case the clinical course was favorable remaining only with the destruction of palate as a residual form of PCM [11, 14].

We believe that the favorable outcome was only possible due to the histopathological and serological diagnosis which allowed the choice of an appropriate treatment with successful outcome.

Acknowledgments

We would like to thank FACEPE (Brazilian research agency) for financial support, Cancer Hospital of Pernambuco (HCP) and Federal University of

Pernambuco (UFPE) for providing the infrastructure and professional assistance.

References

1. Lenhard-Vidal A, Assolini JP, Ono MA, Bredt CSO, Sano A, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* Antigens Elicit Different Serum IgG Responses in Chronic Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2013; 176:345–52.
2. Sassi LM, Biazolla ER, Trompczynski I, Kanzake T, Freitas, SEM, Furuse CF, Dissenha JL, Simette RL, Russi-Costa RH, Orlandi D, Ramos, GHA, Oliveira, BV, Cervantes, O. Oral Manifestations of Paracoccidioidomycosis. *Rev Int Estomatol*. 2004; 1(2):57-61.
3. Lupi O, Tyring SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 53(6):931-51.
4. Marques AS. Paracoccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*. 2012; 30: 610–5.
5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Paracoccidioidomicose. In: *Tratado de Micologia Médica*. Editora Sarvier, São Paulo 2002, pp 676-84.
6. Shikanai-Yasuda MA, Telles-Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso de Paracoccidioidomicose. *Ver. Soc. Bras Med Tropi*. 2006; 39(3): 297-310.

7. Azenha, MR, Caliento R, Brentegani LM, Lacerda SA. A Retrospective Study of Oral Manifestations in Patients with Paracoccidioidomycosis. *Braz Dent J.* 2012; 23(6): 753-7.
8. Brazão-Silva MT, Andrade, MF, Franco T, Ribeiro RIMA, Silva WSS, Faria G, Faria PR, Cardoso, SV, Loyola AM. Paracoccidioidomycosis: a series of 66 patients with oral lesions from an endemic área. *Mycoses.* 2010; 54: 189–95.
9. Kurai H, Homagari N, Ito K, Kauamura I, Suzuki J, Hadano Y, Endo M, Lida Y, Okinaka K, Katsuhiko. A Case of Oral Paracoccidioidomycosis suspected to be Pharyngeal Cancer. *J. Med. Mycologi.* 2012; 53: 49-52.
10. Ferreira SP, Santos RS, Paula LB; Reis Aas. Prevalência da Paracoccidioidomicose em pacientes diagnosticados no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Goiás, Brasil. *Revista da UninCor.* 2012; 10 (1): 167-77.
11. Meneses-García A, Mosqueda-Taylor A, Luz RM, Ruiz-Godoy LM. Rivera Paracoccidioidomycosis: Report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. *Oral surg. oral med. oral pathol..* 2002; 94(5).
12. Pietro D, Nunes MHG, Krueel NF, Marques ET, Schaefer MB. Paracoccidioidomicose simulando metástase pulmonar. *Arq. catarin. med.* 1997; 26 (1- 4): 71-3.
13. Batista VES, Silva MM, Matheus G. The Importance of the Surgeon-Dentist in the Diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. odontol. UNESP.* 2011; 32 (2): 14-7.

14. Almeida OP, Jorge-Junior J, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the Mouth: an Emerging Deep Mycosis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(4): 268-74.

Fig. 1 Histological diagnosis showing Paracoccidioidomycosis. Yeasts at different developmental stages, 400X (**a** and **b**); foreign body giant cell (*) and yeasts (↑) HE-400X (**c**); yeast cell (↑) and Langerhans type giant cell (*), HE-200X (**d**); outbreaks of fungal proliferation, HE-200X (**e**); fungal proliferation (↑) and areas of fibrosis (*), PAS-200X (**f**).

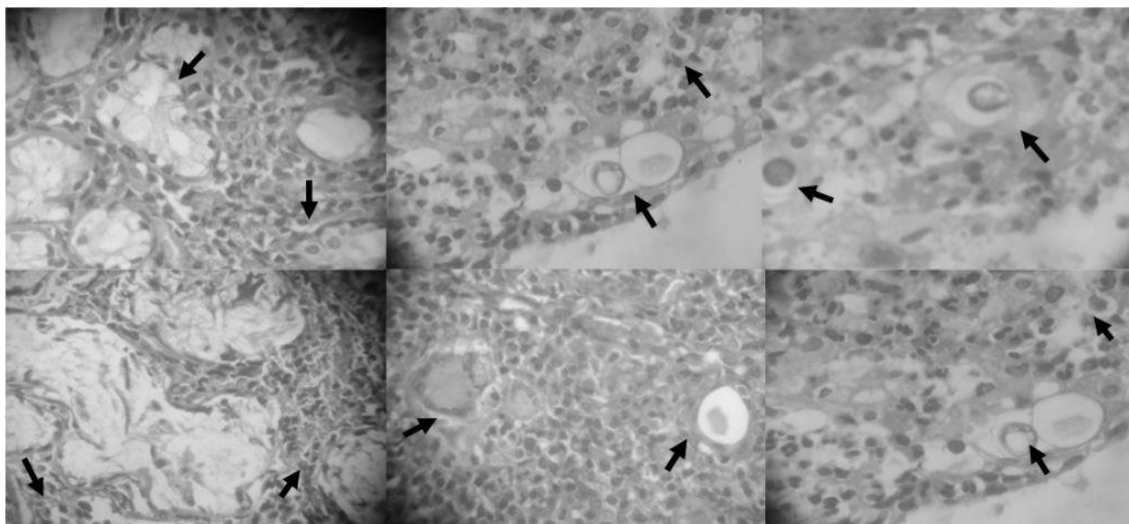
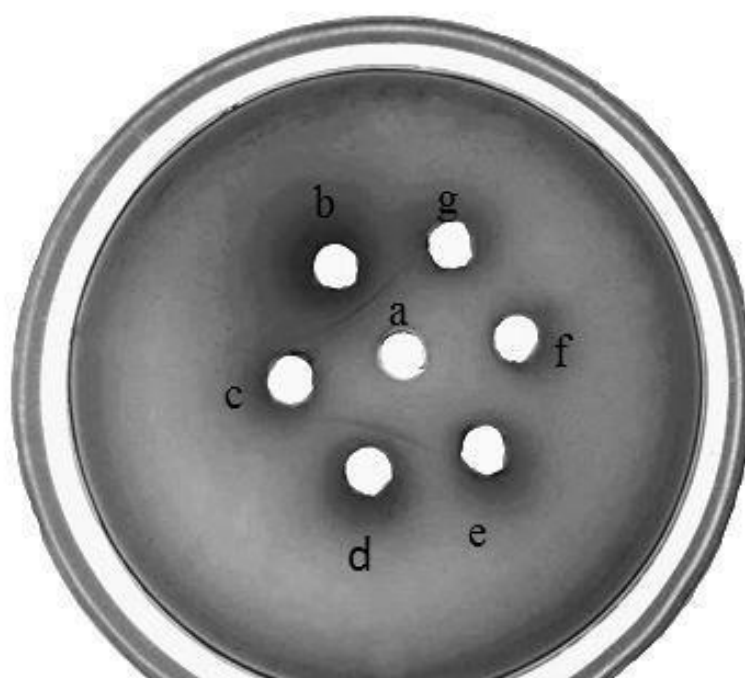


Fig. 2 Serological diagnosis by double immunodiffusion revealing a reagent serum (patient letter **d**) against *Paracoccidioides brasiliensis* antigen (**a**) presented as a band of precipitation. (**b**): Positive serum control; (**c**, **e**, **f** and **g**): Negative tests



CAPÍTULO II

Artigo 2 a ser submetido à Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

*ISSN: 1808-4532
Qualis para Biodiversidade B2*

Candidíase associadas ao câncer oral e fatores de virulência dos agentes etiológicos.

Suanni Lemos de Andrade^{1, 2}; Walter Pinto Neto³; Maria Daniela Silva Bounafina³; Dewson Rocha Pereira³; Weber Melo Nascimento³; Ana Thereza Bezerra dos Santos³; Rejane P Neves³; Vera Lúcia de Menezes Lima³.

Correspondência para: Dra.Vera Lúcia de Menezes Lima Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências da saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.
e-mail: vlml@ufpe.br

Candidiasis associated with oral cancer and virulence factors of etiologic agents

Abstract

. The present study aimed to verify the ability of virulence of *Candida* species isolated from clinical samples of patients with oral cancer. The isolated and identified yeasts were tested for virulence capacity by producing germ tube adhesion to oral epithelial cells, detection of protease sensitivity and antifungal agents: amphotericin B, fluconazole and nystatin. 68 clinical samples were collected from patients who had oral tumors. Clinical specimens obtained from oral tumors, including 14 species of yeast *C. albicans* (7), *C. famata* (2), *C. tropicalis* (3), *C. lusitaniae* (1), and *C. parapsilosis* (1) were isolated. The isolates tested except *C. famata* formed germ tube and *C. tropicalis*. All isolates were able to adhere to oral epithelial cells, and 71.5 % showed high adherence and 28.5 % poor adherence. Isolates of *C. albicans*, six produced protease ranging from very strong and high, as well as *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* and only one isolate of *C. famata*. In front of susceptibility to antifungal agents tested, all were susceptible to amphotericin B and nystatin, however fluconazole for three isolates of *C. albicans* were resistant to the minimum inhibitory concentration of 64 mg / mL. Yeasts are present in oral tumors and may present a threat to patients with oral cancer, even though they undergo immunosuppressive treatments and become vulnerable to such infections, since *Candida* species present virulence and resistance to fluconazole. Therefore, the mycological diagnosis is important in patients with oral cancer due to the occurrence of associated infections, jeopardizing the quality and survival of patients.

keywords: Candidiasis. Oral cancer. *Candida*. virulence factors. antifungal drugs.

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* presentes na microbiota humana são comensais do trato gastrointestinal, pele e mucosas vaginal e oral, atuando nas primeiras barreiras de defesa do organismo. No entanto, alterações no ambiente favorecem o crescimento excessivo dessas leveduras permitindo que espécies de *Candida* causem infecções, sendo na cavidade bucal a candidíase uma das principais condições clínicas (Giri et al., 2013).

A candidíase é a infecção oportunista mais frequente em pacientes imunossuprimidos devido a diversos fatores, comumente ocorrem em portadores de neoplasias malignas, sobretudo quando submetidos a tratamentos antineoplásicos, o que demonstra uma considerável importância clínica para a sobrevivência de indivíduos com câncer (Avrella & Goulart, 2008; Sena et al., 2009; Giri et al., 2013).

O câncer representa um conjunto com mais de 150 doenças consideradas um problema de saúde pública mundial, e particularmente, o câncer de boca o qual ocupa o quinto tipo mais incidente no mundo, representando 40% dos tumores da região da cabeça e pescoço. O tratamento consiste de cirurgia, radioterapia e quimioterapia ou associação entre estes. No entanto, durante esses procedimentos é comum ocorrer o desequilíbrio da microbiota oral e desenvolvimento fúngico local (Bensadoun et al., 2011; Inca, 2013).

Infecções por *Candida* spp. em pacientes com câncer bucal tem sido crescente nas últimas décadas, e pode ocorrer tanto pela imunossupressão local com o estabelecimento da lesão, quanto pela terapia antitumoral. O que

aponta uma grande importância na avaliação do perfil patogênico dessas leveduras. Uma vez que, vários fatores inerentes a estes micro-organismos estão diretamente ligados a capacidade de causar doenças (Bensadoun et al., 2011; Sanjaya et al., 2011).

Diversos fatores de virulência por espécies de *Candida* permitem que danos sejam causados no hospedeiro, destacando-se a capacidade de aderência, invasão e dano tecidual no epitélio do hospedeiro, acarretando várias formas de candidíase na cavidade bucal, além de torna-la capaz de atingir a corrente sanguínea ou disseminar localmente nos tecidos adjacentes permitindo o agravo das lesões (Meurman, 2010).

Os antifúngicos utilizados no tratamento das infecções orais causadas por estas leveduras. Polienos como a nistatina e a anfotericina B, azóis como fluconazol, os quais nem sempre são eficazes em virtude da resistência crescente atribuída ao potencial de virulência (Samaranayake et al., 2009). Assim, o objetivo do trabalho foi verificar a capacidade de virulência de espécies de *Candida* isoladas de amostras clínicas de pacientes com neoplasia bucal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados materiais biológicos obtidos por biópsias de pacientes com lesões tumorais na cavidade oral, atendidos no ambulatório de Oncologia do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço de hospital público de Recife, Brasil para diagnóstico laboratorial micológico.

2.1 Coleta, isolamento e identificação das amostras

As amostras histológicas foram seccionadas e acondicionadas em coletores esterilizados, contendo água destilada esterilizada adicionada de 50mg/L de cloranfenicol e formal para exame micológico e histopatológico, respectivamente. As amostras clínicas foram clarificadas com solução aquosa a 20% de hidróxido de potássio (KOH), para realização do exame direto e paralelamente semeada para cultura em duplicata na superfície dos meios Ágar *Brain Heart Infusion* e Sabouraud Dextrose Ágar suplementados de cloranfenicol (50mg/L) contidos em placas de Petri, mantidas a 30°C e 37°C por até 15 dias. Após o crescimento, as culturas foram purificadas e posteriormente identificadas de acordo com métodos de taxonomia clássica, baseada em critérios macroscópicos, microscópicos e fisiológicos, bem como pelo sistema automatizado para leveduras – VITEK 2 (BioMérieux®20).

2.2 Avaliação do Perfil Patogênico

2.2.1 Formação de tubo germinativo

Para o teste de tubos germinativos, os isolados de *Candida* foram inoculados em albumina e incubados a 37°C, foram realizadas duas análises com intervalo de duas horas cada e a terceira análise após uma hora, totalizando cinco horas e sendo verificado quanto a formação do tubo germinativo, realizada através da microscopia luminosa (Lacaz et al., 2002).

3.2.3 Teste de aderência a células epiteliais

Para o teste foi utilizada metodologia de acordo com Lima-Neto (2009). As células de levedura foram cultivadas em ágar malte (Difco) durante 36 h a

37° C, posteriormente resuspendido em 2 ml de PBS esterilizado de $0,1 \text{ mol}^{-1}$ e pH 6,8 a 4 ° C , lavadas duas vezes por centrifugação (2500g, 5 min cada), com 2 ml de PBS e finalmente resuspendidos em PBS (2×10^7 células ml^{-1}).

As células epiteliais da cavidade oral foram coletadas de um voluntário adulto saudável através de raspagem suave da membrana mucosa da bochecha com swabs de algodão esterilizado. Cada swabs foi cuidadosamente agitado em 5 mL de tampão fosfato em salina (PBS). As suspensões foram lavadas duas vezes em 5 ml de PBS pela centrifugação (2500 g, 5 min cada) e resuspedidas em PBS (4×10^4 células ml^{-1}). A suspensão de levedura e células epiteliais foram e determinadas com câmara de Neubauer. As duas suspensões foram juntamente homogeneizadas, centrifugadas e examinadas quanto à capacidade das células de leveduras em aderir às células da mucosa oral.

Os ensaios de adesão foram desenvolvidos com a mistura de 1 ml de cada suspensão no tubo de ensaio e incubados a 25 e 37°C sob agitação suave durante 2 horas. Posteriormente foram observados em microscopia eletrônica. Os resultados foram classificados como: alta aderência (H) para 50-100 % de área superficial coberta pela levedura, fraca aderência (W) para até 50% e ausência de aderência visível (0).

3.2.4 Produção de Protease

As leveduras foram analisadas quanto a capacidade de produção protease utilizando-se meio indutor

contendo soro de albumina bovina e suspensas em 1,0mL de água destilada esterilizada e contadas em câmara de Neubauer obtendo-se

concentração de 10^6 células/mL. Posteriormente, foram inoculadas no referido meio de cultura e incubadas a 37°C em triplicata, na busca de detectar a formação de um halo transparente. A leitura foi realizada ao final de sete dias e cálculo da zona de atividade (ZA) os quais foram agrupados em quatro classes: ausente (1,0); fraco (0,89-0,80); forte (0,79-0,70) muito forte ($< 0,69$); (Aoki et al., 1990; Serda & Yucel 2002).

3.2.5 Sensibilidade a antifúngicos

O teste foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo, segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguiu o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22mm (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH $7,0 \pm 0,1$ tamponado com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B (Bristol-Myers Squibb), fluconazol (Pfizer) e nistatina (Fagron), em concentrações variando de $0,03 - 16 \text{ mg.mL}^{-1}$ para anfotericina B e nistatina, ambos polienos, e $0,125$ a 64 mg.mL^{-1} para fluconazol, um azol, onde os dois primeiros foram diluídos em DMSO e fluconazol preparado em água destilada.

A *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e os isolados de *Candida* spp. foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 35°C por 24h. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina

(0,85g/L), ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância a 530nm. O volume do inóculo foi posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls.mL⁻¹. Foram utilizados controles positivo e negativo como padrões na leitura. A CIM foi considerada como a concentração mais baixa do antifúngico que produziu uma diminuição evidente da turvação, com 100% de redução no crescimento para os polienos, e 50% para o azol, ambos em relação ao controle sem droga.

3 RESULTADOS

No período de 12 meses, foram atendidos 1.200 pacientes com lesões sugestivas, onde 275 pacientes foram diagnosticados com neoplasia maligna bucal, e dentre estes 68 amostras de fragmento de tecido, foram obtidas para o exame micológico de diversas localizações anatômicas da cavidade bucal, como mostra a figura 1. O pacientes apresentaram uma faixa etária mínima de 30 anos e máxima de 106 anos, e todos os casos resultou uma média de 64 anos de idade, com prevalência do sexo masculino. A localização anatômica da boca predominante foi à língua com 31,7% dos casos diante das demais localizações.

No diagnóstico micológico o exame direto revelou leveduras, isoladas, agrupadas hialinas e em brotação, pseudomicélio, micélio verdadeiro e até mesmo formação de tubo germinativo, como mostra a figura 2, em 13 amostras de fragmento de tecido, representando 19,11% de todas as amostras analisadas. O isolamento de leveduras ocorreu dentre as espécies de *C. albicans* (7), *C. tropicalis* (3), *C. famata* (2), *C. parapsilosis* (1) e *C. lusitaniae* (1) (Tabela 1).

O histopatológico foi conclusivo para neoplasia maligna em 92,3% (12/13) dos casos distribuídos em carcinoma escamocelular (8/13), seguida de carcinoma indiferenciado, carcinoma adenoide e fibrohistocitoma malignos.

Quanto aos fatores de virulência, todas as leveduras apresentaram a capacidade de aderir às células epiteliais bucais classificadas de forte ou fraca aderência (figura 3). *C. albicans* (5), *C. tropicalis* (3), *C. famata* (1) e *C. lusitaniae* (1) apresentaram forte aderência. Os demais isolados apresentaram fraca aderência, como pode ser visto em detalhe na tabela 2.

De todos os isolados de *C. albicans*, seis produziram protease variando entre muito forte e forte, assim como *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, e apenas um isolado de *C. famata*. As espécies de *C. tropicalis* (7092), *C. albicans* (7098) e *C. famata* (7085) não produziram protease (Tabela 3).

Quanto ao teste de formação de tubo germinativo, em todos os isolados foram observados sua formação, com exceção nos isolados de *C. famata* (7085) e *C. tropicalis* (7090) (Tabela 4).

Quanto à susceptibilidade dos isolados analisados frente aos antifúngicos testados, todos apresentaram sensibilidade a anfotericina B e nistatina com o CIM variando de 0,12 -1,00 µg/mL e 0,06-0,12 µg/mL, respectivamente.

Para o fluconazol, três isolados de *C. albicans* foram resistentes com a CIM de 64 µg/mL, como mostra a tabela 5.

DISCUSSÕES

O câncer oral representa uma significativa e preocupante incidência de morbimortalidade, representando aproximadamente 10% dos tumores malignos

na região de cabeça e pescoço, e aponta o quinto tipo de câncer mais incidente entre o sexo masculino na região Nordeste do Brasil (Torres-Pereira, 2012; Galbiatti et al., 2013; Inca, 2013).

Neste contexto, nosso estudo também relata a maior incidência para os homens, corroborando com a literatura que reconhece o sexo masculino ser mais tendenciosos a desenvolver o câncer nesta região anatômica, devido ao maior consumo conjunto de álcool e tabaco (Melo et al., 2010).

A faixa etária do presente estudo apresenta casos entre 30 a 106 anos. Como já se sabe esta malignidade ocorre na maioria dos casos em indivíduos com meia-idade e mais velhos, e diversos estudos apontam uma nova realidade epidemiológica com números exorbitantes de casos em adultos jovens nos últimos anos e maiores de 40 anos, imperando este mesmo sexo (Neville & Day 2002; Torres-Pereira et al., 2012).

O principal e mais comum tipo histológico das neoplasias malignas da boca é o carcinoma escamocelular, que de acordo com Brener et al. (2007) e Torres-Pereira, (2012) representa 95% dos casos. Sendo este tipo de neoplasia o mais ocorrente em nossos achados. Quanto à localização anatômica dos tumores, neste estudo houve prevalência da língua seguido de assoalho bucal, assim como o estudo de Brener et al. (2007) que afirmam ser a língua o sítio mais comum para o câncer bucal, correspondendo a 44% dos casos, seguido de assoalho bucal com 16%.

Com relação aos agentes etiológicos da candidíase as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata* e *C. lusitaniae* foram isoladas, sendo as três primeiras espécies citadas, encontradas também no estudo de

Kignel & Birman (2000), que isolaram leveduras da superfície das lesões malignas orais.

Os achados fúngicos nos fragmentos de tecidos deste estudo mostram presença de leveduras, isoladas, agrupadas hialinas e em brotação, além de pseudomicélio, micélio verdadeiro e tubo germinativo visualizadas em exame direto. Corroborados por diversos autores que consideram a presença dessas estruturas visualizadas no tecido, característica de infecção e não colonização (Lacaz et al., 2002; Sidrim et al., 2004; Giannini & Shetty, 2011).

A transição de colonização a doenças por espécies de *Candida* pode ocorrer após alteração no ambiente bucal, favorecida por deficiência imune do hospedeiro, além da associação com os mecanismos de virulência, como adesão, formação de tubo germinativo, dimorfismo e presença de enzimas hidrolíticas (Soni & Wagstaff, 2005; Giri et al., 2013).

Estudos que verifiquem a capacidade de virulência em leveduras isoladas de neoplasia maligna oral são raras. Porém, um estudo de Umazume et al., (1995), verificou a adesão de *C. albicans* por saliva de pacientes saudáveis, comparados a pacientes que antes e depois de ser submetido a tratamento antitumoral para o câncer bucal, e constataram o aumento da capacidade de adesão após terapia. Em nosso estudo os pacientes encontravam-se ausentes de tratamento e foi possível confirmar que 80% dos isolados foram capazes de aderir a células epiteliais orais.

Outro perfil de patogenicidade é o polimorfismo, uma característica importante das leveduras do gênero *Candida* verificada por diversos autores (Samaranayake et al., 2009; Giri et al., 2013), como tubos germinativos que marcam início das hifas em crescimento de *C. albicans*, que estão

especialmente implicados na patogênese (Samaranayake et al., 2009). Da mesma forma verificamos que todos isolados de *C. albicans* produziram tubo germinativo, além das espécies *Candida* não-*albicans*.

Para o perfil enzimático, o estudo de Rogi et al., (2009) afirma que 100% dos isolados de *C. albicans* testados produziram proteases. Em nosso teste, verificamos que 85,8% dos isolados da mesma espécie foram capazes de produzir protease e 79% de todas as leveduras analisadas produziram.

Publicações baseadas em testes de sensibilidade a nistatina através da norma CLSI M27-A3 são escassos, assim utilizamos os mesmos padrões de análise para o grupo dos polienos assim como algumas pesquisas utilizam (Kemmelmeyer et al., 2011).

Alves & Cury (1992) realizaram um estudo de sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de dois grupos de pacientes com câncer e sem câncer. Foram testados os polienos utilizados em nossa pesquisa, anfotericina B e nistatina, porém com metodologia distinta. Contudo, os autores verificaram não haver diferença nos isolados obtidos de pacientes tratados e não tratados para o câncer, sendo todos os isolados sensíveis aos polienos testados. Da mesma forma os nossos isolados foram sensíveis a nistatina e anfotericina B.

Em relação ao fluconazol foi possível verificarmos a resistência de três isolados de *C. albicans*. O fluconazol é o tratamento mais utilizado para infecções fúngicas de pacientes oncológicos de acordo com o estudo de Sena et al. (2009) através de uma revisão sistemática, investigaram o tratamento de candidíase orofaríngea de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, e mostram importância em analisar a resistência de *Candida* frente ao fluconazol.

Uma vez que, estes pacientes ainda iram submeter a tratamentos antineoplásicos, os estudos de Alves & Cury (1992) e Kemmelmeier et al. (2011) alertam para os tratamentos de radioterapia e quimioterapia, serem capazes de modificar várias características de uma levedura, incluindo o seu potencial de virulência, além dos micro-organismos adquirirem mutação, que permite a resistência aos poliênicos.

Em conclusão, as infecções por *Candida* na cavidade oral pode afetar a sobre vida e qualidade de vida dos pacientes com câncer bucal, uma vez que a capacidade patogênica dos isolados somada a terapia imunossupressora permite o desenvolvimento da infecção fungica associação ao câncer.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologiado Estado de Pernambuco – FACEPE, pelo apoio financeiro. Ao Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) por fornecer a infra-estrutura e assistência profissional.

Referências

1. Alves S H, Cury A E. Sensibilidade de levedura do gênero *Candida*, isolada de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos. Rev. Inst. Med. Trop. 1992; 34(3): 251-54.
2. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative pathogenicity of wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. Zentralblatt für Bakteriologie. 1990; 273:332-43.
3. Avrella D, Goulart LS. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. RBAC. 2008; 40(3): 205-07.
4. Badauy CM. Relationship between *Candida* infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. Oral Microbiology Immunology. 2005; 20:89-92.
5. Bensadoun RJ, Patton LL, Lalla, R.V; Epstein, J.B. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update 201. Support Care Cancer. 2011; 19:737–44.

6. Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Oral squamous cell carcinoma: a literature review of patient profile, clinical staging and proposed treatment. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2007; 53(1): 63-9.
7. Conceição GC, Coêlho PP, Júnior, MAS, Pereira ML, Miguel, DSCG, Toralles MBP. Avaliação do Tubo Germinativo em secreção vaginal a fresco para triagem de *Candida albicans*: Um teste rápido. *NewsLab*. 2005. edição 73
8. Galbiatti ALS, Padovani-Junior JÁ, Maníglia JV, Rodrigues, CDS, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2013;79(2): 239-47.
9. Giannini PJ, Shetty KV. Diagnosis and Management of Oral Candidiasis. *Otolaryngol. Clin N Am*. 201; 44: 231–240.
10. Giri D, Agarwal N, Sinha, A. *Candida* Associated Oral Cancer. *RUJODS, Ranchi University*. 2013; 2(1): 47-57.
11. Kemmelmeier EG, Vidigal PG, Svidzinski TIE. Increased virulence of *Candida albicans* after antineoplastic chemotherapy. *Rev Ciênc Farm Básica Aplicada*. 2011;32(2): 257-62.
12. Kignel S, Birman EG. Aspectos Fúngicos do Câncer Bucal. *Rev. Bras. de Cancerol*. 2000; 46: 279-82.
13. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Paracoccidioidomicose. In: *Tratado de Micologia Médica*. Editora Sarvier, São Paulo 2002.
14. Lima-Neto RG, Beltrão IC, Oliveira PC, Neves RP. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses*. 2009; 54: 23–9.
15. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Falando sobre o câncer de boca. Rio de Janeiro, Brasil. 2013. Da Saúde Ministério.
16. Melo LC, Marcelle Silva C, Bernardo JMP, Marques EB, Leite ICG. Epidemiological profile of incident cases of oral and pharyngeal cancer. *RGO - Rev Gaúcha Odontol*. 2010; 58(3): 351-55.
17. Meurman JH. Oral microbiota and câncer. *Journal of Oral Microbiology*. 2010; (2): 5195.
18. Neville BW, Day T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin*, 2002; (52):195-215.
19. Rörig, RCO; COLACITE J, ABEG MA. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2009; 42(2):225-27.
20. Samaranayake LP, Leung WK, Jin L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology* 2000. 2009; 49(1): 39-59.
21. Sanjaya PR, Gokul S, Patil BG, Raju R. *Candida* in oral pre-cancer and oral câncer. *Medical Hypotheses*. 2011; 77:1125-128.
22. Sena MF, Gondim LAM, Souza GCA, Ferreira MAF, Costa Lima KC. Treatment of oral candidiasis in patients with head and neck cancer: a systematic review. *Revista da AMRIGS*. 2009; 53(3):241-45.
23. Sidrim JJC. *Micologia Médica à luz dos autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
24. Soni N, Wagstaff A. Fungal infection. *Current Anaesthesia & Critical Care*. 2005; 16: 231–241.

25. Serda, A.K., Yucel, A. 2002. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160–165.
26. Sitheeque MAM, Samaranayake LP. Chronic Hyperplastic Candidosis/Candidiasis (Candidal Leukoplakia). *Crit. Revista Oral Biologia Medica*. 2003; 41: 253-267.
27. Torres-Pereira CC, Aldo Angelim-Dias A, Melo NS, Lemos CA, Oliveira EMF. Strategies for management of oral cancer in primary and secondary healthcare services. *Cad. Saúde Pública*. 2012; 28 Sup:S30-S39,
28. Umazume M, Ueta E, Osaki T. Reduced inhibition of *Candida albicans* adhesion by saliva from patients receiving oral cancer therapy. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 432–9.

Figura 1. Diversidade das lesões em cavidade oral: lesões ulcerativas, vegetantes e crostosas. A: lesão de assoalho de boca lesão; B: Palato mole à esquerda; C: Lábio inferior; D: Lateral de língua à direita; E: rebordo gengival superior a esquerda; F: Loja amigdaliana esquerda.



Fig. 2 Leveduras aderidas a célula epitelial. **A**: fraca aderência; **B**: forte aderência.

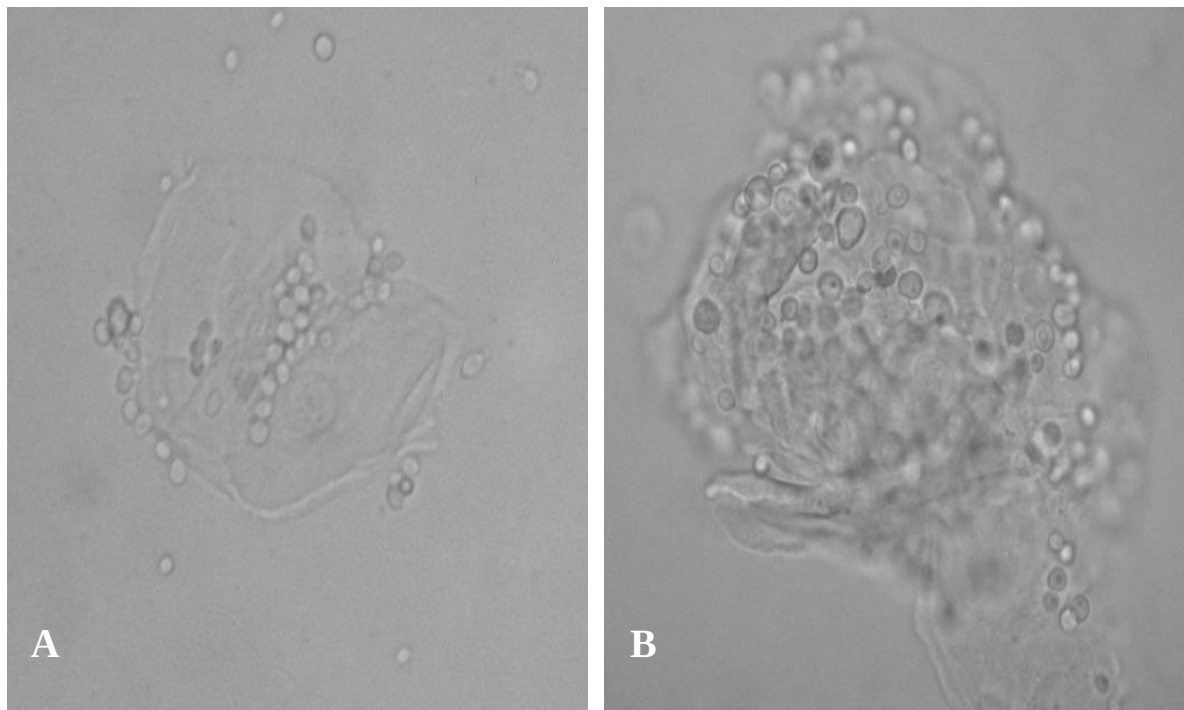


Tabela1. Achados fúngicos em lesões bucais correlacionando localização tumoral com espécie isolada.

Nº do caso	Registro (URM ^a)	Localização tumoral	Exame micológico direto	Espécie
09	7085	Rebordo gengival inferior esquerdo	Presença de células de leveduras isoladas, brotantes e filamentos verdadeiros. Tubo germinativo.	<i>Candida famata</i>
10	7086	Assoalho de boca a direita	Presença de várias células de leveduras isoladas, agrupadas e brotantes.	<i>C. albicans</i>
10	7087	Assoalho de boca a direita	Presença de várias células de leveduras isoladas, agrupadas e brotantes.	<i>C. parapsilosis</i>
17	7088	Loja amigdalina	Presença de células leveduriformes e vários filamentos (pseudo-micélio e micélio verdadeiro).	<i>C. albicans</i>
18	7089	Dorso de língua	Presença de várias células de leveduras isoladas, agrupadas e brotantes.	<i>C. albicans</i>
28	7090	Borda gengival superior esquerda	Várias células leveduriforme isoladas e em brotação	<i>C. tropicalis</i>
29	7091	Prega glossoamigdalina	Presença de várias células leveduriformes isoladas e em brotação.	<i>C. tropicalis</i>
43	7092	Região geniana da boca	Presença de várias células leveduriformes isoladas e em brotação.	<i>C. tropicalis</i>
47	7098	Palato ósseo e mucosa jugal	Presença de várias leveduras isoladas, brotantes, agrupadas e formando tudo germinativo.	<i>C. albicans</i>
49	7093	Base de língua	Presença de várias células de leveduras	<i>C. lusitaniae</i>

			isoladas e agrupadas.	
57	7094	Região retro-molar direita	Presença de várias células de leveduras isoladas e brotantes	<i>C. albicans</i>
62	7095	Base de língua	Presença de várias células leveduriforme isoladas, agrupadas e hifas verdadeiras.	<i>C. albicans</i>
66	7096	Tu. de língua	Presença de várias células leveduriforme isoladas e agrupadas.	<i>C. famata</i>
67	7097	Palato	Presença de várias células leveduriforme isoladas e agrupadas	<i>C. albicans</i>

^a URM Culture Collection/Federal University of Pernambuco/Brazil

Tabela 2. Capacidade de aderências dos isolados as Células epiteliais orais

Registro (URM ^a)	Levedura	Teste de aderência
7085	<i>Candida famata</i>	W
7086	<i>C. albicans</i>	H
7087	<i>C. parapsilosis</i>	W
7088	<i>C. albicans</i>	H
7089	<i>C. albicans</i>	W
7090	<i>C. tropicalis</i>	H
7091	<i>C. tropicalis</i>	H
7092	<i>C. tropicalis</i>	H
7098	<i>C. albicans</i>	H
7093	<i>C. lusitaniae</i>	H
7094	<i>C. albicans</i>	W
7095	<i>C. albicans</i>	H
7096	<i>C. famata</i>	H
7097	<i>C. albicans</i>	H

^a URM Culture Collection/Federal University of Pernambuco/Brazil
H: alta aderência; **W:** baixa aderência; **0:** Ausencia de aderência

Tabela 3. Resultado do teste enzimático quanto à produção de proteases de leveduras isoladas de neoplasia bucal.

Registro (URM ^a)	Espécie	ZA Proteásica
7085	<i>Candida famata</i>	—
7086	<i>C. albicans</i>	++++
7087	<i>C. parapsilosis</i>	++++
7088	<i>C. albicans</i>	++++
7089	<i>C. albicans</i>	++++
7090	<i>C. tropicalis</i>	++
7091	<i>C. tropicalis</i>	+++
7092	<i>C. tropicalis</i>	—
7098	<i>C. albicans</i>	—
7093	<i>C. lusitaniae</i>	++++
7094	<i>C. albicans</i>	++++
7095	<i>C. albicans</i>	++++
7096	<i>C. famata</i>	++++
7097	<i>C. albicans</i>	++++

^a URM Culture Collection/Federal University of Pernambuco/Brazil
ZA (zona de atividade)

++++Muito forte (ZA < 0,69); +++Forte (ZA de 0,79-0,70);

++Fraco (ZA de 0,89-0,80); --- Ausente (ZA 1,0).

Tabela 4. Formação de Tubo germinativo por espécies de *Candida*

Registro (URM ^a)	Espécie	Tubo Germinativo
7085	<i>Candida famata</i>	-
7086	<i>C. albicans</i>	+
7087	<i>C. parapsilosis</i>	+
7088	<i>C. albicans</i>	+
7089	<i>C. albicans</i>	+
7090	<i>C. tropicalis</i>	-
7091	<i>C. tropicalis</i>	+
7092	<i>C. tropicalis</i>	+
7098	<i>C. albicans</i>	+
7093	<i>C. lusitaniae</i>	+
7094	<i>C. albicans</i>	+
7095	<i>C. albicans</i>	+
7096	<i>C. famata</i>	+
7097	<i>C. albicans</i>	+

^a URM Culture Collection/Federal University of Pernambuco/Brazil

+ formação de tubo germinativo positiva

- formação de tubo germinativo negativa

Tabela 5. Suceptibilidade de espécies de *Candida* isoladas de neoplasia bucal frente a antifúngicos.

Espécie	Registro nº (URM ^a)	CMI _s (µg/mL) ^b		
		AMB ^c	FLZ ^d	NIST ^e
<i>Candida famata</i>	7085	0,12	4,00	0,06
<i>C. albicans</i>	7086	1,00	1,00	0,12
<i>C. parapsilosis</i>	7087	1,00	1,00	0,12
<i>C. albicans</i>	7088	0,50	1,00	0,12
<i>C. albicans</i>	7089	0,50	0,50	0,12
<i>C. tropicalis</i>	7090	1,00	2,00	0,06
<i>C. tropicalis</i>	7091	1,00	2,00	0,06
<i>C. tropicalis</i>	7092	1,00	0,50	0,06
<i>C. albicans</i>	7098	0,25	1,00	0,06
<i>C. lusitaniae</i>	7093	0,50	0,50	0,06
<i>C. albicans</i>	7094	0,50	64,00	0,06
<i>C. albicans</i>	7095	0,50	64,00	0,06
<i>C. famata</i>	7096	0,50	4,00	0,06
<i>C. albicans</i>	7097	0,50	64,00	0,12
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC	0,025	2,00	0,06

^aURM Culture Collection/Federal University of Pernambuco/Brazil

^bO valor da CMI foi definido como a concentração mais baixa do agente antifúngico e foi lido após dois dias a 37 ° C.

^cAMB = Anfotericina B

^dFLZ = Fluconazole

^eNIST = Nistatina

Artigo 3 a ser submetido à revista Journal of Ethnopharmacology

ISSN: 0378-8741

Fator de Impacto:2.76

Qualis B1

Antifungal activity of protein from *Indigofera suffruticosa* Mill against *Candida* species

Nascimento, W.M.^a; Pereira, D.R.^a; Santos, A.T.B.^a; Lima-Neto, R.G.^a;
Andrade, S.L.^{a, b}; Neves, R.P.^a; Lima, V.L.M.^a

^a Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

^b University of Amazonas Stats (UEA), Brazil.

Correspondence to: Dra Vera Lúcia de Menezes Lima, Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências da saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

e-mail: vlml@ufpe.br

ABSTRACT

Indigofera suffruticosa is a plant used in alternative medicine for treatment of various diseases. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of *I. suffruticosa* extract and protein from the leaves on *Candida* species. *I. suffruticosa* aqueous extract was obtained by homogenization of the dried leaf powder (100 g), followed by filtering and lyophilizing. Aliquots (1mg/mL in 0.15M NaCl) were submitted to affinity chromatography utilizing a polysaccharide chitin for isolate protein compounds, which were quantified by the Lowry method and analyzed by phytochemistry tests. The antifungal activity was evaluated by susceptibility testing for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) utilizing the yeast strains *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis*. One gram of *I. suffruticosa* leaf powder yielded 1.2 mg of protein, obtained from the chitin column, while the phytochemical analysis revealed total absence of secondary metabolites. The protein from *I. suffruticosa* showed fungistatic activity against the *Candida* species tested. This protein inhibited the growth of *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, with MICs of 64, 32, 8 and 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. These results shed more light on the biological potential of this natural product against harmful microorganisms.

Keywords: *Candida*. Plant protein. *Indigofera suffruticosa*. Candidiasis. Antifungal activity.

1 INTRODUÇÃO

Fungi of the *Candida* genus are pathogens responsible for infections in the oral and vaginal cavities, tracheal mucosa, bronchi and gastrointestinal tract, causing a wide spectrum of surface and invasive opportunistic diseases (Alonso-Echanove *et al.*, 2003). Epidemiologic studies have identified *Candida* species as the fourth most common cause of nosocomial bloodstream infection (Bar *et al.*, 2006) and opportunistic infections (Nucci *et al.*, 2010).

Research into new antifungal substances has been performed for possible synthesis of new drugs and development of phytotherapeutic products with greater efficacy and/or reduced side effects (Leite *et al.*, 2006; Sardi *et al.*, 2013). Natural products can be good alternatives for the treatment of diseases, and their use has grown substantially in recent decades (Carvalho *et al.*, 2008). Many compounds have been isolated from plant extracts to identify the bioactive compounds responsible for the biological activity. Some proteins isolated from plant aqueous extracts have been shown to possess antimicrobial (Nair *et al.*, 2013), antineoplastic (Yan *et al.* 2009) and anti-inflammatory activity (Araújo *et al.*, 2011). Antifungal activity was observed in seed protein *Archidendron jiringa* (Charungchitrak *et al.*, 2011) and in rhizomes of *Curcuma longa* (Pentnual *et al.*, 2010).

Indigofera suffruticosa Mill, a legume plant from the family Fabaceae, subfamily Papilionoideae, is native to West India (Almeida, 1993), with current distribution in tropical and subtropical areas of North, Central and South America as well. In Brazil it is mainly found the northeastern region (Ribeiro *et al.*, 1991). *I. suffruticosa* is noted for its biological properties and use in folk medicine. Infusions and decoctions of different parts of the plant are used in folk medicine as febrifuge, purgative and sedative (Hastings, 1990). Previous studies with *I. suffruticosa* leaves have demonstrated embryotoxic (Leite *et al.*, 2004) and antimicrobial (Leite *et al.*, 2006) effects of aqueous extracts.

To the best of our knowledge, no investigation of the effect of proteins isolated from *I. suffruticosa* leaves against *Candida* fungi has been carried out. Thus, the aim of this study was to evaluate whether proteins isolated from *I. suffruticosa* leaves are able to inhibit the growth of some *Candida* species.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Indigofera suffruticosa*

Fresh leaves of *I. suffruticosa* were collected in the morning in the municipality of São Caetano, Pernambuco state, in the semi-arid region of northeastern Brazil. The plant was identified by Dr. Marlene Carvalho Alencar Barbosa from the Department of Botany, Federal University of Pernambuco (UFPE). A voucher specimen was deposited with the UFP Geraldo Mariz Herbarium of the Department of Botany, UFPE, where it was authenticated and registered under number 45,217.

2.2 Extract preparation

Leaves of *I. suffruticosa* were briefly washed with distilled water and left to dry at 38 °C. The dried leaves were then ground and the resulting powder was homogenized in water (10%) under stirring for 16 h. The water-based suspension was then passed through filter paper and lyophilized.

2.3 Protein obtainment from *I. suffruticosa*

The lyophilized extract was dissolved (10%) in 0.15 M NaCl and applied in a chitin column (Sigma, USA, 20×7cm) previously equilibrated at 20 mL.h⁻¹ flow rate with 0.15 M NaCl. Protein elution was monitored by absorbance at 280 nm (BIO-RAD SMART-SPEC). Unbound proteins were removed with equilibrating solution until absorbance at 280 nm was negligible. Bound proteins were eluted from the column with 2.0 M acetic acid, pH 4.0, pooled together, dialyzed against water, lyophilized and suspended in 0.15 M NaCl.

2.4 Protein assay

The protein content (mg.mL⁻¹) was determined according to Lowry *et al.* (1951) using a BSA calibration curve as the standard (0–500 µg.mL⁻¹) and the total protein (mg) was measured by the ratio between the protein concentration and the volume of the sample.

2.5 Phytochemical analysis

The isolated material (1 mg.mL^{-1} of protein) was submitted to phytochemical evaluation by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel sheets (Merck, Germany). Different systems for development and adequate visualization of secondary metabolites were used, as follows. Vanillin–hydrochloric acid for condensed tannins and indican (indigo component); Dragendorff's reagent for alkaloids; Lieberman–Burchard reagent for terpenes and steroids; anisaldehyde for saponins; Neu's reagent for gallic acid and flavonoids and UV light for coumarins (Roberts *et al.*, 1956; Harborne, 1998; Pajik *et al.*, 2002).

2.5 Strains and growth cultures

Two strains of *C. albicans*, two of *C. krusei*, one of *C. parapsilosis* and two of *C. tropicalis* were supplied by the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Biological Sciences Center, of UFPE. The strains had been stocked in mineral oil at 18°C (Sherf, 1943). Viability tests of all strains and subsequent taxonomic confirmation of their morphological, biochemical and physiological characteristics were also carried out (Barnett *et al.*, 2000).

2.6 Antifungal activity

For the susceptibility tests, we used the method reported in M27-A3 (CLSI, 2008). The culture medium used in the experiments was RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) enriched with L-glutamine and morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; 0.165 mol.L^{-1} ; Sigma-Aldrich), pH 7.0 ± 0.1 . The medium was filter-sterilized in 0.22μ membranes (Millipore, Darmstadt, Germany). Amphotericin B (AmpB) and fluconazole (FLZ) were used as reference drugs in different concentrations, ranging from 0.03 to $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.125 to $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The protein material from *I. suffruticosa* was diluted in DMSO and tested in concentrations ranging from 2 to $1,024 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Candida spp. were maintained on Sabouraud dextrose agar (SDA) medium and incubated at 35°C . Suspensions of the isolates were prepared and their densities were adjusted according to the 0.5 McFarland Turbidity Standards into 90% transmission using a UV spectrophotometer. The volume of

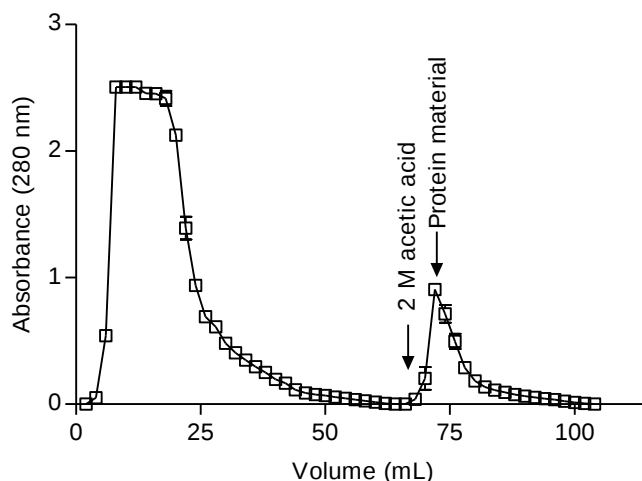
the inoculum was adjusted to 5.0 mL with sterilized saline and was further diluted in RPMI 1640 to concentrations containing $2-5 \times 10^3$ CFU.mL⁻¹.

Sterilized flat-bottomed 96-well microtitre plates (TPP; Trasadingen, Switzerland) were used in the susceptibility tests. The inoculum was added to the wells with the test drugs. The plates were incubated at 25 °C for two days before reading the results. MIC (minimum inhibitory concentration) values for protein material, AmpB and FZL were determined for 100% and $\geq 50\%$ of fungal growth inhibition in relation to fungal growth in control groups. Minimal fungicide concentration (MFC) of protein material was determined by transferring the contents of the wells that showed 100% growth inhibition into Petri dishes containing SDA. The dishes were then incubated at 35 °C for 3 days to determine fungal viability. MFC was confirmed by observing the absence of fungal growth. Each experiment was performed in duplicate.

3 RESULTS AND DISCUSSION

In the aqueous extract *I. suffruticosa* leaves (23 mg.mL⁻¹) submitted to affinity chromatography in the chitin column, the bound fractions eluted with acetic acid revealed one peak (Figure 1), which was a protein material (0.28 mg). In this separation process, each gram of leaf powder yielded 1.2 mg of protein.

Figure 1. Chitin affinity chromatography of protein material from aqueous extract of *I. suffruticosa*. Unbound fraction washed with 0.15 M NaCl. Single peak the bound fraction eluted with 2.0 M acetic acid.



The phytochemical evaluation of the isolated protein using TLC sheets in the different development systems revealed total absence of secondary metabolites such as alkaloids, condensed tannins, coumarins, flavonoids, gallic acid, indican, terpenoids, steroids and saponins.

For each *in vitro* susceptibility test, the inoculum controls showed clearly detectable growth after the incubation period, indicating that all isolates were viable and that the conditions used were suitable for fungal growth. In addition, the MICs of the reference strain were 0.5 and 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to AmpB and fluconazole, respectively, confirming the test reproducibility.

All *Candida* strains isolated and tested in this work had been preserved under mineral oil in the URM Culture Collection-UFPE. The antifungal results (MIC values) are summarized in Table 1. All isolates evaluated presented MICs for pure extract, which showed moderate antifungal activity against *Candida* isolates ranging from 16 to 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. However, the same isolates studied presented MICs from 8 to 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ to the isolated protein, lower concentrations than the extract (Table 1). Furthermore, one strain of *C. parapsilosis* and another of *C. tropicalis* displayed considerable sensitivity to the protein with MIC of 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, lower than fluconazole, which showed MIC

values of 16 and 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. Table 1 also shows a fluconazole-resistant *C. tropicalis* strain, which presented MIC of 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against the leaf protein.

Table 1. Antifungal activity of *Indigofera suffruticosa* extract, *Indigofera suffruticosa* protein, Amphotericin B and fluconazole against eight *Candida* clinical strains from the URM Culture Collection.

Species	Accession no. (URM ^a)	MICs ($\mu\text{g/mL}$) ^b			
		Extrac t	IP ^c	AmpB ^d	FLZ ^e
<i>C. albicans</i>	4990	128	128	0.25	>64
<i>C. albicans</i>	3719	512	64	2	64
<i>C. krusei</i>	4802	512	64	2	64
<i>C. krusei</i>	1059	512	16	0.12	16
<i>C. parapsilosis</i>	4608	16	8	1	16
<i>C. parapsilosis</i> ^e	ATCC22019			0.5	8
<i>C. tropicalis</i>	4790	16	8	1	32
<i>C. tropicalis</i>	1150	512	32	0.25	>64

^a URM Culture Collection, Federal University of Pernambuco, Brazil

^b The MIC value was defined as the lowest concentration of the antifungal agent and was read after two days at 37 °C. The inocula contained approximately 2.5×10^3 cells/mL. Culture medium, tested was RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO). The final concentration of IP was between 2-1,024 $\mu\text{g/mL}$, 0.03-16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for amphotericin B and 0.125-64 $\mu\text{g/mL}$ for fluconazole.

^c IP = Isolated protein

^d AmpB = Amphotericin B

^e FLZ = Fluconazole

Candida parapsilosis ATCC 22019 was used as the reference strain.

Plants that are traditionally used in the treatment of fungal infections or related ailments can be a good source for new, safe, biodegradable and renewable antifungal drugs. This is an important possibility for Brazil, which has huge biodiversity and where medicinal plants have been used for centuries.

According to Peumans and Van Damme (1995), proteins help plants to defend against microorganisms through indirect mechanisms that are based on the interaction of carbohydrates or glycans with the extracellular cell wall. This activity can be related to the protein-carbohydrate binding property, which can

occur from the effect of certain carbohydrate components in the fungal cell wall on cell activity and viability (Damico *et al.*, 2003). Since the major component of the fungal wall is chitin (N-acetylglucosamine polymer) (Ye *et al.*, 2001), the chitin-binding proteins have been shown to affect fungal growth and development (Sá *et al.*, 2009; Trindade *et al.*, 2006), by disturbing the synthesis and/or depositing chitin in cell walls (Selitrennikoff, 2001).

Our result for *I. suffruticosa* leaf protein on *C. albicans* (MIC = 64 µg.mL⁻¹) was similar to that of a protein obtained from seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen, an Asian legume plant from the family Fabaceae, against *C. albicans* (MIC = 56 µg.mL⁻¹) (Charungchitrak *et al.*, 2011). Furthermore, the MIC values of *I. suffruticosa* leaf protein against *Candida tropicalis* growth (8 µg.mL⁻¹) was one fourth lower than that reported by Mandal *et al.* (2011) when using a peptide obtained from *Trapa natans* fruits against the same fungal specie (MIC of 32 µg.mL⁻¹). Some plant proteins have also demonstrated activity against *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, but other fungi were resistant to the proteins tested (Gomes *et al.*, 2012; Pan *et al.*, 2010).

C. albicans is the most common cause of oral candidiasis, an opportunistic infection, but *C. tropicalis* is the second most pathogenic of the *Candida* species, and has emerged as a clinically important pathogen, especially in deep fungal infections (Dar-Odeh *et al.*, 2001; Zaug *et al.*, 2001). Infections by *C. krusei* are rare but it is recognized as a species resistant to a wide range of antifungal drugs (Barbedo and Scarbi, 2010).

The conventional treatment for this systemic mycosis has limitations due to the high cost of the necessary drugs, as well as the poor efficiency and high toxicity of these drugs (Onishi *et al.*, 2000).

The results of this study demonstrated that a plant protein has fungistatic activity against different *Candida* species, and can be important to reduce opportunistic invasive mycoses as well to avoid the use of synthetic drugs that can have harmful side effects.

AGRADECIMENTOS

The authors thank Prof. Haroudo Sátiro Xavier from the Department of Pharmacy of UFPE for his technical support on the phytochemical analysis.

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Research (CNPq), Pernambuco State Research Foundation (FACEPE) and Office to Improve University Personnel (CAPES) of the Ministry of Education.

REFERÊNCIAS

- Almeida E. R. (1993) PLANTAS MEDICINAIS:conhecimentos populares e científicos 1º ed. Editora Hemus. São Paulo – SP 342 p.
- Alonso-Echanove, J., Edwards, J. R., Richards, M. J., Brennan, P., Venezia, R. A., Keen, J. and Gaynes, R. P. (2003). *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 24: 916-925.
- Araújo, R. M. S.; et al.,. (2011). Lectin from *Crataeva tapia* bark exerts antitumor, anti-inflammtory and analgesic activities. *Natural Products and Bioprospecting*, 1 (2): 97-100.
- Bar, K., et al., (2006) *BMC Infect Dis.* 6,145.
- Barbedo, L. S.; Sgarbi, D. B. G. (2010). Candidíase DST *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*, v. 22, n. 1, p. 22-38.
- Barnett, J. A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. (2000). Yeast: characteristics and identification 3 edição, Cambridge: University press.
- Carvalho, A. C. B.; Balbino, E. E. ; Maciel, A; Perfeito, J. P. S. (2008). Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognósia*, v.18, p.314-319.
- Charungchitrak, Sarinya et al. (2011). Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. *Food chemistry*, v. 126, n. 3, p. 1025-1032.
- Damico, D. C. S., Freire, M. G.M., Gomes, V. M., Toyama, M. H., Marangoni, S., Novello, J. C., Macedo, M. L. R. (2003). Isolation and Characterization of a Lectin from *Annona muricata* Seeds. *J. Protein Chem.* 22, 655–661.
- Dar-Odeh, N. S. & Shehabi A. A. (2003). Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*.v.46, p.187–191.
- Gomes, F. S. et al., (2012). Antimicrobial lectin from *Schinus terebinthifolius* leaf. *Journal of Applied Microbiology*, v. 114, n. 3, p. 672-679,

- Hamza O. J.M; et al., (2006). Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Journal of Ethnopharmacology* 108 124–132
- Harborne, J. B. (1998). Phytochemical methods A Guide to modern techniques of plant analysis. *Phytochemical Methods, Chapman & Hall, London, UK*, 3rd edition.
- Hastings, R. B. (1990). Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, part one. *Economic Botany*, v. 44, n. 3, p. 336-348.
- Leite, S. P., et al., (2006). Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*. v.3(2), p.261-265.
- Leite S.P, et al., (2006). Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. *Evid.- Based Complement Alternat Med* 3(2) 261-265.
- Leite, S. P.; et al., (2004). Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. *Reproductive Toxicology*, v.18, p.701-705.
- Lowry, O. H. et al. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-75.
- Mandal, S. M., Migliolob, L., Francob, O. L. & Ghosha, A. K. (2011). Identification of an antifungal peptide from *Trapa natans* fruits with inhibitory effects on *Candida tropicalis* biofilm formation. *Peptides*. v. 32(8), p.2-7
- Nair, S. S.; Madembil, N. C.; Nair, P.; Raman, S.; Veerabadrappa, S. B. (2013). Comparative analysis of the antibacterial activity of some phytolectins. *International Current Pharmaceutical Journal*, v. 2, n. 2, p. 18-22.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobón, A. M., Restrepo, A. and Colombo, A. L. (2010). Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.* 51, 561-570.
- Onishi, J., Meinz, M., Thompson, J., Curotto, J., Dreikorn, S., Rosenbach, M., Douglas, C. (2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v.44, p.368–377.
- Pajic, I., et al.,. (2002). A novel lectin from the sponge *Haliclona crater* : isolation, characterization and biological activity. *Comp Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* v.132, p.213–21.

- Pan, S., Tang, J. and Gu, X. (2010). Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. *Vet. Immunol. Immunop.* v.133, p.154-164.
- Petnual, Pariyaphon; Sangvanich, Polkit; Karnchanatat, Aphichart (2010). A lectin from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* L.) and its antifungal, antibacterial, and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Science and Biotechnology*, v. 19, n. 4, p. 907-916.
- Peumans, W. J.; Van Damme, E. J. M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352.
- Ribeiro, L. R.; Batista, A .R. P. L.; Silva, A .R.; Sales, L. A .; Salvadori, D. M. F.; Maia, P. C. (1991). Toxicological and toxicogenetic effects of plants used in popular medicine and in cattle food. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p.89-91.
- Roberts, E.A.H.; Cartwright, R.A.; Wood D.J. (1956). "The flavonols of tea." *J. Sci. Food Agric.* v.7, p.637-646.
- Sá, R. A. T.H. et al., (2009). Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. *Wood Science Technology*. v. 43, p. 85–95.
- Santi-Gadelha, T. A.; Gadelha, C. A.; Aragão, K. S.; De Oliveira, C.; Lima Mota, M. R.; Gomes, R. C.; Cavada, B. S (2006). Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 350, n. 4, p. 1050-1055.
- Sardi, C. O.; Scorzoni, L.; Bernardi, T.; Fusco-Almeida, A. M.; Mendes Giannini M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* 62, p.10–24.
- Selitrennikoff, C. P. (2001). Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2883–2894.
- Trindade, M. B., et al., (2006). Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, v. 1764, n. 1, p. 146-152.
- Yan, Q.; et al.,. (2009). Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongholicus*. *Phytomedicine*. v. 16, n. 6, p. 586-593.

- Ye, X. Y., Ng, T. B., Tsang, P. W. K., and Wang, J. (2001). Isolation of a Homodimeric Lectin with Antifungal and Antiviral Activities from Red Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seeds J. Protein Chem. 20, 367–375.
- Zaugg, C., Zepelin, M. B., Reichard, U., Sanglard, D. and Monod, M. (2001). *Infect Immun*.v.69, p 405–12.

Artigo 4 a ser submetido à revista Química Nova

ISSN: 0100-4042

Qualis: B4

Produção de nitrosamina por espécies de *Candida* na promoção do câncer bucal: Um estudo de revisão

Andrade, S. L.^{1,2}; Couto, F.M.¹; Macêdo D.P.C¹; Neves, R. P. ¹; Lima, V. L. M^{*1}

¹ Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

² Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Brasil.

Correspondência para*: Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, Laboratório de Química e Metabolismo de Lipídeos e Lipoproteínas do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências da saúde (CCS), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

e-mail: vlml@ufpe.br

Abstract

Nitrosamines are compounds formed from a reaction of amines with nitrosating agents and have high carcinogenic potential. Although oral cancer is multifactorial disease, a major predisposing factors is the synergistic use of alcohol and tobacco. However, not everyone who has these habits develop oral cancer and many who consume alcohol and tobacco for decades have not developed oral cancer. Other factors associated with hygiene and microorganisms are pointed out in many studies, especially regarding the possible ability of *Candida* species to enhance carcinogenesis due to nitrosation endogenously produced. This research aims to review and summarize studies reported in the literature as associated with the production and nitrosation produced by *Candida* species in oral carcinogenesis promoting factors.

Keywords: nitrosamine. oral carcinogenesis. Fungal infections.

Métodos de pesquisa na literatura e critérios de seleção

Pesquisas sistemáticas foram realizadas em databases como Medline, Pubmed e Scopus Search. Foram incluídos no estudo, artigos de idiomas Inglês e Português. As buscas foram realizadas utilizando os termos de palavras-chave: “N-nitrosamine and oral cancer”; “nitrosamine, *Candida* and oral cancer” Inicialmente rendeu um total de 1.396 artigos. Além disso, as bibliografias de trabalhos relevantes foram pesquisadas para estudos posteriores. O presente artigo está embasado em uma breve revisão de literatura e não contém análises de dados qualitativos ou quantitativos.

Nitrosaminas

As N-nitrosaminas é uma classe de variados compostos químicos descobertos a mais de 100 anos e são formados a partir de uma reação das aminas com agentes nitrosantes, as quais possuem alto potencial cancerígeno. Sua característica estrutura comum é a presença do grupo funcional N-NO incluindo nitrosaminas e nitrosamidas. As quais não são encontradas individuais e de forma isolada, mas ocorrem em misturas de várias nitrosaminas.¹

Estes compostos e seus precursores ocorrem numa vasta variedade de produtos naturais ou bens manufaturados, agrotóxicos, tabaco, detergentes, inibidores de ferrugem, artigos de borracha, solventes, medicamentos, cosméticos, plásticos, produtos de couro, têxteis e cosmetics. Porém, uma

das maiores exposições acontece através da alimentação, contudo, o processamento e preparo dos alimentos influenciam na quantidade de nitrosaminas formadas.^{2,3,4}

Exposição a estes compostos ocorre pela inalação, ingestão de nitrosaminas pré-formadas ou pela nitrosação endógena.⁵ Estas exposições podem resultar pela formação de compostos N-nitrosos em alimentos, durante a armazenagem ou a preparação ou no *in vivo*, geralmente na porção estomacal. Esta formação endógena consiste numa importante fonte destes compostos e tem sido alvo de vários estudos.³ Pesquisas observacionais com as exposições de nitrosamina são altamente complexas, devido a ocorrência simultânea de diversos fatores.⁶

De outra forma, a exposição humana da nitrosamina ocorrente através da consequência de alguns hábitos, tais como fumar e mascar tabaco. Sua produção no fumo ocorre pela reação da nicotina e outros compostos com nitrito no tabaco.¹³

Todavia, alguns estudos epidemiológicos têm indicado relação entre a ingestão de nitrosaminas e o risco de desenvolver diferentes tipos de câncer. Contudo, sabe-se que a maior exposição acontece através da alimentação e que o processamento e preparo dos alimentos influenciam na quantidade de nitrosaminas formadas.³

As nitrosaminas têm sido associadas ao desenvolvimento de câncer, especialmente, de tumores localizados no trato respiratório, no sistema digestivo, na bexiga, no cérebro e principalmente na cavidade oral de fumantes.⁶

Câncer Oral

O câncer oral é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, destacando-se pela crescente ocorrência, sendo este, o sexto tipo de câncer mais incidente no mundo. Apresenta a maior taxa de mortalidade no segmento cabeça e pescoço. É responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo.^{7,8,9,10,11,12}

Embora apresentem menor incidência, outros tipos de tumores que podem ocorrer na cavidade oral poderão ser citados, segundo INCA (2011), tais como os tumores salivares (das glândulas salivares menores e da sublingual), os sarcomas (os de origem vascular, os musculares e os ósseos) e o melanoma de mucosa.

Os sítios anatômicos que abrangem a cavidade bucal são definidos com alguns termos como câncer oral, câncer de boca e câncer bucal. Alguns trabalhos se referem à cavidade bucal excluindo lábios e glândulas salivares. Assim, vários tipos de interações entre as localizações anatômicas são abordados em estudos específicos, principalmente nos estudos epidemiológicos.^{15,8,16,17}

O carcinoma oral é tipicamente associado aos homens com idade superior a 60 anos, com hábitos regulares de tabagismo e etilismo. Recentemente pesquisas têm mostrado um aumento de câncer oral em pacientes com menos de 40 anos e em mulheres que não apresentam possíveis fatores de risco. Além disso, na última década, a disparidade de casos de câncer oral no gênero masculino tem diminuído em relação ao gênero

feminino e tem havido um notável aumento de incidência em mulheres com menos de 45 anos.^{13,14}

Dos tipos cânceres que ocorrem na boca, o tipo histológico mais frequente, referem-se ao carcinoma epidermóide com 90% a 95% dos casos, também chamado de espinocelular ou de células escamosas que decorre da proliferação desordenada do epitélio de revestimento bucal, sendo classificado como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado.^{18,8,14,17,12}

Apesar do carcinoma de células escamosas oral ser uma doença multifatorial, sua relação de consumo crônico de álcool e tabaco com o câncer bucal encontra-se estabelecida, porém, a patogênese dessa malignidade não está totalmente instituída, pois nem todas as pessoas que consomem bebidas alcoólicas desenvolvem o câncer bucal e nem todos que desenvolvem esta doença consomem o álcool.^{20,19,21,13,22,23}

O etilismo e tabagismo, apesar de serem fatores independentes, possuem ação simultânea, e potencializam o risco do câncer o que torna difícil avaliar o efeito do álcool e tabaco isoladamente.^{20,19,21,22,23} Além disso, vários autores citam esse sinergismo do álcool e tabaco como mecanismos que se referem ao aumento da permeabilidade da mucosa oral, devido à ação do álcool, que facilitaria a passagem de carcinógenos derivados do tabaco para o interior das células atuando no DNA.²¹

Contudo, álcool e tabaco não dizem respeito a todos os casos de câncer oral. O que vem despertando novas possibilidades de etiologias para o câncer vem sendo estudadas nos últimos anos, e tem havido uma crescente associação de evidências que sugerem a possível relação de micro-organismo

na cavidade bucal e o seu papel no câncer.¹³ Existem evidências consideráveis que sugerem que há uma variedade de espécies de leveduras capazes de incentivar o início, promoção ou progressão de neoplasias humanas.²¹

Infecções fúngicas por *Candida* associadas ao câncer oral

A presença de fungos em tumores é estudada desde os anos 50, quando através de técnicas citológicas observou-se a presença de esporos de fungos e outras estruturas em vários tipos de neoplasias.^{25,26,27}

A possível associação entre *Candida* e neoplasia oral foi primeiramente descrita em 1960 e estudos posteriores apresentaram a relação de carcinoma oral com a presença de outros fungos.^{27,28}

As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota e são geralmente consideradas como agentes comensais. No entanto são capazes de causar uma série de infecções oportunistas, que se refere como candidoses, as quais são especialmente importantes em pacientes imunocomprometidos, sobretudo com câncer.^{29,30}

O supercrescimento de *Candida* também foi relatado em indivíduos tabagistas. Este fato pode ser devido à indução de aumento da queratinização do epitélio, a redução de IgA salivar e diminuição da função de leucócitos polimorfonucleares.³¹

A candidíase hiperplásica crônica é uma forma de candidose caracterizada pela invasão de hifas do epitélio bucal, e estima-se desenvolver

neoplasia em até 10 % dos casos. A maioria dos pacientes com o transtorno crônico oral tem candidose desde a primeira infância.³⁷

Um caso raro de candidíase hiperplásica crônica do tipo nodular que simulava carcinoma recorrente de língua foi descrito por Shibata³² et al., (2011). Segundo a descrição do caso, o paciente foi submetido a tratamento cirúrgico de hemiglossectomia e esvaziamento radical associado a quimioterapia, tendo sido considerado curado. Ainda neste relato, os autores referem que após 15 anos surgiu uma lesão nodular de dois centímetros, sugestiva de carcinoma recorrente, a qual após a realização de uma biópsia foi diagnosticada uma micose.

Por outro lado, estudos demonstram que a associação entre os microrganismos e o câncer oral pode apresentar uma relação pela inflamação que é uma característica fundamental em muitas doenças crônicas, com destaque para câncer bucal, como no estudo de Meurman³³ (2010), o qual aponta pesquisas com malignidades gastrointestinais que demonstraram grande quantidade de citocinas e fatores de crescimento liberados pelas células durante a inflamação, que poderiam influenciar na indução do câncer.

Devido à alta incidência e associação de fungos em neoplasias de cavidade oral, alguns trabalhos expõem a necessidade de estudos relacionados ao diagnóstico de fungos presentes neste sítio acometido pelo câncer e a ação promotora de neoplasias destes micro-organismos.^{34,35}

No entanto, Mccullough²⁸ et al. (2002) reforçam o papel das leveduras no desenvolvimento das neoplasias com análises de 223 biópsias de lesões orais variadas os quais 44,6% dos casos foram diagnosticados de displasias com presença de leveduras.

Estudos como o de Spolidorio³⁶ e colaboradores, (2003) avaliaram que várias espécies de *Candida* podem causar lesões bucais secundariamente a líquen plano, leucoplasia e principalmente carcinoma. Segundo estes autores, a presença de *Candida* em carcinomas é interpretada como colonização secundária da mucosa previamente alterada. Alterações epiteliais da fase oral mucosa, tais como trauma, maceração, atrofia, hiperplasia e displasia, podem comprometer a barreira mucosa e predispor a infecção por *Candida*. Essa invasão tem sido sugerida como um fator de risco significativo na transformação maligna de leucoplasia oral.

Em histopatológico com ácido peróxido de Schiff, Wu³⁷ et al., (2013) puderam visualizar hifas de *Candida* invadindo a superfície do epitélio perpendicularmente, além de estabelecer associação com as coleções de leucócitos polimorfonucleares na formação de microabscessos, quando avaliaram 396 pacientes com leucoplasia oral, e destes 59 pacientes apresentaram a leucoplasia por *Candida*.

Estudos com 832 biópsias mostraram a frequência de infecção por *Candida* em lesões malignas bucais, de diversos graus de displasias. Os dados permitiram confirmar a prevalência dessa levedura, sendo constatado ao histopatológico leucoplasias com hiperqueratose, justificando assim a constante presença de *Candida* aumenta a severidade das displasias.³⁶

Diversos autores afirmam que existe uma forte associação entre a infecção por *Candida* e a hiperplasia inflamatória. Essa associação algumas vezes pode ser considerada a etiologia da lesão; todavia a infecção por *Candida* não só causa hiperplasia epitelial, mas também pode induzir atipia epitelial conduzindo à alteração maligna diante de sua capacidade de

nitrosação endógena para formar nitrosaminas a partir dos seus precursores.^{38,39,31}

Produção de nitrosamina por *Candida*

O papel exato de *Candida* na transformação maligna ainda é incerto. Porém, algumas espécies de *Candida* apresentam maior potencial de nitrosação endógena formando compostos de nitrosaminas, podendo diretamente ou junto a outras substâncias cancerígenas, atuar na proto-oncogene específica e iniciar o desenvolvimento de lesão maligna.^{13,40,31}

Vários autores confirmam a escassez de pesquisas sobre o papel dos fungos em tumores malignos. Contudo, a participação destes micro-organismos em mecanismos que expliquem a associação de *Candida* com o câncer é comprovada cientificamente por poucos autores, quando sugerem que a capacidade catalítica desta levedura na produção endógena de nitrosaminas, pode explicar desta forma a promoção da malignidade.^{41,34,42,43}

Krogh e Holmstrup⁴¹ (1987) publicaram um estudo com o isolamento de 21 leveduras presentes em lesões pré-cancerosas e verificaram a capacidade dessas culturas na produção de nitrosamina, onde tal produção foi elevada em cinco culturas de *Candida albicans* e com valores mais baixos nas espécies de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Torulopsis glabrata*. Os autores confirmaram o papel causal de *Candida* como promotora de malignidade quando verificaram que as maiores produtoras de nitrosamina foram isoladas de lesões pré-cancerosas mais avançadas.

De acordo com Krogh (1990) as leveduras são mencionadas como organismos nitrosantes, capazes de promover a neoplasia oral. Assim como, várias bactérias e espécies de *Candida* na boca convertem o etanol em acetaldeído cancerígeno, explicando assim a relação entre o consumo excessivo de álcool, tabagismo e a contribuição dos micro-organismos no desenvolvimento de câncer.³³

Enquanto O'Grady e Read³⁴, (1992) avaliaram a capacidade de *C. albicans* como promotora do desenvolvimento de carcinoma escamocelular da cavidade oral, através de um modelo experimental. Utilizando várias combinações da solução cancerígena 4QNO (4-nitroquinoline-1-oxide) foi possível observar a prevalência da indução do carcinoma oral quando combinaram 4QNO com *C. albicans*.

Neste sentido, Mccullough²⁸ e colaboradores descreveram em 2002 a observação feita por outros autores, quanto à atividade cancerígena de extratos obtidos a partir de *C. parapsilosis*, *Microsporum* sp., *Trichophyton* sp., *Epidermophyton* sp. e *Scopulariopsis* sp.

De acordo com Johnson¹⁰ (2001) permanece incerto a relação de *Candida* com lesões orais potencialmente malignas, sendo espécies deste gênero agentes secundário ou causador da lesão do câncer. No entanto, é sabido que existe um mecanismo que estes organismos possuem as enzimas necessárias promover a nitrosação de dieta substrates.

Spolidorio³⁶ et al., (2003) avaliaram que várias espécies de *Candida* podem causar lesões bucais secundariamente a líquen plano, leucoplasia e principalmente carcinoma. Segundo estes autores, a presença de *Candida* em carcinomas é interpretada como colonização secundária da mucosa

previamente alterada. Alterações epiteliais da fase oral mucosa, tais como trauma, maceração, atrofia, hiperplasia e displasia, podem comprometer a barreira mucosa e predispor a infecção por *Candida*. Essa invasão tem sido sugerida como um fator de risco significativo na transformação maligna de leucoplasia oral. Em histopatológico com ácido peróxido de Schiff, Wu³⁷ et al. (2013) puderam visualizar hifas de *Candida* invadindo a superfície do epitélio perpendicularmente, além de estabelecer associação com as coleções de leucócitos polimorfonucleares na formação de micro-abscessos.

Estudo como o de Meurman³³ (2010), avança a coparticipação de microrganismos na carcinogênese, e citam a carga polimicrobiana causada por biofilmes na cavidade oral, que podem também possuir interações mutagênicas com a saliva, agindo como cofatores na carcinogênese.

Na pesquisa de Saigal⁴⁰ et al., (2011) foi estudada a associação de *Candida* com várias lesões potencialmente malignas e malignas avaliado como um agente causador de neoplasias. Os autores afirmam que a presença de espécies de *Candida* possam está envolvidos na carcinogênese, produzindo compostos de nitrosaminas atuando diretamente sobre a mucosa oral ou interagindo com outros carcinógenos químicos para ativar proto-oncogenes específicos e assim iniciar neoplasia orais

Sanjaya³¹ e colaboradores (2011) mencionam que provas indicam o papel para as espécies de *Candida* na carcinogênese oral, baseado no fato de que certas espécies têm maior potencial de nitrosação elaborando assim compostos de nitrosaminas que desempenham um papel na iniciação da carcinogênese.

Sanjaya³¹ et al., (2011), apresentaram um estudo baseado na hipótese da atuação de *Candida* spp. na promoção de lesões pre-malignas e malignas da cavidade oral. Os autores versaram acerca da capacidade de *C. albicans* na nitroação para formar nitrosaminas a partir dos seus precursores. Estas nitrosaminas agem no epitélio normal, levando ao desenvolvimento de displasia e de carcinoma oral, sugerindo, o papel promotor de espécies de *Candida*. Contudo, os autores esclarecem que a ação carcinogênica ocorre concomitante a outros fatores tais como violação da integridade epitelial e uso de tabaco, e concluem que a capacidade de produzir neoplasia diretamente, sem a ação de outros fatores de risco ainda não está esclarecida.

Delsing⁴³ e colaboradores (2012) em um de seus casos publicados relataram um paciente idoso com candidíase esofágica recorrente por 12 anos, após diversos tratamentos com antifúngicos sem sucesso. Neste caso, após o surgimento de linfonodos cervicais, foi diagnosticado carcinoma de células escamosas associado à infecção por levedura do gênero *Candida*. Estes autores afirmam que a infecção em longo prazo do epitélio esofágico por levedura e subsequente prolongada exposição à nitrosaminas, podem explicar o desenvolvimento do carcinoma, uma vez que o paciente não apresentava fatores de risco evidentes ao câncer como tabagismo, alcoolismo e predisposição genética.⁴³

Diversos autores afirmam que existe uma forte associação entre a infecção por *Candida* e a hiperplasia inflamatória. Essa associação algumas vezes pode ser considerada a etiologia da lesão; todavia a infecção por *Candida* não só causa hiperplasia epitelial, mas também pode induzir atipia epitelial conduzindo à alteração maligna.^{38,39}

CONCLUSÃO

Estudos que relacionam a presença de *Candida* em lesões pré-malignas como leucoplasias, displasias severas e hiperplasias sugerem capacidade carcinogênica destas leveduras. Mesmo com as limitadas pesquisas existentes a cerca da atuação de *Candida* no câncer oral, a literatura sugere que essa associação é uma importante condição que leva ao potencial maligno desses fungos, mesmo não sendo ainda tão definida.

Condições de má higienização oral, e o descaso no controle das infecções por *Candida* aumentam riscos de desenvolvimento maligno quer seja como co-adjuvante aos diversos fatores predisponentes ao câncer bucal, ou até mesmo, a duvidosa atuação protagonista destas leveduras.

Referências

1. Sanches-Filho, P.J.; Caramão, E.B.; Zanin, K.D.; Garcia, R.C.; Rios, A.; Valcárcel, M. Pré-concentração de nitrosaminas a partir de amostras aquosas por extração em fase sólida e cromatografia capilar eletrocínética micelar. *Química Nova*. **2003**, 26, 193.
2. Alaburda, J.; Nishihara, L. Presença de compostos nitrogênio em água de poços. *Revista de Saúde Pública*. **1998**, 32, 531.
3. Dutra, C. B.; Rath, S.; Reyes, F. G. R. Nitrosaminas Voláteis Em Alimentos. *Alim. Nutr.*, Araraquara. **2007**, 8, 111.
4. Giri, D; Agarwal, N; Sinha, A. *Candida Associated Oral Cancer*. Rujods, Ranchi University. **2013**, 2.

5. Oliveira, M. J. ; Araújo, W. M.C.; Borgo, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguças do tipo frescal. *Ciências Tecnologia e Alimento*. **2005**, 25, 736.
6. Pereira, A. M. Dissertação de mestrado. Estudo AB-INITIO e DFT das nitrosaminas. João Pessoa, Brasil, **2008**.
7. Guerra, E. N. S. et al. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermoide de boca: correlação com sistema TNM e localização. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **2005**, 51, 31.
8. Silvestre, J. A. O.; Jeronymo, D. V. Z. Câncer Bucal e sua Correlação com Tabagismo e Alcoolismo. *Revista Eletrônica Lato Sensu*. **2007**.
9. Schwartz, S.; Patrick, D. L.; Bevan Yueh, B. Quality-of-Life Outcomes in the Evaluation of Head and Neck Cancer Treatments. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. **2001**, 127, 673-678.
10. Johnson, N. W; Jayasekara, P.; Amarashing, A.A. Squamous cell carcinomas and precursors lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology . *Periodontology 2000*. **2011**, 57, 19.
11. Jemal, Advn,; Freddie Bray, ; Melissa M. Center,; Jacques Ferlay,; Elizabeth Ward,; David Forman. Global Cancer Statistics. *CA CANCER J CLIN*, **2011**, 69.
12. Gallè F., Giuseppe Colella, Valeria Di Onofrio, Raffaele Rossiello, Italo Francesco Angelillo, Giorgio Liguori. *Candida* spp. in oral câncer and oral precancerous lesions. *New Microbiologica*. **2013**, 36, 283.
13. Hooper, S J, Wilson J M, Crean J. Exploring The Link Between Microorganisms And Oral Cancer: A Systematic Review Of The Literature. *Head & Neck*. **2009**, 1228.
14. Baykul T, Yilmaz Hh, Aydin Ü, Aydin Ma, Aksoy Mç And D Yildirim. Early Diagnosis Of Oral Cancer. *The Journal of International Medical Research* **2010**, 38, 749.

- 15.Oliveira, L. R. et al.. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. J Bras Patol Med Lab **2006**, 42, 385.
- 16.Gronberg, M. S.; Glick, M. Medicina Oral de Burket: diagnóstico e tratamento. Editora Santos (grupo gen), capt. 8 - Câncer Bucal. **2008**, 194.
- 17.Longo, J.P.F.; Lozzi, S.P.; Azevedo, R. B. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. Revista Gaúcha Odontologia, **2011**, 59, 51.
- 18.Goloni-Bertollo, E. M.; Biselli, J. M; Corrêa, L. C.L; Maníglia, J. V; Rossit, A. R.B; Ruiz, M. T; Pavarino-Bertelli, C. Avaliação da Influência da Nulidade dos Genótipos Gsst1 e Gstm1 na Carcinogênese em Cabeça e Pescoço. Rev Assoc Med Bras, **2006**, 52, 365.
- 19.Instituto Nacional De Câncer – INCA,. A situação do câncer no Brasil, Rio de Janeiro, Ministério da saúde. **2011**.
- 20.Tincani, a. J., et al. A importância da endoscopia digestiva alta com solução de lugol no diagnóstico de câncer superficial e displasia em esôfago de doentes com neoplasias de cabeça e pescoço. Revista do Arq Gastroenterol. **2000**, 37, 107.
- 21.Gigliotti, M.P., Tolentino, E.S., Tomita, N. E., Chinellato, L. E. M. Main alcohol performance mechanisms in the oral cancer development. Odontologia. Clín.-Científ. **2008**, 7, 107.
- 22.Reidy, J; Mchugh, E; Stassen, L.F.A. A review of the relationship between alcohol and oral câncer. The Surgeon, Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland. **2011**, 9, 278.
- 23.Tanaka, T.; Tanaka, M.; Tanaka, T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. Pathology Research International, Article ID 431246, **2011**, 10.

- 24.Loureiro, A. P. M.; Mascio, P. D.; Medeiros, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de dna: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quimica Nova*, **2002**, 25, 777.
- 25.Diller, I. C.; Fisher, M. Isolation of fungi from transplanted, chemically, induced and spontaneous tumors. I. General consideration. *Cancer Research*, **1950**, 10, 595.
- 26.Mescon, H.; Eiman, W.; Kligman, A. M. Fungi in Human Neoplastic Tissue. *Cancer Research*, **1951**, 24, 318.
- 27.Cawson, R. A.; Zardo, V.; Mezzari, Leukoplakia and oral cancer. *Proc Roy Soc. Med.*, **1969**, 62, 610.
- 28.Mccullough, M.; JABER, M.; BARRET A. W. Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasia. *Oral Oncology*, **2002**, 38, 391.
- 29.Avrella, D. E Goulart, L.S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. *RBAC*, **2008**, 40, 205.
- 30.Bensadoun; R.J; Patton, L.L; Lalla, R.V; Epstein, J.B. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update 201. *Support Care Cancer*. **2011**, 19, 737.
- 31.Sanjaya, P.R.; Gokul, S.; Patil, B. G.; Raju, R. Candida in oral pre-cancer and oral câncer. *Medical Hypotheses*. **2011**, 77, 1125.
- 32.Shibata, T.; Yamashita, D.; Hasegawa, S.; Saito, M.; Otsuki, N.; Hashikawa, K.; Tahara, S.; Nibu, K. Oral candidiasis mimicking tongue câncer. *Auris Nasus Larynx*. **2011**, 38, 418.
- 33.Meurman, J. H. Oral microbiota and câncer. *Journal of Oral Microbiology*. **2010**, 2, 5195.
- 34.O'grady, J. F.; Reade, P. C.; *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis*. **1992**, 13, 783.

35. Bonan, P. R. F.; et al. *Candida* colonization and species in patients submitted to head and neck radiotherapy. *Jornal Brasileiro Patologia Medica Residencial*. **2007**, 43, 407.
36. Spolidorio, D. M. P.; Et Al.. The frequency of *Candida* sp. In biopsies of oral mucosal lesions, *Pesquisa Odontológica Brasileira*. **2003**, 17, 89.
37. Wu, L.; Feng, J.; Shi, L.; Shen, X.; Liu, W.; Zhou, Z. Candidal infection in oral leukoplakia: a clinicopathologic study of 396 patients from eastern China. *Annals of Diagnostic Pathology*. **2013**, 17, 37.
38. Sitheequ, M. A. M.; Samaranayake, L. P. Chronic Hyperplastic Candidosis/Candidiasis (Candidal Leukoplakia). *Crit. Revista Oral Biologia Medica*. **2003**, 41, 253.
39. Badauy, C. M. et al. Relationship between *Candida* infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. *Oral Microbiology Immunology*. **2005**, 20, 89-92.
40. Saigal S, Bhargava A, Mehra S.K, Dakwala, F. Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesions. *Contemp. Clin. Dent*. **2011**, 2, 188..
41. Krogh, P. Hald, B.; Holmstrup, P. The role of yeast in oral câncer by means of endogenous nitrosation. *Acta de Odontologia Scand*. **1990**, 48, 85.
42. Kignel, S.; Birman, E. G.. Aspectos Fúngicos do Câncer Bucal. *Revista Brasileira de Cancerologia*. **2000**, 46, 279.
43. Delsing, C.E.; Bleeker-Rovers, C.P.; Vandeveerdonk, F.L.; Tol, J.; Vandermeer, J.W.M.; Kullberg, B.J.; Netea, M.G. Association of esophageal candidiasis and squamous cell carcinoma. *Medical Mycology Case Reports*. **2012**, 1, 5.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O sexo masculino apresenta maior predominância em pacientes com lesões malignas bucais.
- Dentre as diversas localizações anatômicas que desenvolvem os tumores de boca a língua, assoalho de bucal predominam no presente estudo.
- O tipo tumoral mais frequente nas lesões malignas bucais é o carcinoma epidermóide.
- Carcinoma escamocelular, carcinoma indiferenciado, carcinoma adenoide e fibrohistiocitoma malignos estão associados a infecções por espécies de *Candida*.
- O diagnóstico micológico é importante em pacientes com câncer oral, devido à ocorrência de infecções associadas, contribuindo para a má qualidade de vida desses pacientes.
- Micoses na cavidade oral podem apresentar característica clínica que simula o câncer.
- Espécies de *Candida* como *C. albicans*, *C. famata*, *C. tropicalis*, *C. lusitani* e *C. parapsilosis* causam infecções associadas a tumores malignos bucais.
- Espécies de *Candida* isoladas em tumores bucais apresentam perfis diversos quanto à capacidade patogênica de aderirem-se as células epiteliais, produzir protease e formar tubo germinativo.
- A maioria das leveduras isoladas de lesões malignas bucais possui forte capacidade de aderir às células epiteliais orais.
- A capacidade de produzir de proteases observada em leveduras isoladas de tumores malignos bucais, sugere um considerável fator de virulência.

- Espécies de *Candida* apresentam uma possível relação com o câncer oral, pela capacidade de produzir nitrosaminas e colaborando na promoção do câncer.
- Espécies de *Candida* isoladas de tumores bucais são sensíveis aos antifúngicos anfotericina B e nistatina.
- Isolados de *C. albicans* obtidos de tumor na cavidade oral podem apresentar resistência ao fluconazol.
- O Fluconazol pode ser uma alternativa de tratamento eficaz nos casos de infecções por espécies de *Candida* não-albicans que infectam a cavidade oral.
- A proteína semi-purificada de *Indigofera suffruticosa* apresenta atividade antifúngica mais eficaz em relação ao extrato bruto do referido vegetal.

REFERÊNCIAS

ALABURDA, J.; NISHIHARA, L. Presença de compostos nitrogênio em água de poços. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, n. 2, p. 531-537, 1998.

ALBUQUERQUE, I. L. S.; CAMARGO, T. C. Prevenção e tratamento da mucosite oral induzida por radioterapia: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n. 2, p. 195-209, 2007.

ALMEIDA, P. N. M. et al. Radioinduced oral mucositis in patients with head and neck marulignant neoplasms: Epidemiological study. **Revista Odontologia da UNESP**. v. 38, n. 4, p. 211-16, 2009.

ALMEIDA, S. R. **Micologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008. p. 108.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: Fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Revista Brasileira de Patologia Medica Laboratorial**. v. 43, n. 5, p. 319-32, 2007.

ALVES, A. R.; SILVA, M. J. P. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. **Revista Escola de Enfermagem**. v. 37, n. 4, p. 85-91, 2003.

ANTUNES, José Leopoldo Ferreira et al. Joint and independent effects of alcohol drinking and tobacco smoking on oral cancer: a large case-control study. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68132, 2013.

ARGAÑARAZ, M. M. et al. Paracoccidioidomycosis and larynx carcinoma. **Mycosis**. v. 46, p. 229-232, 2003.

ARISAWA, E. A. L. et al. Antitumor therapy: Side effects in patients undergoing chemo-and radiotherapy. **Revista biociência**. v. 11, n. 1-2. p. 55-61, 2005.

AVRELLA, D.; GOULART, L. S. Isolamento de *Candida* spp. da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 40, n. 3, p. 205-207, 2008.

BADAUY, C. M. et al. Relationship between Candida infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. **Molecular Oral Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 89-92, 2005.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast: characteristics and identification**. 3 edição, **Cambridge: University press**, 2000, 8111 p.

BENSADOUN R. J. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update. **Support Care Cancer**. v.19, p.737–744, 2011.

BENSADOUN, R. J; PATTON, L. L; LALLA, R. V; EPSTEIN, J. B. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients treated with radiation: update. **Support Care Cancer**, v. 19, p.737-744, 2011.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma revisão. **Visão Acadêmica**. v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.

BIAZEVIC, Maria Gabriela Haye et al. Tendências de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002 Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 10, p. 2105-2114, 2006.

BLANC, S. A. L.; BARUZZI, A. M.; PANNUTI, C. M. Colutórios que contêm álcool e câncer bucal - Revisão de estudos epidemiológicos. **Revista Periodontia**. v. 17, n. 3, p. 7-12, 2008.

BONAN, Paulo Rogério Ferreti et al. Aspectos clínicos, biológicos, histopatológicos e tratamentos propostos para a mucosite oral induzida por radioterapia: revisão da literatura. **Revista Brasileira Cancerologia**. v.51, n.3, p.235-242, 2005.

BONAN, Paulo Rogério Ferreti et al. Candida colonization and species in patients submitted to head and neck radiotherapy. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 407-412, 2007.

BRANDES-FILHO, C. A. P.; LOPES, F. F. Alterações morfológicas na cavidade oral decorrentes do álcool. **Revista do Hospital Universitário/UFMA**. v. 6, n. 3, p. 45-47, 2005.

BRASIL, Ministério da saúde. Instituto nacional de câncer. **Falando sobre câncer de boca**, Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL, Ministério da saúde. Instituto nacional de câncer. **A situação do câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 2006.

BRASIL, Ministério da saúde. Instituto nacional de câncer. **A situação do câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, 2011.

BRASIL, Ministério da saúde. **Manual de detecção de lesões suspeitas: câncer de boca**. Rio de Janeiro, p.1-47, 1996.

BÜRGERS, Ralf et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2307-2313, 2010.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. v. 9, n. 7, p. 327 -335, 2001.

CAMARGO, F. P. et al. Isolamento de *Candida* sp. da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço de ginecologia do município de Santo Ângelo-RS. **NewsLab**, v. 87, n. 6, p. 96-104, 2008.

CARDOSO, B. C. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis***. 2004, 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) -Universidade do Minho, Braga, Portugal, 1994.

CARDOSO, M. F. A. et al. Prevenção e controle das sequelas bucais em pacientes irradiados por tumores de cabeça e pescoço. **Radiologia Brasileira**. v. 38, p. 107-115, 2005.

CARRARD, V. C. et al. Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 49-56, 2008.

CASTRO, T. L. et al. Mecanismos de resistência da *Candida* sp Wwa antifúngicos. **Infarma**. v.18, n. 9/10, p. 30-35, 2006.

CAWSON, R. A.; ZARDO, V.; MEZZARI. O. Leukoplakia and oral cancer. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**. v. 62 p. 610-4, 1969.

CHEN, C. C. et al. *Indigofera suffruticosa* Mill extracts up-regulate the expression of the p class of glutathione S-transferase and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 in rat Clone 9 liver cells. **Food and Chemical Toxicology**. v.59, p. 610-617, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard-Second Edition: CLSI document M27-A3 (ISBN:1-56238-666-2) CLSI Pennsylvania, USA 2008.

COLLINS, C. D.; COOKINHAM, S.; SMITH, J. Management of oropharyngeal candidiasis with localized oral miconazole therapy: efficacy, safety, and patient acceptability. **Patient Preference and Adherence**. v. 5, p. 369-374, 2011.

CONCEIÇÃO, G. C. et al. 2005. Avaliação do tubo germinativo em secreção vaginal a fresco para triagem de *Candida albicans*: Um teste rápido. **NewsLab**. n.73, p. 106-112, 2005.

DAHIYA, Marta C. et al. Oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans yeast in patients receiving external beam radiotherapy for head-and-neck cancer. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 57, n. 1, p. 79-83, 2003.

DAVIES, Andrew N. et al. Oral candidosis in community-based patients with advanced cancer. **Journal of pain and symptom management**, v. 35, n. 5, p. 508-514, 2008.

DEDIVITIS, R. A. et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira Otorrinolaringologia**. v. 70, p. 35-40, 2004.

DELSING, C. E. et al. Association of esophageal candidiasis and squamous cell carcinoma. **Medical mycology case reports**, v. 1, n. 1, p. 5-8, 2012.

DIETRICH, Marion et al. A review: dietary and endogenously formed N-nitroso compounds and risk of childhood brain tumors. **Cancer Causes and Control**, v. 16, n. 6, p. 619-635, 2005.

DILLER, I. C.; FISHER, M. Isolation of fungi from transplanted, chemically, induced and spontaneous tumors. I. general consideration. **Cancer Research**. v. 10, p. 595-603, 1950.

DUTRA, C. B.; RATH, S.; REYES, F. G. R. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v. 18, n. 1, p. 111-120, 2007.

EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida* and oral candidosis: A review. **Critical Review in oral Biology and Medicine**. v. 5, p.125-157, 1994.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidosis. **Clinics in Dermatology**. v. 18, p. 553-562, 2000.

FARDIN, MARCELO et al. Fatores de risco no prognóstico do câncer da boca: estudo de 1440 casos. **Rev Bras Cir Cabeça e Pescoço**, v. 33, n. 1, p. 27-33, 2004.

FERNANDES, J. P.; BRANDÃO V. S. G.; LIMA, A. A. S. Prevalência de lesões cancerizáveis bucais em indivíduos portadores de alcoolismo. **Revista brasileira de cancerologia**. v. 54, p. 239-244, 2008.

FERNANDES, L. A.; CRIVELINI, M. M. Presença de *Candida sp* em leucoplasias da mucosa bucal. **Revista da Faculdade Odontologia de Lins**. v. 16, p. 25-32, 2004.

FERREIRA, Magda Rhayanny Assunção. **Triagem antifúngica de extratos obtidos de espécies vegetais do nordeste brasileiro**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

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

GIGLIOTTI, Mariana Pracucio et al. Main alcohol performance mechanisms in the oral cancer development. **Odontologia Clínica Científica**. v. 7, n. 2, p. 107-112, 2008.

GIRI, D; AGARWAL, N; SINHA, A. *Candida* associated oral cancer. **RUJODS, Ranchi University**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 2013.

GOLONI-BERTOLLO, E. M. et al. Avaliação da influência da nulidade dos genótipos Gstm1 e Gstm1 na carcinogênese em cabeça e pescoço. **Rev Assoc Med Bras**. v. 52, n. 5, p. 365-368, 2006.

GONDIM, F. M.; GOMES I. P; FIRMINO, F. Prevenção e tratamento da mucosite. **Oral. Rev. enferm**. v. 18, n. 1, p. 67-74, 2010.

GRONBERG, M. S.; GLICK, M. **Medicina oral de burket: diagnóstico e tratamento**. Editora Santos (grupo gen), capt. 8 - Câncer Bucal, p. 194-234, 2008.

GUERRA, E. N. S. et al. Expressão imunohistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermoide de boca: correlação com sistema TNM e localização. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, p. 31-37, 2005.

HOMANN, N. et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers na smokers: a microbiological approach to oral cavity câncer. **Carcinogenesis**. v. 21, p.663-668, 2000.

HOSNI, E. S. Eritroplasia e leucoeritroplasia oral: análise retrospectiva de 13 casos. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 75, n. 2, p. 295-9, 2009.

HUBE, Bernhard. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. **Current topics in medical mycology**, v. 7, n. 1, p. 55-69, 1996.

HUDSON, Debbie A. et al. Identification of the dialysable serum inducer of germ-tube formation in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 3041-3049, 2004.

JHAM, Bruno Correia et al. *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 103, n. 3, p. 355-358, 2007.

JHAM; B. C.; FREIRE, A. R. S. Oral complication of radiotherapy in the head and neck. **Brasilian Journal otorhinolaryngology**. v. 72, p. 704-708, 2006.

KANTARCIOGLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**. v. 45, p. 160-165, 2002.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**. v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KELNER, N.; CASTRO J. F. L. Laser de baixa intensidade no tratamento de mucosite oral induzida pela radioterapia: Relato de casos clínicos. **Revista brasileira de cancerologia**. v. 53, p. 29-33, 2007.

KEMMELMEIER, E.G.; VIDIGAL, P.G.; SVIDZINSKI, T.I.E. Increased virulence of *Candida albicans* after antineoplastic chemotherapy. **Revista Ciência Farmácia Básica Aplicada**. v. 32, n. 2, p. 257-262, 2011.

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

KLASTERSKY, J.; AOUN, M. Opportunistic infections in patients with câncer. **Annals of Oncology**. v. 15, n. 4, p. 329-335, 2004.

KRETSCHMAR, Marianne et al. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infection and immunity**, v. 67, n. 12, p. 6637-6642, 1999.

KROGH, P. HALD, B.; HOLMSTRUP, P. The role of yeast in oral câncer by means of endogenous nitrosation. **Acta de Odontologia Scand.** v. 48, p. 85-88, 1990.

KROGH, P. HALD, B.; HOLMSTRUP, P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. **Carcinogenesis**, v. 8, n. 10, p. 1543-1548, 1987.

KURAI, H. A Case of Oral Paracoccidioidomycosis suspected to be Pharyngeal Cancer. **Journal Medical Mycologia**. vol. 53, p. 49-52, 2012.

LACAZ, C. S. et al. 2002. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier.

LACHENMEIER, D. W. Salivary acetaldehyde increase due to alcohol-containing mouthwash use: A risk factor for oral câncer. **Int. J. Cancer**. v. 125, p.730-735, 2009.

LEITE, Sônia Pereira et al. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 261-265, 2006.

LIMA-NETO, Reginaldo G. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, n. 1, p. 23-29, 2011.

LÔBO, A. L. G; MARTINS, G. B. Consequências da Radioterapia na Região de Cabeça e Pescoço: Uma Revisão da Literatura. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**. v. 50, n. 4, p. 28-31, 2009.

LONGO, J. P. F.; LOZZI, S. P.; AZEVEDO, R. B. Câncer bucal e a terapia fotodinâmica como modalidade terapêutica. **Revista Gaúcha Odontologia**. v. 59, p. 51-57, 2011.

LOUREIRO, A. P. M.; MASCIO, P. D.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**. v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

LUIZ-FERREIRA et al. *Indigofera suffruticosa* Mill as new source of healing agent: involvement of prostaglandin and mucus and heat shock proteins. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p. 192-198, 2011.

MACÊDO, D. P. C.; et al. *Candida glabrata* esophagitis: New case reports and management. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, p. 279-281, 2008.

MÄKITIE, A. A.; et al. Fungal Infection of the Epiglottis Simulating a Clinical Malignancy. **Arch Otolaryngol head neck surg**. v. 129, p. 124-126, 2003.

MARTA, N. G. et al. Oral mucosal melanoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n. 1, p. 35-39, 2007.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **J Bras Pneumol**, v.32, n. 5, p. 449-460, 2006.

McCULLOUGH, M.; JABER, M.; BARRET A. W. Oral yeast carriage correlates with presence of oral epithelial dysplasy. **Oral Oncology**, v. 38, p. 391-393, 2002.

MELO, L. C. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. **Revista Gaúcha Odontologia**, v. 58, n. 3, p. 351-355, 2010.

MENESES-GARCÍA, A. et al. Paracoccidioidomycosis: Report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**. v. 94, n. 5, 2002.

MESCON, H.; EIMAN, W.; KLIGMAN, A. M. Fungi in Human Neoplastic. **Tissue. Cancer Research**. v. 24, p. 318-320, 1951.

MEURMAN, J. H. Oral microbiota and câncer. **Journal of Oral Microbiology**. v. 2, p. 5195 2010.

MOLINA, Flávio Pires et al. Própolis, sálvia, calêndula e mamona–atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida albicans*. **Brazilian Dental Science**, v. 11, n. 2, 2010.

MOYSÉS NETO, Miguel et al. Candidíase em pacientes transplantados renais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 485-491, 1997.

NAGLIK, Julian R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and infection**, v. 13, n. 12, p. 963-976, 2011.

NAGY, K. N. et al. The microflora associated with human oral carcinomas. **Oral oncology**. v.34, p. 304-308, 1998.

NAGY, K. et al. Inhibition of microflora associated with oral malignancy. **Oral oncology**, v. 36, n. 1, p. 32-36, 2000.r

NAVAS, Edna Aparecida Ferraz de Araújo et al. Avaliação da utilização de limpador de língua na redução dos níveis de leveduras na cavidade bucal. **Rev. odontol. UNESP (Online)**, v. 38, n. 2, 2009.

NIEMINEN, Mikko T. et al. Acetaldehyde production from ethanol and glucose by non-*Candida albicans* yeasts in vitro. **Oral oncology**, v. 45, n. 12, p. e245-e248, 2009.

NIIMI, M.; FIRTH, N. A.; CANON, R. D. Antifungal drug resistance of oral fungi. **Odontology**, v. 98, p. 15-25, 2010.

O'GRADY, J. F.; READE, P. C. *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. **Carcinogenesis**. v.13, p.783-786, 1992.

OLIVEIRA, E. E. et al. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**. v. 31, p. 523-527, 1998.

OLIVEIRA, Lucinei Roberto de; RIBEIRO-SILVA, Alfredo; ZUCOLOTO, Sergio. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 5, p. 385-92, 2006.

OLIVEIRA, M. J. ; ARAÚJO, W. M.C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguças do tipo frescal. **Ciências Tecnologia e Alimento**. v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

OSTERNE, Rafael Lima Verde et al. Saúde bucal em pacientes portadores de neoplasias malignas: estudo clínico-epidemiológico e análise de necessidades odontológicas de 421 pacientes. **Rev bras cancerol**, v. 54, n. 3, p. 221-6, 2008.

PANCERA, Christiane Finardi et al. Sepse grave e choque séptico em crianças com câncer: fatores preditores de óbito. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 4, p. 439-43, 2004.

PAUW, Ben de. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European organization for research and treatment of cancer/invasive fungal infections cooperative group and the national institute of allergy and infectious diseases mycoses study group (EORTC/MSG) consensus group. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 12, p. 1813-1821, 2008.

PEREIRA, A. M. Estudo AB-INITIO e DFT das nitrosaminas. João Pessoa –PB. 2008 (**Dissertação**).

PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. **Química Nova**, Vol. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PETER J. GIANNINI, P. J.; SHETTY, K. V. Diagnosis and management of oral Candidiasis. **Otolaryngol Clin N Am**. v.44, p. 231-240, 2011.

PONTES, F. S. C. et al. Carcinoma epidermóide – caso clínico. **Revista da Faculdade de Odontologia São José dos Campos**, v. 4, n.1, 2011.

QUEIROZ, João Paulo Araújo Fernandes de. et al. Criptococose-uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 2, p. 32-38, 2008.

RAMIREZ-AMADOR, Velia 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, 1997.

RAUTEMAA, R. et al. Optimal sampling site for mucosal candidosis in oral cancer patients is the labial sulcs. **Journal of medical microbiology** v. 55, p. 1447-1451, 2006.

REIDY, J; MCHUGH, E; STASSEN, L.F.A. A review of the relationship between alcohol and oral câncer. The Surgeon, Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland. v. 9, p. 278-283, 2011.

RIBEIRO, E. L. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções Nosocomiais. **NewsLab**, v. 64 , p. 106-128, 2004.

RIBEIRO, Evandro Leão et al. Ocorrência de Leveduras de *Candida* em Hemoculturas originadas de Infecções Nosocomiais. **NewsLab**, v. 60, p. 78-83, 2003.

RICICOVA, M. et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. **Microbiology**. v.156, p. 909–919, 2010.

RODRIGUES, Gustavo da Silva et al. Association between paracoccidioidomycosis and cancer. **Jornal Brasileiro De Pneumologia**, v. 36, n. 3, p. 356-362, 2010.

RÖRIG, R. C. O; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 42, n.2, p. 225-227, 2010.

RÖRIG, Kelly Cristina Ortolan; COLACITE, Jean; ABEGG, Maxwel Adriano. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 2, p. 225-7, 2009.

RUBIRA, Cássia Maria Fischer et al. Evaluation of some oral postradiotherapy sequelae in patients treated for head and neck tumors. **Brazilian oral research**, v. 21, n. 3, p. 272-277, 2007.

SAMARANAYAKE, Lakshman P.; KEUNG LEUNG, W.; JIN, Lijian. Oral mucosal fungal infections. **Periodontology** 2000, v. 49, n. 1, p. 39-59, 2009.

SAMUELS, M. A. Cytoprotection in head and neck câncer: Issues in oral care. **The Journal of Supportive Oncology**. v.2, p.09-012, 2004.

SANCHES-FILHO, P. J. et al. Pré-concentração de nitrosaminas a partir de amostras aquosas por extração em fase sólida e cromatografia capilar eletrocínética micelar. **Química Nova**. v. 26, n. 193-196, 2003.

SANCHES FILHO, Pedro José. Desenvolvimento de procedimentos para extracao e determinação de nitrosaminas em alimentos. 2002.

SANGLARD, Dominique et al. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. **Infection and immunity**, v. 65, n. 9, p. 3539-3546, 1997.

SILVA, Ivana Conceição Oliveira da; DE CARVALHO, Aline Táthila Damasceno; DA SILVA, Lucivana Bárbara Oliveira. Leucoplasia: uma revisão de literatura. **RGO**, v. 55, n. 3, p. 287-289, 2007.

SANJAYA, P. R. et al. *Candida* in oral pre-cancer and oral cancer. **Medical hypotheses**, v. 77, n. 6, p. 1125-1128, 2011.

SANTOS, G.L. et al. Tobacco and alcohol as risk factors for buccal câncer. **Revista Odontologia Clínico-Científica**. V. 9, n. 2 p. 131-133, 2010.

SANTOS, Michelle Góes et al. Risk factors in head and neck radioterapy. *Revista Gaúcha Odontol*. v. 58, n. 2, p. 191-196, 2010.

SAPOLNIK R. Suporte de terapia intensiva no paciente oncológico. **Jornal de Pediatria**. v.79, p.231-242, 2003.

SATO, Maki et al. Inhibitory effect of coated mannan against the adhesion of Candida biofilms to denture base resin. **Dental materials journal**, v. 32, n. 3, p. 355-360, 2013.

SAWADA, N. O.; DIAS, A. M.; ZAGO, M. M. F. O efeito da radioterapia sobre a qualidade de vida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de cancerologia**, v.52, p. 323-329, 2006.

SCHWARTZ, S.; PATRICK, D. L.; BEVAN YUEH, B. Quality-of-Life Outcomes in the Evaluation of Head and Neck Cancer Treatments. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 127, p. 673-678, 2001.

SENA, M. F. et al. Treatment of oral candidiasis in patients with head and neck cancer: a systematic review. **Revista da AMRIGS**, v.53, n.3, p.241-245, 2009.

SHIBATA, T. et al. Oral candidiasis mimicking tongue câncer. **Auris Nasus Larynx**. v.38, p.418–420, 2011.

SHIKANAI-YASUDA M. A. et al. Neoplasia and paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, n. 4-5, p.303-12, 2008.

SIDRIM, J. J. C. **Micologia Médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, Dorival Pedroso da et al. Radioterapia em cabeça e pescoço: efeitos colaterais agudos e crônicos bucais. **Rev. bras. patol. oral**, v. 3, n. 2, p. 62-69, 2004.

SILVESTRE, J. A. O.; JERONYMO, D. V. Z. 2007. Câncer Bucal e sua Correlação com Tabagismo e Alcoolismo. **Revista Eletrônica Lato Sensu** – Ano 2, nº1.

SIMÕES, C. A.; CASTRO, J. F. L.; CAZAL, C. *Candida* Oral como Fator Agravante da Mucosite Radioinduzida. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 57 n. 1, p. 23-29, 2011.

SITHEEQUE, M. A. M.; SAMARANAYAKE, L. P. Chronic Hyperplastic Candidosis/Candidiasis (*Candidal Leukoplakia*). **Crit. Revista Oral Biologia Medica**, v.41, p.253-267, 2003.

SOARES DE LIMA A. A., et al. Knowledge of university students about oral cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 4, p. 283-288, 2005.

SONI, N.; WAGSTAFF, A. Fungal infection. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 16, p. 231-241, 2005.

SPOLIDORIO, D. M. P. et al. Quantitative evaluation of *Strptococcus mutans* and *Candida SP* and salivary factors in the oral cavity of patients submitted to radiotherapy. *Pesquisa Odontologica Brasileira* 15: 354-358, 2011.

SPOLIDORIO, D. M. P.; et al. The frequency of *Candida sp.* In biopsies of oral mucosal lesions, **Pesquisa Odontológica Brasileira**. v. 17, p. 89-93, 2003.

TANAKA, T.; TANAKA, M.; TANAKA, T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. **Pathology Research International**. Article ID 431246, p.1-10, 2011.

THAWEBOON, Sroisiri et al. Oral colonization of *Candida* species in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. **Quintessence International**, v. 39, n. 2, 2008.

TINCANI, Alfio José et al. A importância da endoscopia digestiva alta com solução de lugol no diagnóstico de câncer superficial e displasia em esôfago de doentes com neoplasias de cabeça e pescoço. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 37, n. 2, 2000.

UETA, E. et al. Increase of *Candida* cell virulence by anticancer drugs and irradiation. **Molecular Oral Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 243-249, 2001.

VIEIRA, A. C. F.; LOPES, F. F. Mucosite oral: efeito adverso da terapia antineoplásica. **R. Ci. méd. biol.** v.5, p.268-274, 2006.

VIEIRA, Jeymesson Raphael Cardoso et al. Indigofera suffruticosa: an alternative anticancer therapy. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 4, n. 3, p. 355-359, 2007.

VOLPATO, Luiz Evaristo Ricci et al. Mucosite bucal rádio e quimioinduzida. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 73, n. 4, p. 562-8, 2007.

VUČKOVIĆ, Nada et al. Presence of Candida albicans in potentially malignant oral mucosal lesions. **Archive of Oncology**, v. 12, n. 1, p. 51-54, 2004.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and câncer, **Journal of Oral Pathology Medical** v. 37, p.157–165, 2008.

WU, Lan et al. Candidal infection in oral leukoplakia: a clinicopathologic study of 396 patients from eastern China. **Annals of diagnostic pathology**, v. 17, n. 1, p. 37-40, 2013.

ZARDO,V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp . **NewsLab**. v. 63, p.136-146, 2004.

Site:

Indigofera suffruticosa. Disponível em: www.hear.org/.../full/starr-030202-0088.jpg. Acessado em: 20/09/2013.

ANEXO I

Artigo submetido à Revista Mycopathologia

Mycopathologia

Oral paracoccidioidomycosis mimicking carcinoma: a case report

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Oral paracoccidioidomycosis mimicking carcinoma: a case report
Article Type:	Brief Report
Keywords:	Paracoccidioidomycosis; Paracoccidioides brasiliensis; dimorphic fungi; oral cancer
Corresponding Author:	Rejane Pereira Neves, Ph.D. Universidade Federal de Pernambuco Recife, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pernambuco
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Suanni Lemos Andrade, MsC.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Suanni Lemos Andrade, MsC. Ildnay Souza Lins Brandão, MsC. Paulo Bentes Carvalho Neto Nicodemos Telles Pontes-Filho, Dr. Rejane Pereira Neves, Ph.D. Danielle Patrícia Cerqueira Macedo, Ph.D. Vera Lúcia de Menezes Lima, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Paracoccidioidomycosis is a fungal infection, endemic to South American countries, which can affect the lungs, skin and mucous membranes. It commonly develops mucosal injuries of the oropharynx, pharynx and mouth, especially in regions such as hard palate, soft palate and dental alveolus, causing alveolar bone destruction, ulcerative and infiltrative lesions. These oral lesions of paracoccidioidomycosis have been, in some cases, difficult to diagnose since are simulating carcinoma. Thus we report a case of paracoccidioidomycosis mimicking oral carcinoma in a male patient attended at a Brazilian oncologic service, presenting an ulcerated and infiltrating lesion in the palate. Three biopsies were performed in four months, however with inconclusive results and only after the fourth exam the histopathological data were consistent to paracoccidioidomycosis. The diagnosis was confirmed by the double immunodiffusion technique. Amphotericin B was administrated with success. The differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and oral cancer is essential and must be always reported.
Suggested Reviewers:	Silvio Alencar Marques, PhD Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP). marques@fmb.unesp.br Expert in Paracoccidioidomycosis Oslei Paes Almeida Dental School of Piracicaba-UNICAMP oslei@fop.unicamp.br Expert in oral pathology Miguel Maymo Argañaraz, Dr. Hospital Provincial del Centenario.

	mimaar33@hotmail.com Has already published manuscripts in carcinoma and paracoccidioidomycosis areas.
	Adriano Mota Loyola, Dr. Faculdade Federal de Uberlândia adrianol@hc.ufu.br Expert in oral pathology



Dear editors of the Mycopathologia,

We are submitting the manuscript: **Oral paracoccidioidomycosis mimicking carcinoma: a case report** in order to be reviewed and published in the **Mycopathologia**. All authors are aware of the submission and this manuscript has never been published previously. This is a case report that shows an outbreak of paracoccidioidomycosis mimicking an oral cancer. The authors presented the difficulties and strategies to differentiate the clinical diagnosis and the basis for laboratorial recognition of *Paracoccidioides brasiliensis*.

Sincerely,

Phd. Rejane Pereira Neves

Msc. Suanni L. Andrade

Universidade Federal de Pernambuco

Oral paracoccidioidomycosis mimicking carcinoma: a case report

Andrade, SL^{1,2}; Brandão, ISL¹; Carvalho Neto PB³; Pontes Filho, NT¹; Neves, RP¹; Macêdo, DPC¹;
Lima, VLM¹.

¹ Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

² University of Amazonas Stats (UEA), Brazil.

³ Cancer Hospital of Pernambuco (HCP), Brazil.

* Correspondence to: Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima,

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife,
Pernambuco, Brazil, CEP: 50670-901. Phone: 81 2126.8546, Fax: 81.2126.8540

Email: vlml@ufpe.br

* Correspondence to: Dra. Rejane Pereira Neves.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, Recife,
Pernambuco, Brazil, CEP: 50670-420. Phone: 81 2126.8481, Fax: 81.2126.8480

E-mail: rejadel29@yahoo.com.br

Abstract

Paracoccidioidomycosis is a fungal infection, endemic to South American countries, which can affect the lungs, skin and mucous membranes. It commonly develops mucosal injuries of the oropharynx, pharynx and mouth, especially in regions such as hard palate, soft palate and dental alveolus, causing alveolar bone destruction, ulcerative and infiltrative lesions. These oral lesions of paracoccidioidomycosis have been, in some cases, difficult to diagnose since are simulating carcinoma. Thus we report a case of paracoccidioidomycosis mimicking oral carcinoma in a male patient attended at a Brazilian oncologic service, presenting an ulcerated and infiltrating lesion in the palate. Three biopsies were performed in four months, however with inconclusive results and only after the fourth exam the histopathological data were consistent to paracoccidioidomycosis. The diagnosis was confirmed by the double immunodiffusion technique. Amphotericin B was administrated with success. The differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and oral cancer is essential and must be always reported.

Keywords: Paracoccidioidomycosis; *Paracoccidioides brasiliensis*; dimorphic fungi; oral cancer.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep mycosis, of inflammatory characteristic, caused by the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* [1]. Since the mycelial phase, known as the infective form, is found in soil and vegetation, the main route of contamination is by inhalation, initially with no clinical symptoms. The yeast or parasitic phase occurs at 37°C by thermal conversion [2, 3].

This dimorphic fungus is found in humid tropical and subtropical regions, with higher occurrences of PCM in southeastern Mexico, Central America, and South America. Brazil accounts for over 80% of all reported cases [2, 4].

PCM mainly affects rural workers, of all ages, however is more frequently between 30-50 years old, with a predominance of males. The PCM lesions are primarily located in the lungs since the major route of infection is by inhalation, however may also occur in the gut or by skin trauma. Initially, this infection is characterized by common symptoms of several lung disease, such as cough, sputum, dyspnea, anorexia, and hemoptysis [3, 4].

The PCM presents various clinical aspects once it may spread to organs or systems, including the skin and mucosa. The clinical forms of the disease are classified into acute and subacute (juvenile type). Moreover the chronic form (adult type) occurs in 90% of individuals above 30 years old, being considered unifocal or multifocal when commits one or more bodily sites, respectively [5, 6].

The mucosal lesions comprehend the region of oropharynx, pharynx as well as oral cavity, including areas of hard palate, soft palate, dental sockets, among other locations. Commonly, it causes progressive destruction of alveolar bone with variable morphology, specially the infiltrative or ulcerative form, with infiltrated borders [2, 7].

The clinical and morphological diversity of PCM demands a differential diagnosis along with tuberculosis, Hodking disease, and other systemic and subcutaneous mycoses [4].

In this context, ulcerative lesions of paracoccidioidomycosis are very similar to the mouth intracavitary tumors such as squamous cell carcinoma [4]. Therefore, these oral lesions of PCM have been difficult to diagnose, in some cases, which requires a more detailed histopathological analysis [2].

This disease can progress silently, presenting signs and symptoms similar to other granulomatous diseases, which may delay diagnosis and effective treatment, and contribute to high rates of morbidity and mortality [4]. Thus, the study of clinical cases is justified by the similarity between the evolution of PCM

and neoplasia. Therefore, the present study aimed to report a case of paracoccidioidomycosis mimicking oral carcinoma.

Patient and Methods

Case report

Male patient, 63 years old, resident in the countryside of Pernambuco, Brazil, retired farmer, currently working as general services assistant, was attended in the clinic of Head and Neck of Cancer Hospital of Pernambuco, presenting palate injury over about a year ago. At the moment, the patient reported smoking and alcohol consumption over a period of approximately 50 years, consuming about 10 cigarettes per day, however he had quit smoking two years ago.

In preliminary clinical examination, the patient presented ulcerative-infiltrative and vegetating lesion on the hard palate and absence of cervical lymph node involvement. Given his clinical history of smoking and alcohol consumption, and also physical examination, the diagnostic hypothesis was malignancy. The patient underwent histopathology evaluation which showed ulceration, acute and chronic mucosal inflammation, reaching the submucosal mucous glands, with no evidence of neoplasia.

After 30 days, a new biopsy indicated the presence of granulation tissue. The patient complained of difficulty in swallowing, anorexia and expansion of lesion, being hospitalized for 48 hours. During this period a new biopsy was performed, however the report was inconclusive. The patient was discharged home. After two days, at ambulatory service, a third biopsy was performed showing a chronic inflammatory process with giant-cell reaction, cells of foreign body type and Largerhans. Still in search of a diagnosis, a fourth biopsy was performed and after three days, the patient was admitted at the emergency department for outpatient care with severe dyspnea and impaired general condition. The last biopsy revealed the presence of areas with nonspecific chronic inflammation, fibrosis, and chronic granulomatous inflammatory process with typical *Paracoccidioides* yeast-like cells (Fig 1).

The mycological diagnosis was also conducted at the Department of Mycology of the Federal University of Pernambuco. The double immunodiffusion technique was used and confirmed the case of paracoccidioidomycosis, with anti- *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in titers of 1:16 (Fig 2).

After seven months, the patient's condition deteriorated, with development of pulmonary disability, difficulty of swallowing, severe cough, fever, dyspnea, cyanosis, anictericia, dehydration, malnourishment and pallidness. Treatment was initiated with rocephin and amphotericin B with a dose of

100mg/day followed by cumulative doses until 2,000mg/day, and also a high calorie and protein diet via nasogastric tube. The respiratory tract infection was treated with clindamycin and tazocin for 10 and 12 days, respectively.

After 42 days, amphotericin B therapy was suspended and replaced by sulfamethoxazole/trimethoprim 1.600/1.600mg and cefepime hydrochloride for 10 days, as secondary prophylaxis. The patient was discharged home after 56 days of treatment, remaining in regular monitoring for control of cure, without relapse of the disease. At the moment, the patient presents residual PCM with destruction of palate.

Discussion

Paracoccidioidomycosis is considered the most diagnosed systemic mycosis in Latin America, with prevalence in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina [8]. Uncommonly Kurai et al. (2012) reported a case of PCM in Japan but the authors considered it an imported disease once this infection was acquired during a trip to South American [9].

Our patient was a farmer and this occupation is considered an important risk factor for the acquisition of this mycosis. Usually, the association between the agricultural professions with PCM is discussed [2]. Although the patient had presented the typical epidemiological characteristics of PCM as gender and profession, the diagnosis was delayed and challenger to the staff. Moreover, the male sex predominance in PCM is also due to the protective action of hormonal factor- β estradiol in women [2].

Regarding the location of the lesions, the patient had our presented jugal mucosa commitment, followed by the soft palate and lungs, characteristic of multifocal disease. The oral lesions are more frequently described in PCM, according to Ferreira et al. [10]. However, we believe that only these clinical conditions are not conclusive, especially in oral cancer patients, once clinical and histopathological aspects difficult the differential diagnosis.

Based on the reported case is imperative the accurate analysis of infiltrative and ulcerative lesions in the oral cavity when the patient is smoking and alcohol addicted. In this case, the presence of *P. brasiliensis* caused an extensive and unusual histological damage with cellular transformation mimicking a neoplastic tissue although the association of PCM and cancer had been observed [11, 4]. Also PCM lesions can be misdiagnosed as pharyngeal cancer due to the onset of a refractory ulcer [9].

The atypical cases of PCM must always be reported once this fungal infection may precede lung cancer in smokers [4] as occurred in a 53 years old woman whose lesions were simulating lung metastasis. During the diagnostic process she underwent to radiological exam which revealed multiple bilateral pulmonary nodules, suggestive of metastasis. However, lung histopathological findings were compatible with PCM [12].

Also, cases of PCM had already been diagnosed by histopathological examination, in which the patients presented granulomatous and ulcerative oral lesions, with concomitant pulmonary involvement, mimicking squamous cell carcinoma [11]. The incisional biopsy of mouth has been recommended in these cases, and an adequate and well analyzed biological material is essential to establish a correct diagnosis [13]. In our study four biopsies were performed to rule out malignancy and confirm PCM.

In the present case, PCM was also confirmed after the serologic testing double immunodiffusion. This technique is commonly used for detection and titration of antibodies, likewise to the diagnosis, being also useful to prognosis and monitoring of patients during and after treatment [10, 13].

The therapy of choice of our patient was amphotericin B, still considered the drug of choice for many systemic mycoses treatment. Although this drug may cause harmful side effects, in the reported case the clinical course was favorable remaining only with the destruction of palate as a residual form of PCM [11, 14].

We believe that the favorable outcome was only possible due to the histopathological and serological diagnosis which allowed the choice of an appropriate treatment with successful outcome.

Acknowledgments

We would like to thank FACEPE (Brazilian research agency) for financial support, Cancer Hospital of Pernambuco (HCP) and Federal University of Pernambuco (UFPE) for providing the infrastructure and professional assistance.

References

1. Lenhard-Vidal A, Assolini JP, Ono MA, Bredt CSO, Sano A, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* Antigens Elicit Different Serum IgG Responses in Chronic Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2013; 176:345–52.

2. Sassi LM, Biazolla ER, Trompeczynski I, Kanzake T, Freitas, SEM, Furuse CF, Dissenha JL, Simette RL, Russi-Costa RH, Orlandi D, Ramos, GHA, Oliveira, BV, Cervantes, O. Oral Manifestations of Paracoccidioidomycosis. *Rev Int Estomatol*. 2004; 1(2):57-61.
3. Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2005; 53(6):931-51.
4. Marques AS. Paracoccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*. 2012; 30: 610-5.
5. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Paracoccidioidomicose. In: *Tratado de Micologia Médica*. Editora Sarvier, São Paulo 2002, pp 676-84.
6. Shikanai-Yasuda MA, Telles-Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML e Grupo de Consultores do Consenso em Paracoccidioidomicose. Consenso de Paracoccidioidomicose. *Ver. Soc. Bras Med Tropi*. 2006; 39(3): 297-310.
7. Azenha, MR, Caliento R, Brentegani LM, Lacerda SA. A Retrospective Study of Oral Manifestations in Patients with Paracoccidioidomycosis. *Braz Dent J*. 2012; 23(6): 753-7.
8. Brazão-Silva MT, Andrade, MF, Franco T, Ribeiro RIMA, Silva WSS, Faria G, Faria PR, Cardoso, SV, Loyola AM. Paracoccidioidomycosis: a series of 66 patients with oral lesions from an endemic área. *Mycoses*. 2010; 54: 189-95.
9. Kurai H, Homagari N, Ito K, Kauamura I, Suzuki J, Hadano Y, Endo M, Lida Y, Okinaka K, Katsuhiko. A Case of Oral Paracoccidioidomycosis suspected to be Pharyngeal Cancer. *J. Med. Mycologi*. 2012; 53: 49-52.
10. Ferreira SP, Santos RS, Paula LB; Reis Aas. Prevalência da Paracoccidioidomicose em pacientes diagnosticados no Hospital Araújo Jorge em Goiânia-Goiás, Brasil. *Revista da UninCor*. 2012; 10 (1): 167-77.
11. Meneses-García A, Mosqueda-Taylor A, Luz RM, Ruiz-Godoy LM. Rivera Paracoccidioidomycosis: Report of 2 cases mimicking squamous cell carcinoma. *Oral surg. oral med. oral pathol.*. 2002; 94(5).
12. Pietro D, Nunes MHG, Krueel NF, Marques ET, Schaefer MB. Paracoccidioidomicose simulando metástase pulmonar. *Arq. catarin. med*. 1997; 26 (1- 4): 71-3.
13. Batista VES, Silva MM, Matheus G. The Importance of the Surgeon-Dentist in the Diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev. odontol. UNESP*. 2011; 32 (2): 14-7.

14. Almeida OP, Jorge-Junior J, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the Mouth: an Emerging Deep Mycosis. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14(4): 268-74.

Fig. 1 Histological diagnosis showing Paracoccidioidomycosis. Yeasts at different developmental stages, 400X (**a** and **b**); foreign body giant cell (*) and yeasts (▲) HE-400X (**c**); yeast cell (▲) and Langerhans type giant cell (*), HE-200X (**d**); outbreaks of fungal proliferation, HE-200X (**e**); fungal proliferation (▲) and areas of fibrosis (*), PAS-200X (**f**).

Fig. 2 Serological diagnosis by double immunodiffusion revealing a reagent serum (patient letter **d**) against *Paracoccidioides brasiliensis* antigen (**a**) presented as a band of precipitation. (**b**): Positive serum control; (**c**, **e**, **f** and **g**): Negative tests.

Figure 1

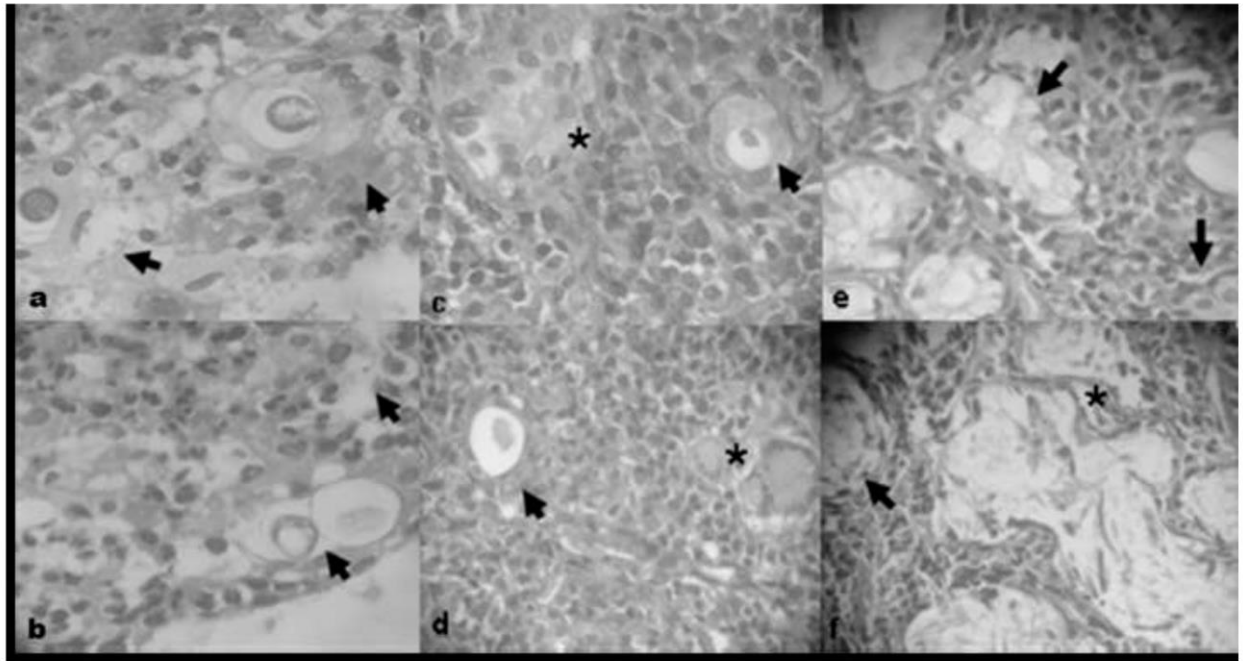
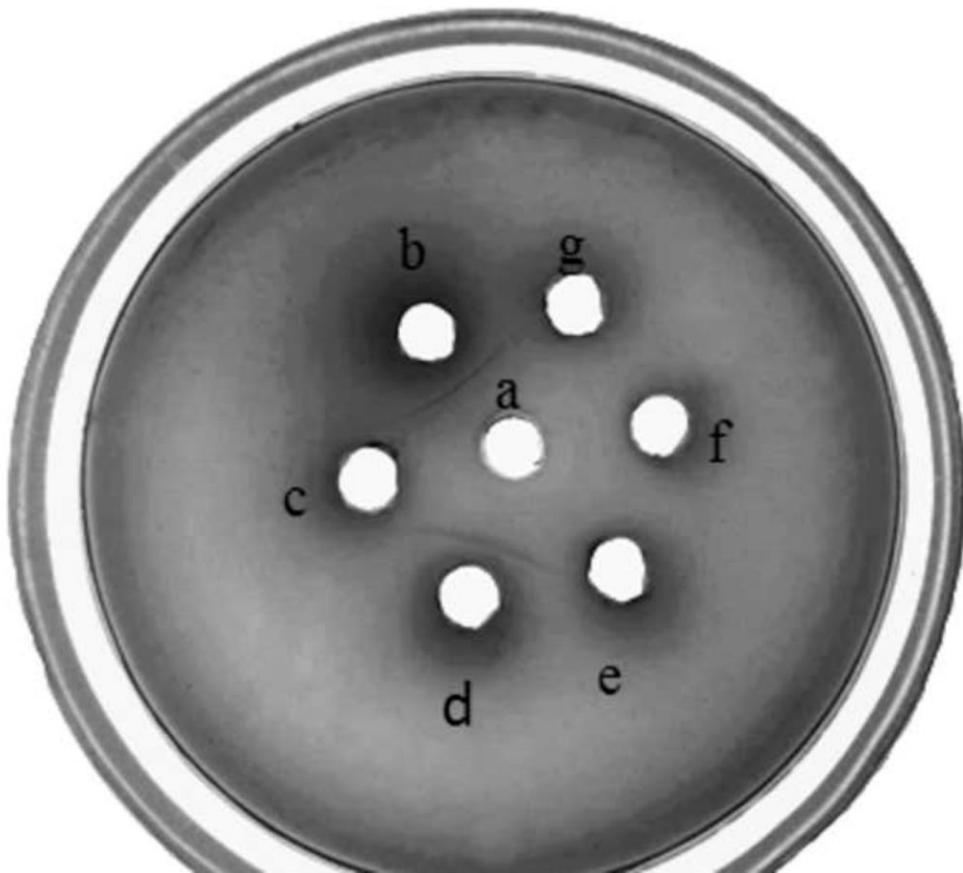
[Click here to download high resolution image](#)

Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)



ANEXO II

Normas da Revista do Artigo II - Capítulo II



Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. ESCOPO E POLÍTICA

A *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada / Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* é um periódico especializado de conteúdo multidisciplinar, aberto à comunidade científica nacional e internacional, arbitrada e distribuída aos leitores do Brasil e de vários outros países.

Esta Revista é editada pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP. Publica pesquisas originais nos diferentes campos das Ciências Farmacêuticas, sobre temas relevantes envolvendo pesquisas básicas e aplicadas, na forma de artigos originais, comunicações breves e trabalhos de revisão. Os manuscritos poderão ser encaminhados em português, inglês ou espanhol. Publica um volume por ano, constituído por quatro fascículos ou números.

É vedada a submissão integral ou parcial do manuscrito a qualquer outro periódico. A responsabilidade do conteúdo dos artigos é exclusiva dos autores.

2. SUBMISSÃO DE TRABALHO

Os manuscritos deverão ser submetidos em formato eletrônico no site da revista em [SUBMISSÃO](#) ou clicando neste link.

Cada manuscrito deve vir acompanhado do [TERMO DE SUBMISSÃO E AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO](#) em formato PDF, assinado por todos os autores, e do [FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO](#) preenchido em formato .doc, disponíveis nos links acima. Estes documentos devem ser preenchidos e enviados pelo sistema de submissão como documentos suplementares.



3. PREPARAÇÃO DE ARTIGO ORIGINAL

Os manuscritos devem ser digitados no editor de texto MS Word versão 97 ou superior, fonte *Times New Roman*, tamanho 12, formato A4 (210x297mm), margens laterais de 3 cm, superior e inferior de 2,5 cm, com espaço duplo em todo o texto. A numeração das páginas deverá ser inserida do lado direito no canto inferior.

O manuscrito deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem: identificação, resumo, palavras-chave, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, referências, figuras, legendas de figuras, tabelas e legendas de tabelas.

3.1 Página de Identificação

Os autores devem preencher o [FORMULÁRIO DE IDENTIFICAÇÃO](#), citado no item 2 deste documento, de acordo com as diretrizes a seguir e enviá-lo como documento suplementar no instante da submissão pelo site da revista:

a) Título do artigo: deve ser conciso, informativo e completo, evitando palavras supérfluas.

Os autores devem apresentar versão para o inglês, quando o idioma do texto for português ou espanhol e para o português, quando redigido em inglês ou espanhol.

b) Autores: nome completo de cada autor, sem abreviações.

c) Afiliação: indicar a afiliação institucional de cada um dos autores.

d) Autor correspondente: indicar o autor para o qual a correspondência deve ser enviada, com endereço completo, incluindo e-mail, telefone e fax.

e) Título resumido: o título resumido será usado como cabeçalho em todas as páginas impressas e não deve exceder 40 caracteres.

3.2 Resumo e Abstract

Os artigos, obrigatoriamente, deverão vir acompanhados de um resumo na língua em que o texto for redigido do *abstract* em inglês. Os trabalhos redigidos em inglês deverão apresentar um resumo em português. Os resumos devem ser indicativos e



formulados de acordo com a NBR (ABNT) 6028: *Informação e Documentação*. Devem ser redigidos em um único parágrafo e sem subdivisões contendo no máximo 250 palavras. Neles devem ser apresentados os objetivos do estudo, as abordagens metodológicas, os resultados e as conclusões.

3.2.1 Palavras-chave e Keywords

Deve ser apresentada, obrigatoriamente, uma lista de 3 a 6 termos, separados por ponto final, que represente de modo preciso o tema abordado no manuscrito em português e inglês. Tais termos devem, preferencialmente, estar indexados no [Tesauro MeSH da Medline](#) ou serem descritores da área da Saúde do [DeCS Bireme](#).

3.3 Introdução

Deve determinar o propósito do estudo e oferecer uma breve revisão da literatura, justificando a realização do estudo e destacando os avanços alcançados através da pesquisa.

3.4 Material e Métodos

Devem oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo possa ser repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas podem ser apenas referenciadas.

3.5 Resultados

Devem oferecer uma descrição clara e concisa dos resultados encontrados, evitando-se comentários e comparações. Não repetir no texto todos os dados contidos nas figuras e tabelas.



3.6 Discussão

Deve explorar o máximo possível os resultados obtidos, relacionado-os com os dados já registrados na literatura. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

3.7 Agradecimentos

Devem se restringir ao necessário. O suporte financeiro deve ser incluído nesse item.

3.8 Referências

Todas as obras citadas no desenvolvimento do trabalho devem aparecer mencionadas nas referências bibliográficas. As referências devem ser ordenadas alfabeticamente e elaboradas de acordo com o **Estilo de Vancouver** conforme o manual: Patrias K. [Citing medicine](#): the NLM style guide for authors, editors, and publishers [Internet]. 2nd ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007.

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no [INDEX MEDICUS](#). Pode-se também ser usado para esta finalidade o [CATÁLOGO COLETIVO NACIONAL](#). Ou ainda o documento [APPENDIX B: ADDITIONAL SOURCES FOR JOURNAL TITLE ABBREVIATIONS](#).

As abreviações dos títulos de periódicos não devem aparecer em itálico e nem seguidas por ponto final. Exemplo: Physical Review Letters (Phys Rev Lett), International Journal of Clinical Pharmacy (Int J Clin Pharm), Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada (Rev Cienc Farm Basica Apl). Nas referências de artigos de periódicos devem aparecer, sempre que houver, o volume, o número e a paginação do trabalho.



4. PREPARAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO

Deve conter uma revisão crítica de assunto atual e relevante baseando-se em artigos publicados e em resultados dos autores. O Artigo de Revisão não deve ultrapassar 24 páginas no manuscrito. Deve apresentar resumo na língua em que estiver redigido e um *Abstract* quando redigido em português ou espanhol. Neste tipo de trabalho os autores, obrigatoriamente, deverão citar no desenvolvimento do texto trabalhos de sua autoria sobre o tema discutido, publicados em outros veículos de comunicação científica.

5. PREPARAÇÃO DE COMUNICAÇÃO BREVE

Deve ser breve e direta, sendo seu objetivo comunicar resultados ou técnicas particulares. No entanto recebe a mesma revisão e não é publicada mais rapidamente que um artigo original. Deve ser redigida de acordo com as instruções dadas ao Artigo Original, mas sem subdivisão em capítulos. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato utilizado para o Artigo Original. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentadas. O autor deve informar, no momento da submissão, que o manuscrito é uma Comunicação Breve de modo a ser avaliado adequadamente durante o processo de revisão.

6. INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Citações bibliográficas no texto: Devem ser apresentadas no texto pelo(s) sobrenome(s) dos autores seguida do ano da publicação, conforme os exemplos:

- Um autor: Croft (1999) ou (Croft, 1999)
- Dois autores: Sogin & Bacci (1998) ou (Sogin & Bacci, 1998)
- Mais que dois autores: Kreiger et al. (1990) ou (Kreiger et al., 1990).
- Citação de citação: A RCFBA não recomenda fazer o uso de citação de citação no desenvolvimento do texto. No caso da citação ser imprescindível para o estudo, ela deverá aparecer em nota de rodapé fazendo-se o uso da expressão latina *apud* ou da



expressão citado por. Exemplo : Croft (1980) citado por Souza et al. (2011, p. 54) ; Croft (2009 apud Klein et al. 1973, p.54).

7. DIREITOS AUTORAIS

Os autores devem encaminhar, como documento suplementar pelo sistema de submissão, o documento que ateste a cessão de direitos autorais do trabalho à RCFBA. Para tanto, deverão preencher o [TERMO DE SUBMISSÃO E AUTORIZAÇÃO DE PUBLICAÇÃO](#) também disponível no item 2 deste documento. Este documento deve vir assinado por todos os autores do manuscrito.

8. ILUSTRAÇÕES

8.1 Figuras

Fotografias, gráficos, mapas ou ilustrações devem ser apresentadas ao final do trabalho, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos segundo a ordem que aparecem no texto. As legendas correspondentes deverão ser claras e concisas e devem aparecer logo após cada figura. Os locais aproximados das figuras deverão ser indicados no texto. A elaboração das figuras deverá ser feita em colorido, no entanto, na publicação impressa elas aparecerão em preto e branco ou tons de cinza. As fotografias deverão ser encaminhadas, também em arquivos separados, fora do Word, no formato .tif ou .jpg com no mínimo 300 dpi de resolução.

8.2 Tabelas

Devem complementar e não duplicar o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos arábicos na ordem que aparecerão no texto. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela. Se necessário, utilizar notas de rodapé identificadas. Elas



deverão aparecer ao final do trabalho e no desenvolvimento do texto deve-se indicar somente o local no qual as mesmas serão inseridas.

8.3 Ética

Os pesquisadores que utilizam em seus trabalhos experimentos com seres humanos, ou material biológico humano, devem observar as normas vigentes editadas pelos órgãos oficiais. Os trabalhos que envolvem experimentos que necessitam de avaliação do Comitê de Ética deverão ser acompanhados de cópia do parecer favorável.

OS MANUSCRITOS QUE NÃO ESTIVEREM DE ACORDO COM AS INSTRUÇÕES AOS AUTORES NÃO SERÃO ANALISADOS.

Endereço:

Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Rodovia Araraquara-Jaú, km 01 - Caixa Postal 502

14801-902 Araraquara, SP- Brasil.

Fone/ Phone: 55-16-33016887

E-mail: rcfba@fctfar.unesp.br

Website : http://serv-bib.fctfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm

ANEXO III

Normas da Revista do Artigo III - Capítulo III



JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0378-8741

DESCRIPTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their **biological** and **pharmacological effects** based on the principles established through international conventions. Early people confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful **therapeutic agents** in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these **medicinal substances** and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of **indigenous remedies**. Chemists continue to use **plant-derived drugs** (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources.

Accordingly, today's ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the:

- documentation of **indigenous medical knowledge**,
- scientific study of **indigenous medicines** in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as
- search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. Clinical studies on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems. The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only.

AUDIENCE

Ethnopharmacologists, Medicinal Chemists, Pharmacologists, Toxicologists, Anthropologists, Pharmacognosists, Ethnobotanists, Economic Botanists, Ethnobiologists

IMPACT FACTOR

2012: 2.755 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
BIOSIS
CAB Abstracts
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Current Contents/Life Sciences
EMBASE
EMBiology
International Pharmaceutical Abstracts
MEDLINE®
NAPRALERT (Natural Products Alert)
Science Citation Index
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief:

R. Verpoorte, Gorlaeus Lab., HB024, Universiteit Leiden, Einsteinweg 55, 2333 CC Leiden, Netherlands, **Email:** verpoort@chem.leidenuniv.nl

Editor:

Associate Editor:

D. Guo, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shanghai, China
Y.S. Kim, Seoul National University (SNU), Seoul, South Korea
P.K. Mukherjee, Jadavpur University, Kolkata, India
G. Schmeda Hirschmann, Universidad de Talca, Talca, Chile
J. van Staden, University of KwaZulu-Natal (UKZN), Pietermaritzburg, South Africa
A.M. Viljoen, Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa
E. Yesilada, Yeditepe University, Erenkoy-Istanbul, Turkey

Reviews Editor (including Commentaries and Book Reviews):

M. Heinrich, The School of Pharmacy, University of London, 29-39 Brunswick Square, London, WC1N 1AX, UK, **Email:** m.heinrich@ucl.ac.uk

If you want to suggest a review, please provide a structured abstract and include an annotated table of contents and a short CV of the lead author(s).

Editorial Board:

S. Alban, Kiel, Germany
M.J. Balick, Bronx, NY, USA
R. Bauer, Graz, Austria
G. Bourdy, Cayenne, French Guiana
J.B. Calixto, Florianópolis, Brazil
C-T. Che, Hong Kong, Hong Kong
G.A. Cordell, Evanston, IL, USA
V.S. da Silva Bolzani, Araraquara, Brazil
J. Ding, Shanghai, China
V.M. Dirsch, Vienna, Austria

T. Efferth, Heidelberg, Germany
E. Elisabetsky, Porto Alegre, Brazil
J. Fleurentin, Metz, France
B.L. Furman, Glasgow, UK
M.P. Germano, Messina, Italy
J. Gertsch, Bern, Switzerland
A.H. Gilani, Karachi, Pakistan
M.P. Gupta, Panama City, Panama
A. Hensel, Münster, Germany
P.J. Houghton, London, UK
Z. Ismail, Penang, Malaysia
W. Jia, Kannapolis, NC, USA
T. Johns, Ste. Anne de Bellevue, QC, Canada
A.K. Jäger,
G. Kavalali, Istanbul, Turkey
H-S. Kim, Cheongju, South Korea
J. Kim, Seoul, South Korea
Y. Kimura, Ehime, Japan
M.A. Lacaille-Dubois, Dijon, France
M. Leonti, Cagliari, Italy
G. Lin, Hong Kong, Hong Kong
E. Matteucci, Pisa, Italy
I. Merfort, Freiburg, Germany
J.J.M. Meyer, Pretoria, South Africa
D.E. Moerman, Ypsilanti, MI, USA
D.A. Mulholland, Guildford, England, UK
A. Panthong, Chiang Mai, Thailand
X. Peigen, Beijing, China
A. Pieroni, Pollenzo/Bra, Italy
D.D. Soejarto, Chicago, IL, USA
E. Speroni, Bologna, Italy
A.J. Vlietinck, Antwerpen, Belgium
H. Wagner, München, Germany
C.S. Weckerle, Zurich, Switzerland
C.W. Wright, Bradford, UK
S. Zacchino, Rosario, Argentina

Founding Editors:

J.G. Bruhn, Tomelilla, Sweden
L. Rivier, Lausanne, Switzerland

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinidine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Classification of your paper

Please note that upon submitting your article you will have to select **at least one classification** and **at least three of the given keywords**. You can preview the list of classifications and keywords ([here](#)). This information is needed by the Editors to more quickly process your article. In addition to this, you can submit free keywords as described below under "Keywords".

The "rules of 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

For more details on how to write a world class paper, please visit our [Pharmacology Author Resources](#) page.

Authors are encouraged to submit video material or animation sequences to support and enhance your scientific research. For more information please see the paragraph on video data below.

Types of paper

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome. Outlines for potential reviews need to include: A detailed abstract using the structure provided in the guidelines An annotated table of contents A short CV of the lead author
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - *invited*, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and

natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk with an outline.

7. Conference announcements and news.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Policy and ethics

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Additional information

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

In addition, you are recommended to adhere to the research standards described in the following articles:

Cos P., Vlietinck A.J., Berghe D.V., et al. (2006) Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology*, 106: 290-302.

Matteucci, E., Giampietro, O. (2008) Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 163-172.

Froede, T.S.A. and Y.S. Medeiros, Y.S. (2008) Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 173-183. Gertsch J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 177-183.

Chan K., et al. (2012) Good practice in reviewing and publishing studies on herbal medicine, with special emphasis on traditional Chinese medicine and Chinese Materia Medica. *Journal of Ethnopharmacology* 140: 469-475.

Heinrich, M., Edwards. S., Moerman. D.E.. and Leonti. M. (2009), Ethnopharmacological field studies: a critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol*, 124: 1-17.

PREPARATION

Reference formatting

References in the manuscript should be given with the name of the first author (in case of 2 authors, both names, and in case of more first author et al.), and the year of publication, in the reference list any style or format can be used as long as the style is consistent. In the list all author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The author should divide the abstract with the **headings Ethnopharmacological relevance, Materials and Methods, Results, and Conclusions.**

Click [here](#) to see an example.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Keywords

After having selected a classification in the submission system, authors must in the same step select 5 keywords. These keywords will help the Editors to categorize your article accurately and process it more quickly. A list of the classifications and set keywords can be found [here](#).

In addition, you can provide a maximum of 6 specific keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Plant names

In the Materials and Methods section there must be a separate heading for describing the material used. That includes official name, local name, English name (if known), GPS position in case of collection in the wild or cultivation, a voucher specimen must be deposited in an official herbarium for possible future comparison. In the text it should be stated that the plant name has been checked with www.theplantlist.org mentioning the data of accessing that website.

In case of commercially procured material should mention the source, batch number, quality control data. Data on chemical characterization (metabolomics, chromatographic methods) should also be presented, in case of known active compounds their quantitative analysis should be presented.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.

- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please note that figures and tables should be embedded in the text as close as possible to where they are initially cited. It is also mandatory to upload separate graphic and table files as these will be required if your manuscript is accepted for publication.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style

of the journal and should include a substitution of the publication date with "Unpublished results". "Personal communication" will not be accepted as a reference. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Please use full journal names.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communication*. 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

When a web citation with a link is being used as a reference, the link should be checked, and that date reported with the link as "accessed on March 29, 2012":

American Chemical Society. 2012. Ethical guidelines to publication of chemical research. <http://pubs.acs.org/userimages/ContentEditor/1218054468605/ethics.pdf>. Accessed on March 31, 2012.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum

size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our ProofCentral system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO IV

Normas da Revista do Artigo IV - Capítulo IV

química nova**INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

ISSN 0100-4042 *versão
impressa*
ISSN 1678-7064 *versão
online*

- [Normas de publicação](#)
- [Preparação de manuscritos](#)
- [Submissão dos artigos](#)
- [Manuscritos revisados](#)
- [Copyright ©2009 Sociedade Brasileira de Química](#)

Normas de publicação

GERAL - Serão considerados para publicação na Revista Química Nova manuscritos que cubram as áreas tradicionais da Química bem como artigos sobre Ensino de Química, História da Química, Política Científica, etc, além de artigos de áreas afins, desde que tenham acentuado conteúdo químico. Os trabalhos devem se encaixar dentro de uma das modalidades abaixo:

Artigos Originais (em português, inglês ou espanhol): refere-se a trabalhos inéditos de pesquisa. Devem seguir a forma usual de apresentação, contendo Introdução, Resultados e Discussão, Parte Experimental etc, de acordo com as peculiaridades de cada trabalho. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Artigos de Revisão (em português, inglês ou espanhol): destinados à apresentação do progresso em uma área específica de Química, com o objetivo de dar uma visão crítica do estado da arte do ponto de vista do especialista altamente qualificado e experiente. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

É imprescindível que, na referida área, o autor tenha publicações que comprovem a sua experiência e qualificação. Antes do envio do manuscrito, o autor deverá submeter à editoria, por e-mail, um resumo da revisão pretendida, acompanhado de uma carta explicativa da pertinência do trabalho. O material será analisado pelos Editores e, uma vez aprovado, será solicitado ao autor o envio do manuscrito completo, dentro das normas de QN, e só então será dado início ao processo de avaliação pelos assessores.

O Corpo Editorial de QN poderá, eventualmente, convidar pesquisadores qualificados para submeter artigo de revisão.

Artigos sobre Educação (em português ou espanhol): trabalhos de pesquisas relacionadas ao ensino de Química e divulgação de experiências inovadoras no ensino de graduação e pós-graduação. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser

numeradas.

Notas Técnicas (em português, inglês ou espanhol): trabalhos de comunicação de métodos, validação de métodos, técnicas, aparelhagens ou acessórios desenvolvidos no laboratório de origem do autor do manuscrito. Deverão ter no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas, etc e todas as páginas deverão ser numeradas.

Assuntos Gerais (em português, inglês ou espanhol): abordagem de assuntos de interesse geral dos químicos, tais como política científica, programas de graduação e pós-graduação, história da química. etc. Deverão ter no máximo 40 páginas, incluindo figuras, tabelas, esquemas etc. e todas as páginas deverão ser numeradas.

Preparação de manuscritos

Todos os trabalhos deverão ser digitados em espaço duplo, utilizando somente Microsoft Word. A seguir, deve ser gerado um único arquivo no formato *.pdf*, do trabalho todo, para ser submetido através do sistema *on line* de QN. A revista não aceita mais a submissão de trabalhos por outra forma.

A primeira página deverá conter o título do trabalho, nome e endereço dos autores. Havendo autores com diferentes endereços, estes deverão vir imediatamente após o nome de cada autor. Os autores deverão ser agrupados por endereço. O autor para correspondência, que deverá ser o mesmo que submete o artigo *on line*, deverá ser indicado com asterisco (*) e seu e-mail colocado no rodapé da página (um só e-mail).

A segunda página deverá conter o título e o resumo do trabalho em inglês (abstract), com no máximo 100 (cem) palavras, e a indicação de 3 palavras-chave (keywords), também em inglês.

As figuras (incluindo gráficos, esquemas, etc) deverão ser em número máximo de 7 figuras simples e ter qualidade gráfica adequada (usar somente fundo branco). Para número maior ver o item Material Suplementar. As figuras, tabelas, esquemas, etc deverão ser colocadas após as referências e devidamente identificadas pelo respectivo número. Se escaneadas, deverão ser em alta resolução (*800 dpi/bitmap para traços*).. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente, além de boa qualidade gráfica. Considerar que as figuras deverão ter largura máxima de uma coluna (8,5 cm).

Figuras coloridas terão custo de publicação repassado aos autores, quando da publicação. Esse valor só poderá ser informado aos autores quando o trabalho estiver previsto para ser publicado, ocasião em que a gráfica fornece o orçamento.

Para figuras, gráficos, esquemas, tabelas, etc idênticos aos já publicados

anteriormente na literatura, os autores deverão pedir permissão para publicação junto à empresa/sociedade científica que detenha os direitos autorais e enviá-la à editoria de QN junto com a versão final do manuscrito.

As referências deverão ser numeradas consecutivamente no texto, na forma de expoentes, após a pontuação (se houver). A lista de referências deverá ser colocada no final do texto. As legendas das figuras, gráficos e esquemas deverão ser colocadas em uma única folha à parte, separadas das figuras. A seguir, deverão ser colocadas as figuras, os gráficos, os esquemas, as tabelas e os quadros. Colocar os títulos acima de cada tabela. No texto, deverá ser indicada apenas a inserção de cada um(a).

Referências

Revistas:

Será utilizada a abreviatura da revista como definida no Chemical Abstracts Service Source Index (ver <http://www.cas.org/sent.html>). Caso a abreviatura autorizada de uma determinada revista não puder ser localizada e não for óbvio como o título deve ser abreviado, deve-se citar o título completo.

1. Varma, R. S.; Singh, A. P.; *J. Indian Chem. Soc.* **1990**, 67, 518.

2. No caso especial da revista citada não ser de fácil acesso, é recomendado citar o seu número de Chemical Abstract, como segue:

Provstyanoi, M. V.; Logachev, E. V.; Kochergin, P. M.; Beilis, Y. I.; *Izv. Vyssh. Uchebn. Zadev.; Khim. Khim. Tekhnol.* **1976**, 19, 708. (CA 85:78051s).

3. Caso o trabalho tenha doi, mas não a referência completa, citar doi da seguinte maneira:

Vidotti, M.; Silva, M. R.; Salvador, R. P.; de Torresi, S. I. C.; Dall'Antonia, L. H.; *Electrochimica Acta* (2007), doi:10.1016/j.electacta.2007.11.029.

É recomendado o uso de referências compostas na medida do possível, em lugar de uma lista de referências individuais. O estilo das referências compostas é o seguinte:

4. Varela, H.; Torresi, R. M.; *J. Electrochem. Soc.* **2000**, 147, 665; Lemos, T. L. G.; Andrade, C. H. S.; Guimarães, A. M.; Wolter-Filho, W.; Braz-Filho, R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1996**, 7, 123; Ângelo, A. C. D.; de Souza, A.; Morgon, N. H.; Sambrano, J. R.; *Quim. Nova* **2001**, 24, 473.

Patentes:

Devem ser identificadas da seguinte forma (na medida do possível o número do

Chemical Abstracts deve ser informado entre parênteses).

5. Hashiba, I.; Ando, Y.; Kawakami, I.; Sakota, R.; Nagano, K.; Mori, T.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* 79 73,771 **1979**. (CA 91:P193174v)

6. Kadin, S.B.; *US pat.* 4,730,004 **1988**. (CA 110:P23729y)

7. Eberlin, M. N.; Mendes, M. A.; Sparrapan, R.; Kotiaho, T. *Br PI* 9.604.468-3, **1999**.

Livros:

com editor(es):

8. Regitz, M. Em *Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry*; Regitz, M.; Scherer, O. J., eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1990, cap. 2.

sem editor(es):

9. Cotton, F.A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Wiley: New York, 1988.

Programas de computação (Softwares):

10. Sheldrick, G. M.; *SHELXL-93; Program for Crystal Structure Refinement*; Universidade de Göttingen, Alemanha, 1993.

Teses:

11. Velandia, J. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

Material apresentado em Congressos:

12. Ferreira, A. B; Brito, S. L.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brasil, 1998.

Páginas Internet:

<http://www.sbq.org.br/jbcs>, acessada em Junho 2001.

Material não publicado:

Para material aceito para publicação: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, no prelo. Para material submetido mas ainda não aceito: Magalhães, U. H.; *J. Braz. Chem. Soc.*, submetido. Para trabalho não publicado ou comunicação pessoal: Magalhães, U. H.; trabalho não publicado ou Magalhães, U. H., comunicação pessoal. Os resultados não publicados só poderão ser citados com a permissão

explícita das pessoas envolvidas na sua obtenção.

Os autores devem procurar seguir, naquilo que for possível, as normas recomendadas pela IUPAC, inclusive o Sistema Internacional de Unidades. Sobre a nomenclatura de compostos (orgânicos e inorgânicos) já há traduções para a língua portuguesa publicadas em QN. Quanto aos Símbolos e Terminologias, onde não há tradução, espera-se que adaptação seja feita pelos autores, criando então, paulatinamente, um conjunto de normas em português.

Submissão Dos Artigos

A QN oferece aos autores a submissão *on line*, que pode ser acessada através do registro de Login e Senha. É possível registrar-se em nossa home page (<http://quimicanova.sbq.org.br>) usando a opção Novo Usuário. Usuários da plataforma do JBCS, já estão cadastrados na base (pois ela é comum às duas revistas), devendo utilizar o mesmo Login e Senha. Após estar cadastrado no sistema, o autor pode facilmente seguir as instruções fornecidas na tela. Será solicitada a submissão de um único arquivo do manuscrito completo, em formato .pdf. Está disponível uma ferramenta para gerar o arquivo .pdf, a partir de arquivo .doc ou .rtf, com envio automático para o e-mail do autor. Tão logo seja completada a submissão, o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que este seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail com o número de referência do trabalho.

Se não for recebido o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, a situação de seu manuscrito.

Ao fazer a submissão, solicita-se uma carta de apresentação, que deverá ser digitada no local indicado, sendo obrigatória a apresentação dos e-mails de todos os autores. Além disso, devem ser enviados também os nomes, instituições a que pertencem e e-mails de três ou quatro possíveis assessores, que não podem pertencer à(s) mesma(s) instituição(ões) dos autores.

Material Suplementar - Esta modalidade foi criada para que na versão impressa da revista apareça o número estritamente necessário de figuras e tabelas (6 a 7 figuras simples). Ressalta-se que, como este material ficará disponível apenas na versão *on line*, figuras, tabelas e ilustrações coloridas apresentadas na forma de material suplementar não terão custo repassado aos autores, nem limite de páginas. Porém, devem ter boa qualidade gráfica.

O material suplementar deverá ser colocado no final do trabalho, com indicação clara. Deverá ser submetido um único documento .pdf, incluindo o material

suplementar.

Os Editores poderão solicitar aos autores, em qualquer fase da tramitação, a separação de Material Suplementar.

Manuscritos revisados

Manuscritos enviados aos autores para revisão deverão retornar à Editoria dentro de prazo máximo de três meses ou serão considerados retirados, sendo que o sistema encerra o processo, não permitindo que seja reaberto. Vencido o prazo, deverá ser feita nova submissão, dando início a um novo processo.

A submissão do manuscrito revisado deverá ser feita pelo mesmo autor, usando o Login e a Senha registrados anteriormente. O autor deve seguir as instruções fornecidas na tela, para envio do documento *.pdf* completo da versão revisada e das respostas aos assessores, detalhando as alterações feitas na nova versão e justificando as alterações sugeridas nos pareceres e que não foram aceitas pelos autores. Esses dois arquivos devem ser enviados através da seção Envio de Nova Versão, na Página do Autor, no sistema de submissão on line de QN.

Tão logo seja completada a submissão o sistema informará automaticamente, por e-mail, o código temporário de referência do manuscrito, até que ele seja verificado pela editoria. Então será enviado e-mail contendo o número de referência do trabalho.

Se não receber o e-mail com código de submissão temporária, por algum motivo, a submissão não foi completada e o autor terá prazo máximo de 5 (cinco) dias para completá-la. Depois desse prazo, o sistema não permite o envio, devendo ser feita nova submissão.

O autor poderá acompanhar, diretamente através do sistema, o status de seu manuscrito.

VERSÃO FINAL - Quando for solicitada a versão final, o autor receberá instruções específicas quanto a programas para envio de arquivos (texto, figuras, tabelas, etc) . Arquivos em formato *.pdf* não são mais solicitados nessa fase.

Se as Figuras forem escaneadas, deverão ser em alta resolução (800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif ou jpg, desde que nas dimensões especificadas pelos Editores. As fotos ou desenhos com cor (300 dpi/grayscale) deverão ser enviadas com extensão tif/jpg, com largura máxima total de 8,5 cm para não haver problemas ao aplicá-las no padrão da Revista. Outras extensões possíveis: cdr, eps, cdx ou opj. No caso particular de esquemas contendo estruturas químicas, estas deverão ter sempre a mesma dimensão, para que possam ser reduzidas uniformemente.

A Editoria de QN reserva-se o direito de efetuar, quando necessário, pequenas alterações nos manuscritos, de modo a adequá-los às normas da revista ou

tornar seu estilo mais claro, respeitando, naturalmente, o conteúdo do trabalho. Qualquer que seja a natureza do manuscrito submetido, ele deve ser original em nível de metodologia, informação, interpretação ou crítica. A qualificação do trabalho será atestada por dois consultores, indicados pela Editoria.

Copyright ©2009 Sociedade Brasileira de Química

Para publicação, requer-se que os manuscritos submetidos a esta revista não tenham sido publicados anteriormente e não sejam submetidos ou publicados simultaneamente em outro periódico. Ao submeter o manuscrito, os autores concordam que o copyright de seu artigo seja transferido à Sociedade Brasileira de Química (SBQ), se e quando o artigo for aceito para publicação. O copyright abrange direitos exclusivos de reprodução e distribuição dos artigos, inclusive separatas, reproduções fotográficas, microfilmes ou quaisquer outras reproduções de natureza similar, inclusive traduções. Nenhuma parte desta publicação pode ser reproduzida, armazenada em bancos de dados ou transmitida sob qualquer forma ou meio, seja eletrônico, eletrostático, mecânico, por fotocópia, gravação, mídia magnética ou algum outro modo, sem permissão por escrito da detentora do copyright. Embora todo esforço seja feito pela SBQ, Editores e Conselho Editorial para garantir que nenhum dado, opinião ou afirmativa errada ou enganosa apareçam nesta revista, deixa-se claro que o conteúdo dos artigos e propagandas aqui publicados são de responsabilidade, única e exclusiva, dos respectivos autores e anunciantes envolvidos. Conseqüentemente, a SBQ, o Conselho Editorial, os Editores e respectivos funcionários, diretores e agentes isentam-se, totalmente, de qualquer responsabilidade pelas conseqüências de quaisquer tais dados, opiniões ou afirmativas erradas ou enganosas.

[\[Home\]](#) [\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Secretaria Executiva
Av. Prof. Lineu Prestes, 748 - Bloco 3 - Superior
05508-000 São Paulo SP - Brasil
C.P. 26.037 - 05599-970
Tel.: (55 11) 3032-2299
Fax: (55 11) 3814-3602



sbqsp@quim.ig.usp.br