

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida*
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES
INFANTO-JUVENIS COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA
AGUDA**

Larissa Cavalcanti Monteiro

SAPIENTIA AEDIFICAT

João Pessoa - PB

2015

LARISSA CAVALCANTI MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida*
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES
INFANTO-JUVENIS COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA
AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

João Pessoa

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BIBLIOTECÁRIO:

M775a Monteiro, Larissa Cavalcanti.
Avaliação da colonização e resistência antifúngica de
Candida spp. na cavidade bucal de pacientes infanto-juvenis
com leucemia linfocítica aguda / Larissa Cavalcanti Monteiro.-
João Pessoa, 2015.
47f.
Orientador: Paulo Rogério Ferreti Bonan
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
1. Odontologia. 2. Saúde bucal. 3. *Candida*. 4. Leucemia
linfocítica aguda - crianças. 5. Resistência microbiana.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

LARISSA CAVALCANTI MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE *Candida*
ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES
INFANTO-JUVENIS COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA
AGUDA**

Banca Examinadora



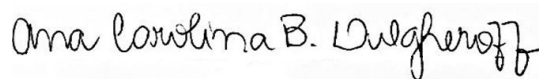
Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

Orientador - UFPB



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Examinador – UFPB



Profa. Dra. Ana Carolina Bernardes Dulgheroff

Examinador - UFPB

DEDICATÓRIA

A Deus,

por me sustentar nessa caminhada, e em tantas outras. Por me abençoar em cada passo dado e por nunca me desamparar.

A minha mãe,

por sempre ser meu porto seguro, amiga e companheira. Por todo apoio e encorajamento a conquistar meus sonhos e pelo amor incondicional. Nunca terei palavras para agradecer tudo o que a senhora faz por mim. Meu amor e gratidão são infinitos!

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, onde quer estejas sei que está olhando por nós.

Ao meu noivo Rafael, por todo apoio e paciência comigo nesses dois anos. Por ser meu companheiro e amigo, me acompanhando, inclusive, nos horários loucos de laboratório e por sempre me impulsionar a ser cada vez melhor na minha profissão.

Ao meu irmão Marcel e minha cunhada Gaby (e meu sobrinho!). Obrigada por todo apoio, por serem meus companheiros em todo momento da minha vida e por todo amor.

Ao meu orientador Paulo Bonan, por todo conhecimento transmitido e por toda confiança em mim depositada. Obrigada pela paciência e dedicação.

À minha companheira fiel Panmella Maciel, você foi essencial nessa minha jornada. Obrigada por toda dedicação, empenho e amizade. Você foi um presente de Deus na minha vida. Essa vitória também é sua!

Aos colegas de mestrado, em especial Mayra, Emanuene, Laura, Cynthia, Ítalo, Ingrid, Marcos Alexandre e Jefferson. Obrigada pela amizade, por toda ajuda nos momentos de dificuldades e por todas as alergias compartilhadas.

As professoras Ana Carolina e Joelma, por todo o apoio na última fase da minha pesquisa. Pelo tempo disponibilizado, por não desistirem de mim, por todo conhecimento, dedicação e por toda paciência comigo. Muito obrigada!

À todos os professores que compõem a PPGO/UFPB, em especial ao professor Lúcio, por toda ajuda e disponibilidade dos laboratórios onde minha pesquisa foi realizada.

À Isabella Arrais, por toda ajuda no Hospital Napoleão Laureano. Por dividir comigo os momentos difíceis vividos lá e por toda atenção e disponibilidade em me ajudar.

À Yuri Cavalcanti, pela ajuda e disponibilidade de tempo. E por fornecer o material para que minha pesquisa fosse concluída.

A todos os profissionais do Hospital Napoleão Laureano.

RESUMO

Introdução: Leucemia linfocítica aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comum em crianças, representando 75% de todas as leucemias diagnosticados e sendo 25% de todas as neoplasias malignas na infância. Existem poucos estudos que lidam diretamente com o entendimento do perfil clínico e outras variáveis associadas com a colonização por *Candida* em pacientes oncológicos infanto-juvenis, especialmente nos países em desenvolvimento. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a colonização e resistência antifúngica de *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes infanto-juvenis com LLA. **Material e Métodos:** Este foi um estudo transversal, controlado, com características observacionais e descritivas. Para realizar este estudo, foram formados dois grupos: um grupo LLA com 40 pacientes diagnosticados com LLA e um grupo controle, formado por 40 indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo. Todos esses indivíduos foram avaliados clinicamente e submetidos à coleta de saliva com cotonete estéril. A saliva foi semeada em CHROMagar *Candida*TM, incubada por 48 hs a 37°C, e as unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas foram contadas e identificadas presuntivamente. Dados variáveis dos participantes foram coletados e armazenados em arquivos individuais. As espécies encontradas foram submetidas a teste de susceptibilidade antifúngica por ensaio de microdiluição para nistatina e anfotericina B, amplamente utilizadas no tratamento de candidose, para estabelecer a sua susceptibilidade/resistência. **Resultados:** Dos 40 pacientes avaliados no grupo LLA, 13 (32,5%) foram positivos para *Candida* e apenas 1 (2,5%) foi positivo no grupo controle ($p < 0,001$). *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente (87,5%). Todos os pacientes que tiveram 10^3 UFC/ml de quantificação estavam em fase de indução da quimioterapia. Das variáveis analisadas, apenas a presença de mucosite esteve diretamente associada com a *Candida* ($p = 0,017$) no grupo LLA. Das 14 cepas de *C.albicans*, 5 cepas (35,7%) eram resistentes à Nistatina e todas as espécies não foram suscetíveis ao Anfotericina B. **Conclusão:** A colonização por *Candida* foi associada a LLA e vinculadas a mucosite sendo as contagens mais elevadas encontradas em fase de indução da quimioterapia. *C. albicans* foi a cepa predominante e a resistência e falta de susceptibilidade à Nistatina e Anfotericina B foram observadas.

Palavras chaves: *Candida*, Leucemia Linfocítica Aguda, Resistência microbiana, Infanto-juvenil.

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphocytic leukemia (ALL) is the most common malignancy in children accounting for 75% of all diagnosed leukemias and being 25% of all malignancies in childhood. There are few studies that deal directly with the understanding of the clinical profile and other variables associated with oral *Candida* colonization in pediatric patients with ALL, especially in developing countries.

Objective: The aim of this study was to evaluate antifungal resistance and *Candida* colonization in oral cavity of infant juvenile ALL patients. **Material and Methods:**

This was a cross sectioned design, controlled, with dual observational and descriptive characteristics. To carry out this study, two groups were formed: a ALL group with 40 patients diagnosed with ALL and a control group, formed by 40 healthy individuals matched by age and gender. All these individuals were clinically evaluated and submitted to salivary collection with sterile swab. The saliva was seeded onto CHROMagar *Candida*TM, incubated for 48hs at 37°C, and the obtained colony formation unities (CFU) were counted and presumptively identified. Variable data of the participants were collected and stored in individual files. The found species was submitted to microdilution for Nystatin and Amphotericin B, widely used treating candidosis, to establish their susceptibility/resistance. **Results:** Of 40 patients evaluated in case group, 13 (32.5%) were positive to *Candida* and only 1 (2.5%) was positive in control group ($p < 0.001$). *Candida albicans* was the most prevalent strain (87.5%). All patients who had 10^3 CFU/mL counts were on induction phase of chemotherapy. Of analysed variables, only mucositis was directly associated with *Candida* positiveness ($p = 0.017$) on ALL group. Five out 14 strains of *C. albicans* (35.7%) were resistant to Nystatin and all species were not susceptible to Amphotericin B. **Conclusion:** *Candida* colonization was associated with ALL probably vinculated to mucositis events being the higher counts found on induction phase of chemotherapy. *C. albicans* was the prevalent strain and resistance and lack of susceptibility to Nystatin and Amphotericin B was found.

Key words: *Candida*, Acute Lymphocytic Leukemia, microbial resistance, infant juvenile.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MIC - Minimal Inibitory Concentration

SDB - Sabouraud Dextrose Broth (SDB)

ASD- Ágar Sabouraud Dextrose

UFC/mL- Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

TCT- (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio)

BFM – Berlim-Frankfur-Munique

OAG – Oral Assessment Guide

PCR - Polymerase Chain Reaction

spp- Espécies

µg/mL- Microgramas por mililitro

µl- microlitros

v/v- Volume/volume

% - Percentual

°C - Graus Celsius

® - Marca registrada

h - Hora

min- Minutos

DTM – Disfunção Têmporo-Mandibular

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPITULO 1.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAIS E METODOS.....	8
Desenho do estudo.....	8
Grupo LLA.....	8
Grupo Controle.....	9
Calibração.....	9
Isolamento, Cultivo e Identificação das espécies de <i>Candida</i>	9
Identificação pela PCR.....	10
Reação de PCR.....	11
Eletroforese.....	12
Teste de susceptibilidade antifúngica por microdiluição.....	12
Preparo do inóculo.....	12
Concentração Mínima Inibitória (CIM) por microdiluição.....	13
Análise estatística.....	13
RESULTADOS.....	14
Dados Gerais dos Grupos LLA/Controle.....	14
DISCUSSAO.....	15
REFERENCIAS.....	19
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	27
CONCLUSAO.....	28
REFERENCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A leucemia é uma neoplasia maligna, que acomete o sangue, tendo origem na medula óssea. É caracterizada pela produção excessiva de leucócitos na medula que circulam no sangue em sua forma imatura. Sua classificação é feita a partir da combinação da linhagem dessas células, linfoide ou mieloide, e evolução da doença, aguda ou crônica (COSTA, SILVA, MACEDO, 2011). A etiologia é incerta, acredita-se que seja causada por anomalias genéticas resultantes de efeitos carcinogênicos (PINHEIRO, 2014).

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é a neoplasia maligna mais comum em pediatria perfazendo 75% de todas as leucemias diagnosticadas e sendo 25% de todas as neoplasias malignas na infância (JAVED et al., 2012). A imunossupressão relacionada à doença e as terapias instituída predispõem os pacientes a infecções bacterianas e fúngicas e reativação de doenças virais (ALBERTH et al., 2006). No exame físico nesses pacientes podem ser observados sinais gerais de prostração, palidez, alterações nutricionais e até mesmo icterícia (GOMES et al., 2005). As manifestações bucais mais comuns em cabeça e pescoço de pacientes com LLA incluem queilite, gengivite, herpes primária, candidose, periodontite e ulcerações. Alterações dentárias como agenesia, microdontia, raízes curtas e defeitos de desenvolvimento do esmalte e dentina são comumente observados nesses pacientes, bem como maloclusão e DTM. Redução do fluxo salivar predispõe infecções e cáries em portadores de LLA (JAVED et al., 2012).

Um estudo envolvendo análise da saúde oral de pacientes com LLA evidenciou que 91,84% apresentavam gengivite, 81,63% cáries, 38,77% mucosite, 38,77% periodontite, 16,32% queilite, 18,36% herpes recorrente e 2% herpes primária. Outras manifestações orais foram lábios ressecados, mucosa pálida, petéquias, equimoses e úlceras induzidas. A prevalência de candidose oral foi de 6,12%. Observou-se que LLA de alto risco e má higiene oral são fatores de risco para o desenvolvimento de candidose e gengivite (ALBERTH et al., 2006).

Os protocolos modernos para o tratamento da LLA são constituídos de cinco fases: indução/remissão, intensificação/consolidação, reindução, prevenção da leucemia no sistema nervoso central e manutenção de remissão (PONCE-TORRES et al., 2010). O cuidado de suporte melhorado, melhor estratificação de

risco e quimioterapia personalizada baseada nas características das células leucêmicas e do hospedeiro tem possibilitado a elevação dos níveis de cura da LLA na infância para cerca de 90%. O uso otimizado de agentes antileucêmicos e os cuidados de suporte nas práticas clínicas atuais tem elevado as taxas de sobrevivência em cinco anos para mais de 85% em países desenvolvidos. Embora os protocolos para manejo de LLA pediátrica permaneçam os mesmos referentes às classes de drogas para indução de remissão, não há consenso sobre qual seria o regime mais adequado. Virtualmente, os resultados em estudo mostram resultados expressivos sobre a remissão completa (98% a 99%). No entanto, há diferenças e desconhecimento quando se considera a remissão molecular ou imunológica (MYOKEN et al., 2003).

A fase de indução/remissão invariavelmente inclui o uso de glicocorticosteróides, vincristina e asparaginase, que são escolhidos por possuírem efeitos sinérgicos de atuação por mecanismos distintos (WILEY et al., 1990; PEDROSA et al., 2002). De forma interessante, alguns estudos recentes mostram que a terapia de indução de remissão intensa pode não ser necessária em pacientes de risco padrão, os quais recebem terapia de intensificação-consolidação adequada (PUI et al., 2012; KAWEDIA et al., 2012). A fase de intensificação/consolidação é essencial para todos os pacientes com LLA, porém não há consenso sobre os melhores regimes empregados e sua duração. A intensificação do uso do metotrexato tem bons resultados em pacientes de riscos intermediários e altos, mas sua utilidade em pacientes de baixo risco ou risco padrão é questionada. A intensificação tardia do uso da asparaginase, vincristina, dexametasona, com ou sem antraciclina, mercaptopurina também são empregadas nessa fase (MYOKEN et al., 2003). A combinação de doses semanais baixas de metotrexato e doses diárias de mercaptopurina, com ou sem pulsos de dexametasona e vincristina, constituem o alicerce de todos os regimes de continuação para LLA. Adequando as doses de metotrexato e mercaptopurina para os limites de tolerância tem propiciado bons resultados (MYOKEN et al., 2003, BHOJWANI et al., 2012).

Candidose é muito frequente em pacientes pediátricos com neoplasias, principalmente em períodos de imunossupressão grave e neutropenia (PONCE-TORRES et al., 2010). Em um estudo que lidou com 30 pacientes pediátricos com câncer, sendo 16 com LLA, demonstrou que dos 23 (76.7%) pacientes que

apresentaram neutropenia moderada para grave desenvolveram colonização fúngica oral ou infecção fúngica evidente durante pelo menos uma ocasião do estudo. Acrescentando, os fungos foram identificados em 9/23 swabs faringianos, 6/23 de cultura urinária e 1/23 de cultura sanguínea. Nas amostras iniciais, *Candida albicans* foi a única espécie encontrada (33/33). A medida que ocorreu piora no quadro neutropênico houve o surgimento de espécies não albicans (*Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida sake* e *Candida tropicalis*) em 5 pacientes, sendo quatro dessas espécies resistentes a azoles, o que pode contribuir para o aumento da morbidade nesses pacientes (ALBERTH et al., 2006). Ilustrando a gravidade dessa situação, uma descrição na literatura reportou seis casos de candidemia em pacientes neutropênicos com leucemia, onde havia resistência das cepas de *C. albicans* resistentes a azoles, em que mesmo após tratamento com Anfotericina B, 4 evoluíram a óbito (MYOKEN et al., 2003). Associadas a neutropenia, possivelmente preditoras para colonização por *Candida*, são as etapas de tratamento quimioterápico que induzem diminuição da atividade inflamatória, particularmente febre neutropênica, como na fase de indução de remissão (WILEY et al., 1990).

A mucosite oral caracterizada como uma alteração inflamatória da mucosa oral é uma das manifestações orais mais comuns em pacientes portadores de leucemia representando a principal causa de dor (LIMA et al., 2010). Segundo estudo realizado por Subramaniam et al., 2008, 20,6% dos pacientes são acometidos pela inflamação da mucosa. Apenas 3,4% das crianças que não estavam em tratamento apresentaram a mucosite. Outro estudo verificou que a mucosite seja causada pelo tratamento quimioterápico e que pode ter relação com quadros de candidose.

A xerostomia é outra complicação oral frequente em pacientes em tratamento antineoplásico (HESPANHOL et al., 2010), estando muitas vezes interligada com a mucosite. A quimioterapia e/ou radioterapia alteram o mecanismo qualitativo/quantitativo da saliva, como também, a saliva residual torna-se mais viscosa, com diminuição da capacidade de proteção e lubrificação (SANTOS et al., 2003; LOPES et al., 1998), o que pode predispor infecções fúngicas.

No intuito de avaliar quadros de mucosite e xerostomia nesses pacientes, o Oral Assessment Guide (OAG) foi um protocolo de avaliação criado por Eilers,

Berger e Peterson em 1988 com a finalidade de avaliar alterações na mucosa oral de pacientes em tratamento antineoplásico. Esse guia avalia 8 itens, de acordo com o comprometimento oral, com valores de 1 a 3 atribuídos por item, sendo: 1, condições de normalidade; 2, alterações leves a moderadas em relação à integridade epitelial ou função; 3, comprometimento severo. O total verificado para mucosite varia de 8 a 24.

O surgimento de outras espécies de leveduras, além da *C. albicans* e de infecções mistas sugere que a epidemiologia das infecções por *Candida* está mudando. Consequentemente, estas infecções podem necessitar de doses mais elevadas de tratamentos antifúngicos para seu tratamento. A presença de mais de uma espécie de *Candida* na mucosa oral pode predispor os doentes a candidíase recorrente, causada principalmente por espécies resistentes ao tratamento antifúngico (THEIN et al., 2009). Durante o tratamento antineoplásico, a diversificação das espécies de *Candida*, bem como a crescente incidência de colonização por espécies tais como *C. albicans* e *C. tropicalis* são aumentadas. Poucos estudos investigaram a eficácia/resistência de agentes antifúngicos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço irradiados e a resistência a certos antifúngicos (PANGHAL et al., 2012).

A nistatina e anfotericina B são agentes terapêuticos comuns no tratamento da candidose orofaríngea (SHU et al., 2001). O crescimento no número de isolados clínicos resistentes à terapêutica antifúngica, bem como a necessidade de um guia para a seleção e acompanhamento do tratamento levou a uma procura por testes de sensibilidade antifúngica (MONTEIL et al., 1997).

Em virtude da necessidade de se compreender melhor as variáveis e fatores associados a colonização de *Candida* em pacientes com LLA e verificar a susceptibilidade das espécies encontradas a antifúngicos, desenvolvemos esse estudo procurando avaliar a colonização e resistência antifúngica de *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes infanto-juvenis com leucemia linfocítica aguda

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology”

Antifungal resistance and *Candida* colonization in oral cavity of infant juvenile ALL patients

Larissa Cavalcanti Monteiro¹

Isabela Lima Arrais Ribeiro¹

Panmella Pereira Maciel²

Ana Maria Godim Valença³

Ana Carolina Bernardes Dulgheroff⁴

Lucio Roberto Cançado Castellano^{1,4}

Joelma Rodrigues de Souza⁴

Yuri Wanderlei Cavalcanti⁵

Paulo Rogério Ferreti Bonan^{1,4}

¹ Post Graduate Program in Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

² Dental School, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

³ Department of Clinical and Social Dentistry, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

⁴ Human Immunology Research and Education Group-GEPIH, Health Technical School, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

⁵ Post Graduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Corresponding autor: larissacm_jp@hotmail.com

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphocytic leukemia (ALL) is the most common malignancy in children accounting for 75% of all diagnosed leukemias and being 25% of all malignancies in childhood. There are few studies that deal directly with the understanding of the clinical profile and other variables associated with oral *Candida* colonization in pediatric patients with ALL, especially in developing countries. **Objective:** The aim of this study was to evaluate antifungal resistance and *Candida* colonization in oral cavity of infant juvenile ALL patients. **Material and Methods:** This was a cross sectioned design, controlled, with dual observational and descriptive characteristics. To carry out this study, two groups were formed: a ALL group with 40 patients diagnosed with ALL and a control group, formed by 40 healthy individuals matched by age and gender. All these individuals were clinically evaluated and submitted to salivary collection with sterile swab. The saliva was seeded onto CHROMagar *Candida*TM, incubated for 48hs at 37°C, and the obtained colony formation unities (CFU) were counted and presumptively identified. Variable data of the participants were collected and stored in individual files. The found species was submitted to microdilution for Nystatin and Amphotericin B, widely used treating candidosis, to establish their susceptibility/resistance. **Results:** Of 40 patients evaluated in case group, 13 (32.5%) were positive to *Candida* and only 1 (2.5%) was positive in control group ($p<0.001$). *Candida albicans* was the most prevalent strain (87.5%). All patients who had 10^3 CFU/mL counts were on induction phase of chemotherapy. Of analysed variables, only mucositis was directly associated with *Candida* positiveness ($p=0.017$) on ALL group. Five out 14 strains of *C. albicans* (35.7%) were resistant to Nystatin and all species were not susceptible to Amphotericin B. **Conclusion:** *Candida* colonization was associated with ALL probably vinculated to mucositis events being the higher counts found on induction phase of chemotherapy. *C. albicans* was the prevalent strain and resistance and lack of susceptibility to Nystatin and Amphotericin B was found.

Key words: *Candida*, Acute Lymphocytic Leukemia, microbial resistance, infant juvenile.

Introduction

Acute lymphocytic leukemia (ALL) represents 75% of all diagnosed leukemias in oncopediatric patients and 25% of all malignant illness in childhood (1, 2). The immunosuppression related to disease and myeloablative treatment could be associated with bacterial and fungal infections as well as to reactivation of viral diseases (3). The physical examination of these patients could reveal paleness, prostration, nutritional alterations and even jaundice as general signs and symptoms (4). Some inflammatory manifestations on head and neck of ALL patients include cheilitis, gingivitis, periodontal disease, primary herpes, ulcerations and candidosis. Other orofacial alterations associated with ALL include agenesis, microdontia, short roots, enamel/dentin misdevelopment, malocclusion and temporomandibular joint dysfunction (2). High risk ALL and bad oral hygiene could be important risk factors to gingivitis and candidosis development (3).

Candidosis is a relative common infection in patients with severe immunosuppression and neutropenia (4). A study about oncopediatric individuals, including ALL diagnosis showed that 23 (76.7%) of the children with moderate and moderate to severe neutropenia developed oral colonization to *Candida* or even evident fungal infection during at least one moment all over the study. Other important finding was the huge prevalence rate of *Candida albicans* in the beginning of the treatment (33/33), whereas worsening of neutropenia due to treatment, was associated with non albicans species (*Candida kefyr*, *Candida lusitanae*, *Candida sake* e *Candida tropicalis*) occurrence in 5 patients, being four of them resistant to azoles, which was suggested to contribute to higher morbidity of these patients (3).

The emerging number of other species of *Candida* and mixed infections diagnosis in oncopediatric patients suggested a changing on the epidemiological profile on these individuals. Also, the current treatment quite often includes the use of higher doses of antifungal drugs. Other consequence could be recurrent infections caused by resistant *Candida* species (5). Even using drugs such as nystatin and amphotericin B, it is highly desirable to select and better treatment options defined by sensibility tests (6, 7).

Highlighting the importance to know the profile of *Candida* colonization in ALL pediatric patients and the necessity to determine the species found in the infection sites, the purpose of this study was to evaluate antifungal resistance and *Candida* colonization in oral cavity of infant juvenile ALL patients

Material and Methods

Study Design

Study was designed as a cross sectioned study, being controlled, with dual observational and descriptive characteristic. This study was approved by Ethical Committee for Research at the Health Sciences Center of the Federal University of Paraiba, Brazil.

ALL Group

This group was compound by 40 patients, enrolled by censitarian approach during 2014 and 2015. Ages ranged from 0 to 19 years old and patients were diagnosed with ALL, at a reference oncopediatric unit, located in João Pessoa, Paraíba, Brazil. The number of patients was inside a sample calculus focusing a finite population (IC 12.08, CL of 95%) according to causuistic of reference inside from this unit (www.surveysystem.com/sscalc.htm). The inclusion criteria were determined as ALL diagnosis and being submitted to chemotherapeutic treatment or with recent history of chemotherapy treatment. The exclusion criteria were patients diagnosed with other neoplastic diseases and being over 19 years-old. Data about haemogram with differential count, chemotherapy employed, antimicrobial drugs administered, the level of mucositis, xerostomia and DMFT/dmft (Decayed/Missing/Filled Teeth) were collected from medical and dental records. We considered the last haematological exams performed close to the salivary collection date and inside the same week of both procedures. The DMFT/dmft was obtained after a clinical examination made by a calibrated examiner. The indexes of mucositis and xerostomia were obtained from OAG (Oral Assessment Guide), modified by Cheng et al., 2004 (8) and made by calibrated examiner being dichotomized in presence/absence. Clinical candidosis

was evaluated by calibrated examiner. Of this 40 patients, 19 were in induction therapy, 3 in reinduction therapy, 3 in consolidation and 15 in maintenance phases. These phases were reclassified in induction (induction/reinduction/consolidation) and maintenance phases for statistical analysis due to similarities among them. The standard chemotherapeutic protocol was BMF (Berlin-Frankfurt-Munich) 2002 following the phases previously detailed (9).

Control Group

This group was composed by 40 individuals matched by age and gender with ALL group. It was formed by healthy individuals, without systemic alterations and other diseases/drugs associated to bacterial/fungal infections or hyposalivation. The inclusion criteria were students enrolled on public school, without systemic diseases, and under 19 years-old. The exclusion criteria were to be over 19 years-old and with any systemic diseases. The DMFT was obtained after a clinical examination made by a calibrated examiner. Clinical candidosis was evaluated by the same calibrated examiner.

Calibration

Calibration for all these variables was done in the dental office setting, where the results for the calibration test were based on the following parameters (>0.8 = excellent; $0.6-0.8$ = good; $0.4-0.6$ = regular; <0.4 = bad). It was considered to be a calibrated researcher when obtained a kappa score greater than 0.6. The results for Kappa for the calibration of mucositis diagnosis were 0.877 to 1 and 0.844 evaluator 1 to evaluator 2 (10)

Isolation, Culture and Identification of *Candida* species

The salivary collection was made with a sterile swab on buccal mucosa and tongue. The mean volume collected was 0.03 mL. After the collection, the swabs were placed onto Stuart medium (Global Transport Medium Swabs, Global Trade

Technology, Brazil) and immediately seeded into plates with CHROMagar *Candida*[™] (BD[™] CHROMAGAR[™] *Candida*, France).

After seeding, plates were incubated at 37⁰C for 48 hrs, to colonies counting and *Candida* species establishment. The mean of CFU/mL were obtained by counting of positive growth of *Candida*. The CFUs were presumptively identified according to color and texture patterns. These colonies were stored at -2 °C into Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (KASVI[®], Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratórios Ltda, Curitiba, Brazil) supplemented by glycerol (40% v/v), into cryotubes (2 mL).

PCR identification

The gold standard for *Candida* identification was the molecular fingerprinting. For this, PureLink[™] Genomic DNA extraction kit (Invitrogen, USA) was used to extract DNA from samples as briefly described:

Lysis Buffer preparation

It was prepared by addition of 1M Tris-HCl to 20 ml of distilled water and the pH adjusted to 8.0. After, 0.5 g of sodium dodecylsulfate (SDS), 1.4g NaCl and 0.73g EDTA buffer were added and completing with 80 ml of water.

Lysis of the organisms (*Candida spp.*)

Initial cultivation was conducted in Sabouraud dextrose agar in petri dishes at 37 ° C for 48 hours. After, 100mg of yeast cells was picked up with inoculation handle aid and transferred to 2.0 mL microtubes and maintained at -20 °C overnight. Then, 500 µl of lysis buffer (heated to 37 °C until completely translucent) and 5 µLof 2-mercaptoethanol were added to the samples. The tubes were vortexed for 4 min, and incubated in dry bath at 65 °C for 1 hour, for 30 minutes (Heat & Cool Dry Bath Shaker, Loccus Biotechnology). After, 20 µLof RNase was added and mixed by vortexing and incubated at room temperature for 2 minutes. Another 200 µLof the Lysis Buffer were added and mixed by vortexing;

followed by addition of 200 μ L of PA 96-100% ethanol to the lysate and mixed by vortex for 5 seconds.

DNA Purification

The added ethanol was 96-100% per 1 and 2. Washing Buffer was mixed and stocked at room temperature. Then samples were removed from the columns and placed in sterile collection tubes. Approximately 640 μ L of the lysate were added to the column, centrifuged at 10,640 rpm for 1 minute at room temperature and discarded the fluid tube, placing the column back.

DNA Washing

500 μ L of Buffer 1 was added to wash the column with ethanol, centrifuged at 10,640 rpm for 1 minute and discarded the fluid of the tube. Then, 500 μ L of Wash Buffer 2 were added to the column, centrifuged at maximum speed (15,000 rpm) for 3 minutes at room temperature and the liquid discarded.

DNA Elution

The column was removed and placed in another sterile tube. Then, 100 μ L of elution buffer were added to the column and incubated at room temperature for 1 minute, centrifuged at maximum speed for 1 minute and stocked at room temperature (Tube 1). The column was then placed into another tube (tube 2) and the elution step was repeated. Steps 3 and 4 were repeated in the tube 2 the column was removed and discarded. Purified DNA was frozen at -20 °C.

PCR reaction

The amplification reaction was performed with a final volume of 50mL containing 100ng of DNA, 1X buffer, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM dNTP's, 1 μ L of each primer and 5U Taqplatinum DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The conditions for carrying out this PCR were: initial denaturation 95 °C for 5 minutes, 40 denaturing cycles of 95 °C for 30s, annealing 60°C for 30 seconds, extension at 72 °C for 30 s and final extension at 72 °C for 7 minutes, followed by cooling to 4 °C.

Species identification of *Candida spp.* was determined from the primer ACT1-f (TGCTGAACGTATGCAAAAGG) and ACT1-r (TGAACAATGGATGGACCAGA) (Exxtend Biotechnology Ltd., Brazil), which is a constitutive primer specific for the species *Candida albicans* and from primer HWP1-f (TCTACTGCTCCAGCCACTGA) and HWP1-r (GTGGAATGGAAGCTTCTGGA) (Exxtend Biotechnology Ltd, Brazil), which primer is not specific for *Candida* species (11). PCR assays 186pb generate amplification products for *C. albicans* (ACT1) and not for *C. albicans* 226pb (HWP1).

The thermocycling consisted of an initial denaturation cycle at 95 °C for 2 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 seconds, primer annealing at 58 °C for 30s, and primer extension at 72 °C for 30s. A final primer extension at 72 °C for 2 min was performed, followed by cooling to 4 °C.

Electrophoresis

Samples were run on agarose gel prepared with 2% Tris-base buffer + Boric acid + EDTA (TBE) diluted in water, adjust pH. The run was carried out for 50 min at 80W.

Antifungal susceptibility test by microdilution

Inoculum preparation

The samples of each identified species were activated in sterile falcon tubes containing 5 mL of SBS and cultivated at 37°C for 48 hours. The concentration of *Candida* employed was 5×10^6 UFC/mL (12).

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by microdilution

Candida inoculums were diluted to final concentration of 5.0×10^3 UFC/mL and placed into 96 wells microplates (Global Plast[®], Monte Alto-SP, Brazil). The collums 1, 2, 3 were used to evaluated the action of Amphotericin B (Sigma Aldrich[®], Saint Louis, USA) (320 µg/mL) (13) and collums 4, 5, and 6 to Nystatin (Dilecta, João Pessoa-PB, Brazil) (256 µg/mL) (14). The collums 8 and 9 were reserved to sterile and growth control respectively. Amphotericin B was diluted in filtered DMSO and Nystatin in distilled water to achieve the initial concentrations.

In each well, 100 µL of SDB (KASVI[®], Kasv Imp e Dist de Prod p/ Laboratórios Ltda, Curitiba, Brasil) were placed. In the next step, 100 µL of evaluated antifungal drugs were added to the first well and serially diluted. After his process the inoculum was placed in a final concentration of 80 µg/mL for Amphotericin B and 64 µg/mL for Nystatin. The microplates were incubated at 37°C for 48 hours. After t, 50 µL of TCT (Triphenyl Tetrazolium Chloride) dye (Sigma-Aldrich[®], Saint Louis, USA) were dropped in each well. Then, microplates were incubed for 24 hs before reading at through spectrophotometer (Glomax[®]-Mult, Promega, Ltda, Brazil's Biotechnology)(15). The MIC corresponded to the lowest drug concentration capable of inihibiting *Candida* growth. The reference values to Nystatin MIC were ≤ 4 µg/mL for sensitive isolates, and ≥ 64 µg/mL for resistant isolates (16). For Amphotericin B, susceptibility was found to be < 1 µg/mL, and resistance > 2 µg/mL (10). *C. albicans* (ATCC 10221), *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. glabrata* (ATCC 2001) and *C. krusei* (ATCC 34135) were used as reference strains, The results of the MIC obtained from the reference samples was MIC < 4 mg / mL and > 2 / mL, for Nystatin, and CIM ≤ 2 mg / mL, for Amphotericin B.

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using the software SPSS 17.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA), using Chi-Square and Exact Fisher Test. The confidence interval was calculated with level of significance of 0.05.

Results

General Data of ALL/Control Groups

The mean age of both groups was 10.11 yrs (ranging to 2 from 19 yrs-old). The mean age of case group was 8.1 (± 5.11) and control group was 8.2 (± 4.58). Referring to gender, 34 (42.5%) were males and 46 (57.5%) females, considering both groups. In both groups, none of the individuals presented suggestive lesions of oral candidosis. The mean DMFT of groups was 2.04 and dmft was 1.25. The matched and other variables evaluated in both groups are placed on Table 1. Of 40 patients evaluated in ALL group, 13 (32.5%) were positive to *Candida*, against only 1 (2.5%) subject in control group. The positivity to *Candida* was higher in case group compared with control ($p < 0.001$).

The descriptive analysis of *Candida* colonization of groups is detached on Table 2. CHROMagar *Candida*TM suggested the isolation of 8 strains of being *C. albicans* (61.5%) being one collected from control group, followed by *C. glabrata* in five strains (35.7%), *C. krusei* in one patient and in one control subject (14.3%) and one strain of *C. tropicalis* (7.1%). According to data obtained by PCR fingerprinting, however, it was determined to be a *C. albicans* colony detected in 14 samples (87.5%), while only in 2 (12.5%) samples the *Candida* isolate was identified as being non *albicans*. Of these positive patients to *Candida*, 7 (53.8%) were in induction/ reinduction/ consolidation therapy and 6 (46.2%) in maintenance phase. Eight (61.5%) ALL patients with positive *Candida* detection were under the use of systemic steroids at the moment of sampling. Moreover, 2 (5%) individuals were under the use of nystatin and/or amphotericin B to systemic candidosis but without any oral signs of infection. All patients who had 10^3 CFU/mL counts were on the induction phase of chemotherapy.

Considering age strata, gender, treatment phase, haematological variables and OAG indicators, we only found an association between presence of mucositis and positivity to *Candida* ($p = 0.017$). The results of these associations or lack of them were placed on Table 3. The Table 4 describes the results of microdilution assay and resistance/susceptibility protocol to the employed antifungal drugs. It was found that five out 14 strains of *C. albicans* (35.7%) were resistant to Nystatin

and all species were not susceptible to Amphotericin B. All reference strains (ATCC) were susceptible to Nystatin and Amphotericin B at the same experimental conditions.

Discussion

The infant-juvenile cancer, comprising children and adolescents between 0 and 19 years-old, corresponded to 1% to 3% of malignant tumors in the world (17). ALL affects children of all ages, with peak incidence normally happening between two and five years old, with a slight predominance of males (18). Subramaniam et al., 2008 (19) showed that oral manifestations of ALL were distributed in 37 male gender (63.8%) and in 21 females (36.2%). Our study showed slight predilection of ALL for female gender although our focus was not a populational survey of the disease. In the present study, we could see some variation in age from 2 years to 19 years of age, with an average of 10.11 years, being the age of 4 years-old more prevalent in the case group, in agreement with a previous survey (18).

It is extremely important to undergo the dental treatment in children and adolescents when necessary, especially in pediatric oncology patients, who should have their treatment started as soon as they are subjected to chemotherapy (20). A study with 78 hospitalized children noted the prevalence of dental caries, plaque index and the presence/absence of soft tissue lesions. The means of the dmft and DMFT were 3.91 and 1.21, respectively, plaque index was high and dental abscesses were the most common lesions of soft tissues in the oral cavity (21). Pels et al (22), intended to evaluate the oral health status in children with ALL during treatment. They analyzed 78 children with ALL and 78 healthy children. The authors found that oral hygiene of children with ALL was significantly better than children in the control group, corroborating our findings with similar good results to normative oral conditions. The rates of dmft/DMFT used as reference were the epidemiological survey conducted in Brazil, SBBrazil, in 2010. Both groups had similar access to dental care without any considerable sociodemographic differences (23).

A longitudinal study made by Williams and colleagues (24) found oral candidosis in 10% of patients and the presence of the disease was related to the low salivary flow caused by cancer chemotherapy and the reduced number of neutrophils. Alberth et al. (3) evaluating the presence of microbiological changes in oral cavity from children diagnosed with cancer, it was found that in 45 oral cultures performed during neutropenic episodes, 38 (84.4%) proved to be positive, and fungi species were more frequently isolated. Of the 30 patients, 23 (76.7%) developed moderate to severe neutropenia, thus presenting oral fungi. Curiously, our study showed a lack of association between *Candida* colonization and hematological parameters. Indirectly, we could infer the value of neutrophils from whole values of leukocytes. Other study comparing the eight ALL patients who had candidemia with 18 ALL control patients revealed that previous bacteremia, prolonged neutropenia, prolonged fever, prolonged administration of antimicrobial agents, treatment with multiple antimicrobial agents, and a relatively high concentration of *Candida* organisms in stool were significant risk factors for candidemia. However, in a logistic regression analysis only administration of vancomycin and/or imipenem was identified as an independent risk factor for candidemia (25). Local factors could be determinant to oral *Candida* colonization and even more important than systemic factors.

We used CHROMagar *Candida* to presumptively identify *Candida species*. Pires et al., in 2015, assessed the compliance of three methods of identification for *Candida* species in the oral cavity, the API 20C AUX, CHROMagar *Candida* and PCR-RAPD (OPE-18). The medium CHROMagar *Candida* showed significant accuracy for species of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* and *C. krusei* compared to PCR-RAPD (OPE-18) (26). However, in our study, molecular fingerprinting identification was used as gold standard revealing some different results. A study conducted in 2004 by Bujdaková et al. (27), evaluated 19 clinical strains of HIV-positive patients using several methods to identify the species as well as the 20C AUX API, CHROMagar *Candida* and the germ tube test, all of which complemented by PCR identification. The authors concluded that the use of the conventional method showed that determination is markedly influenced by personal assessment, suggesting the need to use a combination of different tests to obtain correct results. To discriminate between certain species it was

recommended to adopt a combination of CHROMagar *Candida*, followed by germ-tube test and PCR. Pfaller et al., in 2012 (28), also found that molecular methods for the identification of fungi are an important addition to the conventional identification of some yeasts including *Candida* species.

C. albicans was the most prevalent strain in the ALL group. Sánchez-Vargas et al. (29) evaluated yeasts isolated from the oral cavity of 111 immunocompromised patients and found that *C. albicans* was the most isolated species (83.5%) whereas non albicans species (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) were isolated from 16.5% of colonized patients.

Other interesting result was the higher counting of *Candida* associated with the induction phase of chemotherapy. Probably, induction phase reduces inflammatory response, even on salivary level, favoring *Candida* colonization (30). As previously showed, induction phase had more association of oral complications (22) but even in maintenance phase. The association between the absence of candidosis and mucositis was evident. A study conducted in 2012 by Mendonça et al. (31) evaluated the association of HSV-1, *Candida* and oral microbiota on the severity of oral mucositis in children with ALL. The authors observed correlation with mucositis and the presence of HSV and *Candida*. Panghal et al., in 2012 (32) also found the association between oral mucositis and fungal infection by *C. albicans*.

It is important to carry out antifungal susceptibility testing because of the resistance of *Candida* strains to certain drugs. In this study, most of the samples showed higher MIC (≥ 64 $\mu\text{g/mL}$) for nystatin, while amphotericin B showed values ranging from 40 $\mu\text{g/mL}$ to 2.5 $\mu\text{g/mL}$. Wingeter et al., 2007 (33) found that 95% of their isolates were inhibited by up to 4 $\mu\text{g/mL}$ for Nystatin and Amphotericin B lower than 1 $\mu\text{g/mL}$ for majority of species. However, resistance of *Candida* species to antifungal drugs are a real problem. For example, a study with six out of nine children with ALL, fungal infection was progressive despite intravenous antimycotic therapy. The high percentage (21%) of death from invasive fungal infection among lethal infections in paediatric ALL patients illustrates the relevance of fungi in this group of patients (34).

In conclusion, *Candida* colonization was associated with ALL probably by vinculated to mucositis events being the higher colony counts found on induction phase of chemotherapy. *Candida albicans* was the prevalent strain and resistance to Nystatin and Amphotericin B was found. PCR fingerprinting could be used as definitive method to identify *Candida* species in addition to presumptive identification.

References

1. Costa SS, Silva AM, Macedo IAB. Conhecimento de manifestações orais da Leucemia e protocolo de atendimento odontológico. Rev Odontol Univ São Paulo. 2011; 23: 70-80.
2. Javed F, Utreja A, Bello Correa FO, Al-askar M, Hudieb M, Qayyum F, Al-rasheed A, Almas K., Al-hezaimi K. Oral health status in children with acute lymphoblastic leucemia. Crit Rev OncolHematol. 2012; 83 (3): 303-309.
3. Alberth M, Majoros L, Kovalecz G, Borbás E, Szegedi I, Márton J, Kiss C. Significance of oral *Candida* infections in children with cancer. PatholOncol Res. 2006; 12 (4): 237-241.
4. Gomes MF, Kohlemann KR, Plens G, Silva MM, Pontes EM, da Rocha JC. Oral manifestations during chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia: a case report. Quintessence Int. 2005; 36 (4): 307-313.
5. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009; 52: 467-475.
6. Shu M, Ellepola ANB, Samaranayake LP. Effects of two different growth media on the postantifungal effect induced by polyenes on *Candida* species. J. clin. Microbiol. 2001; 39: 2732-2735.
7. Monteil RA, Madinier I, Le Fichoux Y. In vitro antifungal resistance of oral *Candida albicans* strains in non-AIDS patients. Oral Microbiol. Immunol. 1997; 12: 126-128.
8. Cheng KKF, Chang AM, Yuen MP. Prevention of oral mucositis in paediatric patients treated with chemotherapy: a randomised crossover trial comparing two protocols of oral care. European Journal of Cancer. 2004; 40 (8): 1208-1216.
9. Biondi A. EsPh ALL experience BFM oriented chemotherapy backbone eand Imatinibe. International BFM 21stAnnual Meeting. October 2-4, 2010. Antalya (Belek), Turkey.
10. Assaf AV. et al. Comparison of reproducibility measurements for calibration of dental caries epidemiological surveys. Cad. Saúde Pública. 2006; 22 (9): 1901-1907.
11. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 55:611-622.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2002; M27-A2. 3rd.ed. Wayne, Pa, USA.
13. Majewski M, Aguiar RB, Oliveira JR, Jorge AOC. Atividade antifúngica do fluconazol e da anfotericina B em cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV-positivos. XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. 2011.
14. Castro RD, Lima EO. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. Rev. Bras. Pl. Med. 2011; 13 (2): 203-208.
15. Deswal DP, Chand V. Standartization of the tethazolium test for viability estimation in recebean (*Vigna umbellata* T.) Seed Science and Technology. 1997; 25 (1): 409-417.

16. Pádua RAF, Guilhermetti E, Svidzinski TIE. In vitro activity of antifungal agents on yeasts isolated from vaginal secretion. *Acta Scientiarum Health Sciences*. 2003; 25: 51-54.
17. Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, 2014.
18. Li CR, Chik KW, Ha SY, Lee ACW, Yuen HL, Ling SC, Lee V, Chan GCF, Shing MMK, Chan LC, NG MHL. Improved outcome of acute lymphoblastic leukaemia treated by delayed intensification in Hong Kong children: HKALL 97 study. *Hong Kong Med J*. 2006; 12: 33-39.
19. Subramaniam P, Babu KL, Nagarathna J. Oral manifestations in acute lymphoblastic leukemic children under chemotherapy. *J Clin Pediatr Dent*. 2008; 32: 319-324.
20. Camargo AM. O tratamento pediátrico oncológico, suas complicações orofaciais e prevenção. Monografia de Especialização. São Paulo: Associação Brasileira de Ensino Odontológico; 2001.
21. Amaral TMP et al. Effect of salivary stimulation therapies on salivary flow and chemotherapy-induced mucositis: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012; 113 (5): 628-637.
22. Pels E, Mielnik BM. Oral hygiene in children suffering from acute lymphoblastic leukemia living in rural and urban regions. *Ann Agric Environ Med*. 2012; 19: 529-533.
23. Ministério da Saúde (BR). Coordenação Geral de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – resultados principais. Brasília (DF), 2010b.
24. Williams MC, Martin MV. A longitudinal study of the effects on the oral mucosa of treatment for acute childhood leukaemia. *Int J Paediatr Dent*. 1992; 2: 73-79.
25. Richett HM, Andrement A, Tancredem C, Pico JL, Jarvis W.R. Risk factors for candidemia in patients with acute lymphocytic leukemia. *Rev Infect Dis*. 1991; 13 (2): 211-215.
26. Pires EG, Freitas EM, Bonan PRF, Nobre SAM. Agreement between RAPD, API20C AUX, CHROMagar *Candida* and microculture on oral *Candida* identification. *Braz J Oral Sci*. 2015; 14 (2).
27. Bujdáková H, Melkusová S, Soji I, Mokrás M, Mikami Y. Discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolated from HIV-positive patients by using commercial method in comparison with PCR assay. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004; 49(4): 484-90.
28. Pfaller MA, Woosley LN, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Significance of molecular identification and antifungal susceptibility of clinically significant yeasts and moulds in a global antifungal surveillance programme. *Mycopathologia*. 2012; 174 (4): 259-27
29. Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JN, Cashat-Cruz M, Lopez-Ribot JL, Gaitán-Cepeda LA, Quindós G. Point prevalence, microbiology and susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2005; 22: 83-92.

30. Pedrosa F, Lins M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2002; 2 (1): 63-68.
31. Mendonça RM, Araújo M, Levy CE, Morari J, Silva RA, Yunes JA et al. Prospective evaluation of HSV, *Candida spp.*, and oral bacteria on the severity of oral mucositis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. Support Care Cancer. 2012; 20: 1101-1107.
32. Panghal M, Kaushal V, Kadayam S, Yadav JP. Incidence and risk factors for infection in oral cancer patients undergoing different treatments protocols. BMC Oral Health. 2012; 12 (22).
33. Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE. Microbiological identification and in vitro sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2007; 40 (3): 272-276.
34. Grigull L, Beier R, Schrauder A, Kirschner P, Loening L, Jack T, Welte K, Sykpra KW, Schrappe M. Invasive fungal infections are responsible for one-fifth of the infectious deaths in children with ALL. Mycoses. 2003; 46 (11-12): 441-446.

Table 1. Descriptive analysis of case and control groups according some variables (n=80)

VARIABLES		ALL	CONTROL	P value
STRATIFIED AGE	up to 6 yrs	19 (46,3%)	22 (53,7%)	0.502 ^a
	above 6 yrs	21 (53,8%)	18 (46,2%)	
GENDER	male	17 (50%)	17 (50%)	1.000 ^a
	female	23 (50%)	23 (50%)	
DMFT (Permanent/Deciduos)	under reference	34 (58,6%)	24 (41,4%)	0.012 ^a
	over reference	6 (27,3%)	16 (72,7%)	
Candida Colonization	negative	27 (67,5%)	39 (32,5%)	0.001 ^b
	positive	13 (92,9%)	1 (7,1%)	

^a Chi- square Pearson Test

^b Fisher Exact Test

Table 2. Description of quantification and presumptive species found in case and control groups.

Patient Code	Chemotherapy Phase	Quantification (UFC/mL)	Species Identification
1	Induction	2.2 x 10 ³	<i>Candida albicans</i>
2	Induction	66	<i>non albicans</i>
3	Maintenance	400	<i>Candida albicans</i>
8	Maintenance	33	<i>Candida albicans</i>
12	Maintenance	33	<i>non albicans</i>
19	Induction	233	<i>Candida albicans</i>
21	Maintenance	66	<i>Candida albicans</i>
22	Induction	1.4 x 10 ³	<i>Candida albicans</i>
30	Induction	1.3 x 10 ³	<i>Candida albicans</i>
34	Maintenance	300	<i>Candida albicans</i>
36	Maintenance	33	<i>Candida albicans</i>
39	Induction	766	<i>Candida albicans</i>
40	Induction	6.6 x 10 ³	<i>Candida albicans</i>
1*	Control Case	33	<i>Candida albicans</i>

Table 3. Evaluation of crossing between positiveness condition to *Candida* colonization and some variables on case group (n=40).

VARIABLE		POSITIVE	NEGATIVE	P
STRATIFIED AGE	up to 6 yrs	8 (42.1%)	11 (57.9%)	0.217 ^a
	above 6 yrs	5(23.8%)	16(76.2%)	
GENDER	Male	7 (41.2%)	10 (58.8%)	0.314 ^a
	Female	6 (26.1%)	17 (73.9%)	
ERYTHROCYTES	under reference	12 (35.3%)	22 (64.7%)	0.351 ^b
	Normal	1 (16.7%)	5 (83.3%)	
LEUKOCYTES	leukopenia	5 (22.7%)	17 (77.3%)	0.145 ^a
	Normal	8(44.4%)	10(55.6%)	
NEUTROFILS	under reference	9 (34.6%)	17 (65.4%)	0.491 ^b
	Normal	4 (28.6%)	10 (71.4%)	
LYMPHOCYTE	lymphocytopenia	9 (39.1%)	14 (60.9%)	0.244 ^a
	Normal	4(23.5%)	13 (76.5%)	
PLATELETS	thrombocytopenia	5 (35.7%)	9 (64.3%)	0.750 ^a
	normal	8 (30,8%)	18 (69.,2%)	
MUCOSITIS	Absence	2(11.8%)	15(88.2%)	0.017 ^b
	Presence	11 (47,8%)	12 (52.2%)	

XEROSTOMIA	Abscence	2 (25%)	6 (75%)	0.479 ^b
	Presence	11 (34.4%)	21 (65,6%)	
CHEMOTHERAPY	Induction	7 (29.2%)	17 (70,8%)	0.581 ^a
PHASE	Maintenance	6 (37.5%)	10 (62.5%)	
DMFT	under reference *	10 (29.4%)	24(70.6%)	0.293 ^b
Dmft		3 (50%)	3 (50%)	
	over reference *			

* SB Brazil, 2010

^a Chi- square Pearson Test

^b Fisher Exact Test

Table 4. MIC values found on presumptive identified species of *Candida*.

DRUG	CONCENTRATION	<i>Candida</i>	
		<i>albicans</i>	<i>non albicans</i>
NYSTATIN	>64 µg/mL	5	1
	64 µg/mL	4	--
	32 µg/mL	3	--
	16 µg/mL	1	1
	8 µg/mL	1	--
AMPHOTERICIN B	>80 µg/mL	--	--
	80 µg/mL	--	--
	40 µg/mL	1	--
	20 µg/mL	7	1
	10 µg/mL	3	--
	5 µg/mL	1	--
	2.5 µg/mL	2	1

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Há poucos trabalhos que lidam diretamente com a compreensão do perfil clínico epidemiológico da colonização de *Candida*, em pacientes pediátricos com leucemia linfocítica aguda. A candidose é muito frequente em pacientes pediátricos com neoplasias principalmente em períodos de imunossupressão grave e neutropenia. O paciente pode desenvolver infecção generalizada e em casos mais graves, morrer. Por isso, é fundamental compreendermos como se dá a colonização e qual é o perfil de susceptibilidade/resistência a *Candida* nesses pacientes. Isso possibilitará haver entendimento das etapas da doença e sugerir tratamentos mais específicos e eficazes.

Além disso, torna-se necessário identificar as espécies de *Candida* que colonizam esses pacientes através de testes microbiológicos e outros testes complementares, dessa forma pode-se criar um perfil de colonização por *Candida* em pacientes imunossuprimidos e sua resistência/sensibilidade ao tratamento.

4. CONCLUSÃO

A colonização por *Candida* foi associada a LLA e vinculadas a mucosite sendo as contagens mais elevadas encontradas em fase de indução da quimioterapia. *C. albicans* foi a cepa predominante e a resistência e falta de susceptibilidade à Nistatina e Anfotericina B foram observadas. O PCR deve ser o padrão definitivo para a identificação dessas espécies.

5. REFERÊNCIAS

1. Costa SS, Silva AM, Macedo IAB. Conhecimento de manifestações orais da Leucemia e protocolo de atendimento odontológico. Rev Odontol Univ São Paulo. 2011; 23: 70-80.
2. PINHEIRO, R.S. Prevalência de *Candida spp.* na saliva de crianças com leucemia e a influência da lactoferrina na expressão de genes relacionados com a formação de biofilme. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.
3. Javed F, Utreja A, Bello Correa FO, Al-askar M, Hudieb M, Qayyum F, Al-rasheed A, Almas K., Al-hezaimi K. Oral health status in children with acute lymphoblastic leucemia. Crit Rev OncolHematol. 2012; 83 (3): 303-309.
4. Alberth M, Majoros L, Kovalecz G, Borbás E, Szegedi I, Márton J, Kiss C. Significance of oral *Candida* infections in children with cancer. PatholOncol Res. 2006; 12 (4): 237-241.
5. Gomes MF, Kohlemann KR, Plens G, Silva MM, Pontes EM, da Rocha JC. Oral manifestations during chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia: a case report. Quintessence Int. 2005; 36 (4): 307-313.
6. Ponce-Torres E, Ruíz-Rodríguez MS, Alejo-González F et al. Oral manifestations in pediatric patients receiving chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia. J ClinPediatr Dent. 2010; 34 (3): 275-279.
7. Myoken Y, Kyo T, Kohara T et al. Breakthrough fungemia caused by azole-resistant *Candida albicans* in neutropenic patients with acute leukemia. Clin Infect Dis. 2003; 36 (11): 1496-1497.
8. Wiley MJ et al. Invasive Fungal Disease in Pediatric Acute Leukemia Patients With Fever and Neutropenia During Induction Chemotherapy: A Multivariate Analysis of Risk Factors. Journal of Clinical Oncology. 1990; 8 (2): 280-286.
9. Pedrosa F, Lins M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. RevBras Saúde Matern Infant. 2002; 2 (1): 63-68.
10. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get. Blood. 2012; 120 (6): 1165-1174.
11. Kawedia JD, Liu C, Pei D et al. Dexamethasone exposure and asparaginase antibodies affect relapse risk in acute lymphoblastic leukemia. Blood. 2012; 119 (7): 1658-1664.
12. Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT et al. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. Leukemia. 2012; 26: 265-270.
13. Lima AG, Antequera R, Peres MP, Snitcosky IM, Federico MH, Villar RC. Efficacy of low-level laser therapy and aluminum hydroxide in patients with chemotherapy and radiotherapy-induced oral mucositis. Braz Dent J. 2010; 21: 186-192.
14. Hespanhol FL, Tinoco BEM, Teixeira HGC, Falabella MEV, Assis NMSP. Manifestações orais em pacientes submetidos à quimioterapia. Ciênc Saúde Coletiva. 2010; 15: 1085-1094.
15. Santos VI, Anbinder AL, Cavalcante ASR. Leucemia no paciente pediátrico: atuação odontológica. Ciênc Odontol Bras. 2003; 6: 49-57.

16. Lopes MA, Colleta RD, Alves FA, Abbade N, Rossi AJ. Reconhecendo e controlando os efeitos colaterais da radioterapia. Rev Assoc Paul Cir Dent. 1998; 52: 241-244.
17. Eelers J, Berger AM, Peterson MC. Development, testing, and application of the oral assessment. Oncol. Nurs. 1988; 15: 325–330.
18. Thein ZM, Seneviratne CJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Community lifestyle of *Candida* in mixed biofilms: a mini review. Mycoses. 2009; 52: 467-475.
19. Panghal M, Kaushal V, Kadayam S, Yadav JP. Incidence and risk factors for infection in oral cancer patients undergoing different treatments protocols. BMC Oral Health. 2012; 12 (22).
20. Shu M, Ellepola ANB, Samaranayake LP. Effects of two different growth media on the postantifungal effect induced by polyenes on *Candida* species. J. clin. Microbiol. 2001; 39: 2732-2735.
21. Monteil RA, Madinier I, Le Fichoux Y. In vitro antifungal resistance of oral *Candida albicans* strains in non-AIDS patients. Oral Microbiol. Immunol. 1997; 12: 126-128.

ANEXOS

Anexo A



Centro de Estudos Mário Kröeff

PARECER DO DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HNL

Avaliamos o Projeto de Pesquisa "COLONIZAÇÃO DE CÂNDIDA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIAS LINFOCÍTICAS E AGUDAS SOB QUIMIOTERAPIA E SUSCEPTIBILIDADE DE ESPÉCIES ENCONTRADAS A AGENTES ANTIFÚNGICOS", e, em nossa avaliação, o Hospital Napoleão Laureano poderá participar como instituição colaboradora do referido projeto; ressaltamos ainda que o projeto em questão não utilizará seres humanos e terá como coordenador o Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan - Deptº de Clínica e Odontologia Social-UFPB e Drª Andréa Gadelha como pesquisadora colaboradora..

Solicito parecer da direção geral do Hospital Napoleão Laureano quanto adequação do referido projeto às necessidades de rotina dessa instituição.

João Pessoa, 04 de fevereiro de 2014.

Igor Lemos Duarte
Dr. Igor Lemos Duarte
Pres. do CEMAK

Pres. da Comissão de Ética Médica do HNL

*Estamos de acordo, desde que o
proponente suscite o trabalho
fiscal para análise do CEMAK
antes de enviá-lo para pareceres*

1402-14
Pêlo: Vitoria
Cm: 1402-14
Cm: 1402-14

Anexo B

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE 																
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP																
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA																
Título da Pesquisa: Colonização de Candida em pacientes pediátricos com leucemias linfocíticas agudas sob quimioterapia e susceptibilidade de espécies encontradas a agentes antifúngicos																
Pesquisador: Larissa Cavalcanti Monteiro																
Área Temática:																
Versão: 1																
CAAE: 30267814.2.0000.5188																
Instituição Proponente: Centro de Ciência da Saúde																
Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO																
DADOS DO PARECER																
Número do Parecer: 706.409																
Data da Relatoria: 25/06/2014																
Apresentação do Projeto: Pesquisa que será desenvolvida pela pesquisadora Larissa Cavalcanti Monteiro, aluna de Pós Graduação (Mestrado) em Odontologia (Ciências Odontológicas), sob a orientação do Prof Paulo Rogério Ferretti Bonan.																
Objetivo da Pesquisa: Objetivos Gerais: Quantificar Candida em cavidade oral, identificar molecularmente as espécies envolvidas e avaliar a susceptibilidade dessas espécies a antifúngicos relacionando com a etapa do tratamento quimioterápico, regimes e os níveis de neutropenia em pacientes pediátricos com ALL.																
Objetivos Específicos: 1) Quantificar Candida em cavidade oral através de coletas com swabs de pacientes pediátricos com ALL. 2) Identificar presuntivamente as espécies de Candida obtidas. 3) Identificar molecularmente as espécies de Candida obtidas. 4) Relacionar nível de risco da ALL com quantificação e diversificação de espécies de Candida																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td colspan="4">Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N</td></tr><tr><td colspan="2">Bairro: CASTELO BRANCO</td><td colspan="2">CEP: 58.051-900</td></tr><tr><td>UF: PB</td><td>Município: JOÃO PESSOA</td><td colspan="2"></td></tr><tr><td>Telefone: (83)3218-7791</td><td>Fax: (83)3218-7791</td><td colspan="2">E-mail: eticacca@cca.ufpb.br; elienemduarte@hotmail.com</td></tr></table>	Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N				Bairro: CASTELO BRANCO		CEP: 58.051-900		UF: PB	Município: JOÃO PESSOA			Telefone: (83)3218-7791	Fax: (83)3218-7791	E-mail: eticacca@cca.ufpb.br; elienemduarte@hotmail.com	
Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N																
Bairro: CASTELO BRANCO		CEP: 58.051-900														
UF: PB	Município: JOÃO PESSOA															
Telefone: (83)3218-7791	Fax: (83)3218-7791	E-mail: eticacca@cca.ufpb.br; elienemduarte@hotmail.com														

Página 01 de 02

Continuação do Termo: 706/09

obtidas.

5)Relacionar fase de tratamento quimioterápico com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

6)Relacionar quimioterápicos empregados com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

7)Relacionar antibioticoterapia prévia com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

8)Relacionar neutropenia e seus níveis com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

9)Avaliar susceptibilidade e resistência a antifúngicos das espécies de Candida obtidas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Informamos que essa pesquisa risco mínimo para sua saúde, porque basicamente compreenderá uma coleta de saliva com swab em mucosas bucais de forma delicada. Havendo queixas de desconforto com a coleta, que é algo extremamente incomum, faremos a interrupção do procedimento.

Benefícios:

Candidose é muito frequente em pacientes pediátricos com neoplasias principalmente em períodos de imunossupressão grave e neutropenia. O paciente pode desenvolver infecção generalizada e em casos mais graves, morrer. Por isso, é fundamental compreendermos como se dá a colonização e qual é o perfil de susceptibilidade/resistência a Candida nesses pacientes. Isso possibilitará haver entendimento das etapas da doença e sugerir tratamentos mais específicos e eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância realizar-se-á em associação com o Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa/PB).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador anexou todos os itens de apresentação obrigatória

Recomendações:

Solicito a atualização do endereço do CEP:

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: eticacca@cca.ufpb.br; elienemduarte@hotmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
PARAÍBA - CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE



Continuação do Parecer: 706.409

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba Campus
I - Cidade Universitária - 1º Andar - CEP 58051-900 - João Pessoa/PB
(83) 3216-7791 - E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero a pesquisa aprovada.

Este é o meu parecer salvo melhor julzo.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

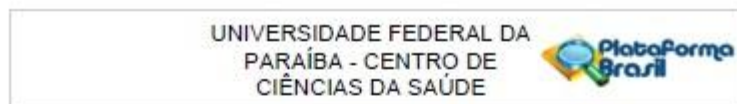
JOÃO PESSOA, 02 de Julho de 2014

Assinado por:
Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador)

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: eticaccs@ccs.ufpb.br, elianemduarte@hotmail.com

Página 02 de 03

Anexo C



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Colonização de Candida em pacientes pediátricos com leucemias linfocíticas agudas sob quimioterapia e susceptibilidade de espécies encontradas a agentes antifúngicos

Pesquisador: Larissa Cavalcanti Monteiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30267814.2.0000.5188

Instituição Proponente: Centro de Ciência da Saúde

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.360.759

Apresentação do Projeto:

Pesquisa que será desenvolvida pela pesquisadora Larissa Cavalcanti Monteiro, aluna de Pós Graduação (Mestrado) em Odontologia (Ciências Odontológicas), sob a orientação do Prof Paulo Rogério Ferretti Bonan.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos Gerais:

Quantificar Candida em cavidade oral, identificar molecularmente as espécies envolvidas e avaliar a susceptibilidade dessas espécies a antifúngicos relacionando com a etapa do tratamento quimioterápico, regimes e os níveis de neutropenia em pacientes pediátricos com ALL.

Objetivos Específicos:

- 1) Quantificar Candida em cavidade oral através de coletas com swabs de pacientes pediátricos com ALL.
- 2) Identificar presuntivamente as espécies de Candida obtidas.
- 3) Identificar molecularmente as espécies de Candida obtidas.
- 4) Relacionar nível de risco da ALL com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.
- 5) Relacionar fase de tratamento quimioterápico com quantificação e diversificação de espécies de

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3218-7791 Fax: (83)3218-7791 E-mail: etic@ccs.ufpb.br

Continuação do Parecer: 1.300.759

Candida obtidas.

6)Relacionar quimioterápicos empregados com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

7)Relacionar antibioticoterapia prévia com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

8)Relacionar neutropenia e seus níveis com quantificação e diversificação de espécies de Candida obtidas.

9)Avaliar susceptibilidade e resistência a antifúngicos das espécies de Candida obtidas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Informamos que essa pesquisa oferece risco mínimo para a saúde, porque basicamente compreenderá uma coleta de saliva com swab em mucosas bucais de forma delicada. Havendo queixas de desconforto com a coleta, que é algo extremamente incomum, faremos a interrupção do procedimento.

Benefícios:

Candidose é muito frequente em pacientes pediátricos com neoplasias principalmente em períodos de imunossupressão grave e neutropenia. O paciente pode desenvolver infecção generalizada e em casos mais graves, morrer. Por isso, é fundamental compreendermos como se dá a colonização e qual é o perfil de susceptibilidade/resistência a Candida nesses pacientes. Isso possibilitará haver entendimento das etapas da doença e sugerir tratamentos mais específicos e eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância realizar-se-á em associação com o Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa/PB).

Pesquisadora responsável solicita emenda visto que foi necessário adicionar um novo grupo de estudo a pesquisa (grupo controle) pois não tiveram resultados estatísticos suficientes apenas com os pacientes coletados em um grupo. A nova anuência foi dada pela diretora da Escola Municipal de Ensino Fundamental Santa Ângela na pessoa da diretora geral Sandra Moraes T. de Melo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Carta de anuência da solicitação de emenda anexada.

Recomendações:

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3218-7791 Fax: (83)3218-7791 E-mail: etic@ccs@ccs.ufpb.br

Continuação do Parecer: 1.300.759

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero esta emenda aprovada.

Este é o meu parecer, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_395117 ET.pdf	10/11/2015 20:56:05		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.jpg	10/11/2015 20:54:28	Larissa Cavalcanti Monteiro	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_300659.pdf	12/05/2014 21:24:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Corrigido.doc	02/05/2014 18:51:15		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_300659.pdf	09/04/2014 21:22:28		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto final.docx	09/04/2014 21:21:11		Aceito
Outros	TermoAssent.doc	09/04/2014 21:20:15		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	09/04/2014 21:17:45		Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.jpg	09/04/2014 21:12:33		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	digitalizar0004.jpg	03/04/2014 16:30:25		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer laureano.jpg	03/04/2014 16:29:40		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: etic@ccs@ccs.ufpb.br