KARIN HITOMI ISHIKAWA

**Utilização de probióticos para o controle da prevalência de *Candida* oral em
pacientes edentados totais**

São Paulo
2011

KARIN HITOMI ISHIKAWA

**Utilização de probióticos para o controle da prevalência de *Candida* oral em
pacientes edentados totais**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientador: Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Ishikawa, Karin Hitomi

Utilização de probióticos para o controle da prevalência de *Candida* oral em pacientes edentados totais : [versão corrigida] / Karin Hitomi Ishikawa; orientador Atlas Edson Moleros Nakamae. -- São Paulo, 2011.

151p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Prótese Dentária. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida de acordo com sugestões da Banca Examinadora em 30/01/2012.

1. *Candida* – Prevalência. 2. *Lactobacillus*. 3. Probióticos. 4. Boca – Microbiologia. 5. Estomatite sob prótese. 6. Prótese total. 7. Edentados. I. Nakamae, Atlas Edson. II. Título.

Ishikawa KH. Utilização de probióticos para o controle da prevalência de *Candida* oral em pacientes edentados totais. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

À INGRID

Minha querida filhinha, amor da minha vida e razão de todo meu esforço.

Foram muitos momentos em que eu me ausentei para desenvolver este trabalho e, mesmo tão pequenina, você compreendeu que era necessário.

Você é minha companheira, meu anjinho e minha maior alegria.

Você é o presente mais precioso que Deus me deu!

À MINHA MÃE

Foi a grande responsável que propiciou a realização deste sonho, pois cuidou da Ingrid com muita dedicação, carinho e amor, para que eu pudesse fazer a Pós-graduação da forma como fiz.

Com certeza, eu só cheguei até aqui, pois tive o seu apoio, paciência e dedicação.

Te amo, Mãe!

À MINHA FAMÍLIA

Meus irmãos: Katty, Cyntia, Cristiane, Julio e Marcelo.

Meus avós: Iyoko, Setsuo, Fumiko e Francisco.

Meus sobrinhos: Ágatha e Duduzinho

Por torcer por mim e por me amar!

Obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae

meu orientador

Pela oportunidade de participar da equipe da Prótese Total, desde a época da monitoria, Iniciação Científica e estágio.

Por acreditar na minha capacidade e pela oportunidade de fazer a Pós-Graduação, Doutorado Direto.

Pela confiança e incentivo, que me motivou a trilhar por este caminho.

Pela orientação, que sempre me faz refletir e te admirar pela sua inteligência.

Pelo respeito e profissionalismo, que tomo como exemplo a ser seguido.

Pela amizade e carinho, sempre com uma palavra ou um gesto demonstrando seu amor por seus orientados.

Por contribuir ativamente da minha formação acadêmica, participando de cada etapa desse meu crescimento.

Sou imensamente grata por tudo!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. Matsuyoshi Mori

Meu primeiro orientador

Pela oportunidade de ter aceitado ser meu orientador, no Programa de Pós-Graduação, em 2008.

Pela amizade, sempre prestativo e bem humorado.

Obrigada!

À Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula

Por me receber de braços abertos no Laboratório de Leveduras Patogênicas, ICB-USP, para que eu pudesse realizar a parte experimental de laboratório.

Pela parceria e contribuição para minha pesquisa e de outras, que fazem parte da nossa linha de pesquisa.

Pela atenção e amizade.

Pela oportunidade que tive de apresentar parte deste trabalho no Congresso de Micologia em Atenas e de ir à Paris.

Obrigada!

Ao Prof. Dr. Eriques Gonçalves da Silva

Por ter me ensinado a rotina laboratorial de leveduras patogênicas.

Sempre solícito, disposto a ensinar, alegre e paciente.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, Departamento de Prótese e Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II, pela oportunidade de realização da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação da FOU SP – Ciências Odontológicas, Prof. Dr. Marcelo Bonecker e Prof. Dr. Antonio Carlos Bombana.

À Clínica Odontológica da FOU SP, Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha, responsável quando realizei a parte clínica do estudo e atual diretor da FOU SP.

À Disciplina de Prótese Total II, Profa. Dra. Regina Tamaki, pela oportunidade de realização da parte clínica da pesquisa.

Aos usuários de próteses totais, que participaram voluntariamente da pesquisa e permitiram a coleta das amostras.

À Profa. Tomie Toyota de Campos e Profa. Dalva Cruz Laganá, pelo apoio e oportunidades.

À Profa. Dra. Maria Cecília Milluzi Yamada, por compartilhar a sua sala conosco (eu, Tatinha e Prof. Atlas), pela amizade e pelos momentos de risos. A sua sala foi onde passei a maior parte do tempo estudando e aprendendo a fazer pesquisa.

Aos Profs. da Disciplina de Prótese Total: Prof. Atlas, Prof. Yamada, Prof. Vyto, Profa. Cecília, Profa. Regina, pela minha formação em Prótese Total.

Às secretárias da Pós-Graduação: Katia, Alessandra e Nair, pela atenção e ajuda.

Às secretárias do Departamento de Prótese: Sandra, Coraci, Marlete e Val, pela atenção e carinho.

Ao Luiz, Paula e Nenzinha, pela atenção e prestação de serviços na Total.

À Tatinha, minha querida amiga que está sempre do meu lado, literalmente; sempre disposta a colaborar.

Ao Victor e Eder, meus amigos queridos, que também sempre estão comigo e me ajudam quando preciso.

Aos amigos da Disciplina de Prótese Total: Flávio, Tati G., Roger, Carol, Danilo, Sanmy, Juliana, Jun e Vavá.

Às alunas da IC: Bruna, Adriana, Valéria, Tamyres, Giulia e Aline.

Aos colegas da Pós-Graduação e do ICB.

Ao Diego, meu querido amigo e prof. de inglês, pelo carinho, amizade e atenção; por me ensinar e ajudar a traduzir alguns textos.

Ao Carlos, meu querido amigo e confidente, que está sempre presente.

Ao Philip, também meu prof. de inglês, por me ajudar na tradução do resumo da tese.

Ao Gustavo, por fazer a estatística da tese.

À bibliotecária Glauci, por revisar a formatação da tese.

Aos meus amigos: Ana Claudia, Carlos, Juliana, Gisele, Wolber, Georgea, Vanessa, Monica, Marcos, Sofia, Florence, Samuel, Marco Tulio, Marcelo, Fabio, Fabrício, Telma, Ana, Marilza, Neli, Rita, Joyce, Bruno, Gin, Selma, Massao, Rosangela, Toshio, Marcia, Antonio, Terezinha, Mario, Rodolfo, Mirna, Claudia, por participarem desta fase da minha vida; por colaborarem direta ou indiretamente; pela amizade, incentivo e carinho.

À Profa. Dra. Bernadette Franco e ao Prof. Dr. Svetoslav Todorov (Slavi) pela essencial colaboração nos testes de bacteriocinas realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

À Controlbio, em especial à Maria José, Paula, Érika e Débora.

À Danisco e Future Ceuticals, pelo fornecimento das cepas de *Lactobacillus*.

À Farmácia Ananda, por manipular o bioproduto. Em especial à Luciane, farmacêutica.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

RESUMO

Ishikawa KH. Utilização de probióticos para o controle da prevalência de *Candida* oral em pacientes edentados totais [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão corrigida.

Probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde dos indivíduos, quando administrados em quantidades adequadas. Além de promoverem uma melhora no sistema gastrointestinal, os probióticos são conhecidos por sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. O presente trabalho objetivou avaliar a influência dos probióticos na redução da prevalência de *Candida* oral de indivíduos usuários de próteses totais. Para realização deste estudo foi elaborado o bioproduto contendo probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus*. O protocolo do estudo foi duplo-cego randomizado, sendo que os sujeitos da pesquisa foram divididos aleatoriamente em dois grupos: experimental (probióticos) e controle (placebo). Os participantes utilizaram o produto durante cinco semanas e o resultado foi avaliado segundo a contagem de leveduras isoladas em unidades formadoras de colônias (UFC/mL), antes e após a intervenção. Paralelamente, a esta fase clínica da pesquisa, foram testadas *in vitro* a ação de outras cepas de *Lactobacillus* com a finalidade de verificar a associação entre a cepa de *Lactobacillus* com a redução das espécies de *Candida* isoladas do palato e das próteses, bem como, com a sensibilidade aos antifúngicos, miconazol e nistatina. Também foi pesquisado um dos principais mecanismos de ação contra patógenos, por *Lactobacillus* spp, a produção de bacteriocinas. Os resultados inferem que as cepas de probióticos testadas: foram eficazes na redução da prevalência de *Candida* oral de usuários de próteses totais; *in vitro*, inibiram o crescimento de *Candida* sp, sendo *L. rhamnosus* Lr-32 a cepa com melhor resultado e não produzem bacteriocinas quando em contato com a levedura.

Palavras-chave: Probióticos. *Candida*. *Lactobacillus*. Estomatite sob prótese. Prótese Total.

ABSTRACT

Ishikawa KH. The use of probiotics for control of the prevalence of oral *Candida* in total edentulous patients [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão corrigida

Probiotics are live microorganisms that confer benefits to the health of an individual when administered in adequate amounts. In addition to promoting an improvement in a gastrointestinal system, the probiotics are known for their ability to inhibit the growth of pathogenic microorganisms. The present study sought to evaluate the capacity of probiotics strains in reducing the prevalence of oral *Candida* in denture wearers. For this study, the by-product was elaborated containing probiotics, such as *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus*. The study protocol was randomized, double-blind, being that the subjects of the research were randomly sorted into two groups: experimental (probiotics) and control (placebo). The participants utilized the product daily for five weeks and the result was evaluated according to the amount of yeasts isolated in colony-forming units (CFU), before and after the intervention. In parallel to this clinical phase, the action of other *Lactobacillus* strains were tested *in vitro*, with the purpose of verifying the relation between the strain of *Lactobacillus* and the reduction of *Candida* species isolated from the palate and the prostheses, as well as, with the sensitivity to antifungal agents, miconazole and nystatin. The production of bacteriocins is one of the main mechanisms of action by *Lactobacillus* spp. against pathogens, and was analysed. The results imply that the strains of tested probiotics: *in vivo*, were effective in reducing the prevalence of oral *Candida* for denture wearers; *in vitro*, inhibited the growth of *Candida* sp, being that *L. rhamnosus* Lr-32 was the best resulting strain, and the strains did not produce bacteriocins when in contact with yeast.

Keywords: Probiotics. *Candida*. *Lactobacillus*. Denture Stomatitis. Complete Denture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - Aplicação do bioproduto na parte interna da prótese total	52
Figura 4.2 - Coleta da amostra pelo método SWAB.....	55
Figura 4.3 - Coleta da amostra sendo colocada em solução salina	56
Figura 4.4 - Amostra após homogeneização em vortex	57
Figura 4.5 - Solução sendo semeada sobre ASD	57
Figura 4.6 - Colônias de <i>Candida</i> sp.	58
Figura 4.7 - Leveduras com tubo germinativo	59
Figura 4.8 - Presença de clamidoconídeo (1), hifas (2) e bastoconídeos (3)	61
Figura 4.9 - Assimilações de açúcares. A glicose (GLI) e melibiose (MEL) foram colocados os açúcares diretamente no meio	62
Figura 4.10 - Presença de fermentação por <i>Candida</i>	64
Figura 4.11 - Repique de 24 horas de <i>Lactobacillus</i> sp. em caldo de MRS Lactobacilli	65
Figura 4.12 - <i>Eppendorfs</i> contendo meio caldo de MRS Lactobacilli e cepas de <i>Lactobacillus</i> sp.....	66
Figura 4.13 - <i>Eppendorfs</i> colocados na parte interna da centrífuga (Centrifuge 5417C).	66
Figura 4.14 - Rotação da centrífuga em 14000 rpm por 10 minutos a 4°C	67

Figura 4.14 - Rotação da centrífuga em 14000 rpm por 10 minutos a 4°C	67
Figura 4.15 - Aquecimento a 80°C por 10 minutos.....	68
Figura 4.16 - Banho de água dos eppendorfs contendo o sobrenadante de <i>Lactobacillus</i>	68
Figura 4.17 - Placas de Petri preparadas por infusão de <i>Candida</i> , na concentração de 0,5 da escala	69
Figura 4.18 - Placa de Petri preparada com ASD e inóculo de <i>Candida</i> sp.	70
Figura 4.19 - Formação de halo de inibição, no controle positivo com <i>Listeria</i>	71
Figura 4.20 - <i>Eppendorfs</i> contendo sobrenadantes das culturas e que foram adicionados enzimas.....	72
Figura 4.21 - Enzimas utilizadas para o teste de sensibilidade de substâncias antagonísticas a proteases: alfa-amylase (Sigma), protease de <i>Streptomyces griseus</i> tipo XIV (Sigma), alfa-chymotrypsin de pâncreas bovino tipo II (Sigma) e proteinase K (Sigma).....	72
Figura 4.22 - <i>Eppendorfs</i> contendo os sobrenadantes com as enzimas incubados a 37°C por 2 horas	73
Figura 4.23 - Placas sendo preparadas para o teste de sensibilidade das substâncias antagonísticas à proteases	73
Figura 4.24 - Placa de Petri contendo meio ágar de MRS com infusão de <i>Lactobacillus</i>	75
Figura 4.25 - Recorte do meio com <i>Lactobacillus</i>	76
Figura 4.26 - Preenchimento das laterais com ASD.....	77
Figura 4.27 - Densimat para preparação do inóculo de <i>Candida</i>	78

Figura 4.28 - Possíveis resultados para este teste: não inibição, inibição parcial e inibição completa	78
Figura 4.29 - Preparo do inóculo e distribuição da suspensão sobre meio ágar Müller Hinton.....	79
Figura 4.30 - Medição da zona de inibição segundo método de difusão em ágar a partir de disco.....	80
Figura 5.1 - Fluxograma dos sujeitos da pesquisa	83
Figura 5.2 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por grupo	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Distribuição em número absoluto e relativo (%) dos sujeitos da pesquisa incluídos no grupo probiótico e placebo, quanto às variáveis: quantidade inicial de UFCs, gênero, etnia, grau de escolaridade, tipo de prótese, condição de higiene da prótese, tipo de alimentação, condição de saúde geral e/ou doenças, utiliza medicamentos, possui alergia, condição do intestino e se apresenta ardência bucal e boca seca ...	84-6
Tabela 5.2 - Distribuição de frequências das espécies de <i>Candida</i>	87
Tabela 5.3 - Média e desvio padrão das variáveis quantitativas.....	87
Tabela 5.4 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por grupo.....	89
Tabela 5.5 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por espécie de <i>Candida</i>	91
Tabela 5.6 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por UFC inicial, variáveis sócio-demográficas qualitativas e tipo e higiene da prótese.....	92-3
Tabela 5.7 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por doenças do paciente.....	94
Tabela 5.8 - Média e desvio padrão das variáveis quantitativas segmentados pelo sucesso ou não do tratamento.....	95
Tabela 5.9 - Resultados do modelo de regressão logística para o sucesso ou não do tratamento.....	96
Tabela 5.10 - Risco relativo do sucesso do tratamento entre pacientes tratados com probiótico e tratados com placebo.....	96
Tabela 5.11 - Distribuição de frequências da presença ou não de <i>C. albicans</i> segmentada por variáveis sócio-demográficas qualitativas e tipo e higiene da prótese.....	97

Tabela 5.12 -Distribuição de frequências da presença ou não de <i>C. albicans</i> segmentada por doenças do paciente.....	98
Tabela 5.13 -Distribuição de frequências da presença ou não de <i>C. albicans</i> segmentada por variáveis de saúde.....	99
Tabela 5.14 -Média e desvio padrão das variáveis quantitativas segmentados pela presença ou não de <i>C. albicans</i>	100
Tabela 5.15 -Risco relativo da presença de <i>C.albicans</i> entre pacientes com intestino preso e demais pacientes.....	100
Tabela 5.16 -Distribuição de frequências da UFC inicial segmentada por variáveis sócio-demográficas qualitativas e tipo e higiene da prótese.....	102
Tabela 5.17 -Distribuição de frequências da UFC inicial segmentada por doenças do paciente.....	103
Tabela 5.18 -Distribuição de frequências da UFC inicial segmentada por variáveis de saúde.....	104
Tabela 5.19 -Média e desvio padrão das variáveis quantitativas segmentados pela UFC inicial.....	105
Tabela 5.20 -Risco relativo de determinados valores de UFC inicial entre níveis de sexo e ardência bucal.....	105
Tabela 5.21 -Distribuição de frequências em número absoluto e relativo (%) das variáveis do estudo: origem da amostra, espécies de <i>Candida</i> e sensibilidade ao miconazol e nistatina.....	107
Tabela 5.22 -Distribuição em número absoluto e relativo da inibição completa de <i>Candida</i> pelas espécies de <i>Lactobacillus</i> testadas.....	107
Tabela 5.23 -Distribuição em número absoluto e relativo (%) da inibição completa de <i>Candida</i> segundo as espécies de <i>Lactobacillus</i> e a origem de onde foram isoladas a levedura, palato e prótese.....	108

Tabela 5.24 -Distribuição de frequências da variável de inibição completa de <i>Candida</i> segmentada pela espécie de lactobacilo e espécie de <i>Candida</i>	109
Tabela 5.25 -Distribuição de frequências da variável de inibição completa de <i>Candida</i> segmentada pela espécie de <i>Lactobacillus</i> e sensibilidade ao miconazol.....	109
Tabela 5.26 -Distribuição de frequências da variável inibiu ou não completamente a <i>Candida</i> segmentado pela espécie de lactobacilo e sensibilidade à nistatina.....	110
Tabela 5.27 -Valores p da comparação das probabilidades de inibição completa de <i>Candida</i> entre as cepas de lactobacilos baseados em um modelo logístico de equações de estimação generalizadas.....	112
Tabela 5.28 -Resultados do modelo logístico de equações de estimação generalizadas para a inibição completa ou não de <i>Candida</i>	112
Tabela 5.29 -Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de <i>Candida</i> por <i>L. acidophilus</i> HS101 varia de acordo com as variáveis: origem da mostra, espécie de <i>Candida</i> e susceptibilidade ao miconazol e nistatina.....	114
Tabela 5.30 -Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de <i>Candida</i> por <i>L. acidophilus</i> HS101.....	114
Tabela 5.31 -Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de <i>Candida</i> por <i>L. acidophilus</i> NCFM varia de acordo com as variáveis: origem da mostra, espécie de <i>Candida</i> e susceptibilidade ao miconazol e nistatina.....	115
Tabela 5.32 -Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de <i>Candida</i> por <i>L. acidophilus</i> NCFM.....	115
Tabela 5.33 -Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de <i>Candida</i> por <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 variou de acordo com as variáveis: origem da mostra, espécie de <i>Candida</i> e susceptibilidade ao miconazol e nistatina.....	116

Tabela 5.34 -Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de <i>Candida</i> pelo lactobacilo <i>L. rhamnosus</i> Lr-32.....	117
Tabela 5.35 -Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de <i>Candida</i> por <i>L. rhamnosus</i> Howaru varia de acordo com algumas variáveis: origem da mostra, espécie de <i>Candida</i> e susceptibilidade ao miconazol e nistatina.....	117
Tabela 5.36 -Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de <i>Candida</i> por <i>L. rhamnosus</i> Howaru.....	118
Tabela 5.37 -Distribuição de frequências da espécie de <i>Candida</i> segmentado pela origem da amostra.....	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ASD	ágar Sabouraud dextrose
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
BHI	<i>brain heart infusion</i>
<i>C.</i>	<i>Candida</i>
cm	centímetro
DUL	dulcitol
et al.	e colaboradores
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GLI	glicose
GRAS	geralmente reconhecido como seguro
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
IFN	interferons
Ig A	imunoglobulina A
Ig G	imunoglobulina G
IL- 4	interleucina 4
INO	inositol
KNO ₃	nitrato de potássio
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LAC	lactose
LGG	<i>Lactobacillus</i> GG
MAL	maltose
MEL	melibiose
mcg	micrograma
mg	miligrama
mL	mililitro
MRS	<i>deMan, Rogosa e Sharpe</i>
MYPG	<i>Malt, Yeast, Peptone e Glucose</i>
NaOH	hidróxido de sódio
NO	óxido nítrico

P. gingivalis *Porphyromonas gingivalis*

PCR reação em cadeia polimerase

PDT Terapia Fotodinâmica

pH potencial hidrogeniônico

PMAPs padrões moleculares associados ao patógeno

RAF rafinose

RAM raminose

rDNA ácido desoxirribonucleico ribossômico

rpm rotação por minuto

RRPs receptores de reconhecimento de padrões

S. mutans *Streptococcus mutans*

SAC sacarose

sp. espécie

spp. espécies

TER trealose

TGI trato gastro intestinal

TNF fator de necrose tumoral

UFC unidades formadoras de colônia

UI Unidades Internacionais

XIL xilose

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	porcentagem
α	alfa
γ	gama
™	<i>Trade mark</i>
®	<i>registered sign</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1 CANDIDA	30
2.1.1 Prevalência de <i>Candida</i>	30
2.1.2 Os fatores predisponentes do hospedeiro	33
2.1.3 Manifestações clínicas da doença	33
2.1.4 Placa dental – biofilme.....	34
2.1.5 Estomatite sob prótese.....	35
2.1.6 Fatores de Virulência do patógeno oportunista, <i>Candida</i>	36
2.1.6.1 Adesão	36
2.1.6.2 Morfogênese - capacidade de dimorfismo.....	37
2.1.6.3 Mudanças fenotípicas.....	37
2.1.6.4 Produção de exoenzimas - fosfolipase e proteinase	38
2.1.6.5 Mecanismos de defesa do hospedeiro	38
2.1.7 Tratamento.....	40
2.2 PROBIÓTICOS	41
2.2.1 Definição	41
2.2.2 Histórico.....	41
2.2.3 Gêneros e espécies.....	41
2.2.4 Seleção de bactérias probióticas.....	42
2.2.5 Mecanismos de ação dos probióticos.....	43
2.2.6 Benefícios	43
2.2.7 Probióticos na cavidade oral.....	44
2.2.8 Probióticos em alimentos.....	46
3 PROPOSIÇÃO	47
3.1 OBJETIVO GERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 ELABORAÇÃO DO BIOPRODUTO	51
4.2 APLICAÇÃO EM SERES HUMANOS	53

4.2.1 Critérios de exclusão e inclusão.....	53
4.2.2 Protocolo de intervenção	54
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS E CULTIVO.....	55
4.3.1 Processamento das amostras.....	56
4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CANDIDA	58
4.4.1 Tubo germinativo	59
4.4.2 Microcultivo em ágar fubá	60
4.4.3 Assimilação de carboidratos e nitrogênio (Auxanograma)	61
4.4.4 Fermentação de carboidratos (Zimograma).....	63
4.4.5 Técnica para diferenciação de <i>Candida dubliniensis</i> e <i>Candida albicans</i>	64
4.5 MECANISMO DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS: BACTERIOCINAS	65
4.6 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DE CEPAS DE <i>LACTOBACILLUS</i>	74
4.7 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS NISTATINA E NITRATO DE MICONAZOL.....	79
4.7.1 Preparação do inóculo.....	79
4.7.2 Execução do método de difusão em ágar a partir de disco segundo o documento M44-A (CLSI, 2004).....	80
4.7.3 Interpretação dos resultados do método de difusão em ágar a partir de disco.....	80
4.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS	81
5 RESULTADOS.....	82
5.1 APLICAÇÃO DOS PROBIÓTICOS EM SERES HUMANOS.....	83
5.1.1. Análise exploratória	84
5.1.2 Análise inferencial.....	88
5.1.2.1 Estudo do sucesso do tratamento	88
5.1.2.2 Estudo da presença ou não de <i>Candida albicans</i>	97
5.1.2.3 Quantidade de UFC	101
5.2 BACTERIOCINAS	105
5.3 AÇÃO ANTIFÚNGICA DOS PROBIÓTICOS: <i>LACTOBACILLUS</i> SP, TESTE <i>IN VITRO</i>	106
5.2.1. Análise exploratória	106
5.2.2 Análise inferencial.....	111

5.2.2.1 Avaliação das cepas de <i>Lactobacillus</i>	111
5.2.2.2 Avaliação segundo as variáveis: origem da amostra de <i>Candida</i> (palato ou prótese), espécie de <i>Candida</i> , sensibilidade ao miconazol e sensibilidade à nistatina.....	113
5.2.2.2.1 <i>L. acidophilus</i> HS 101.....	113
5.2.2.2.2 <i>L. acidophilus</i> NCFM.....	115
5.2.2.2.3 <i>L. rhamnosus</i> Lr-32.....	116
5.2.2.2.4 <i>L. rhamnosus</i> Howaru.....	117
5.2.2.3 Associação entre origem da amostra e espécie de <i>Candida</i>	119
6 DISCUSSÃO	120
6.1 APLICAÇÃO DOS PROBIÓTICOS EM SERES HUMANOS.....	121
6.1.1 Prevalência de <i>Candida</i> sp. em usuários de próteses totais.....	121
6.1.2 Quantidade de UFC de <i>Candida</i>	122
6.1.3 Descrição dos sujeitos da pesquisa e características de suas próteses totais.....	123
6.1.4 Sucesso do tratamento com probióticos: <i>L. rhamnosus</i> HS111 e <i>L. acidophilus</i> HS101.....	123
6.1.5 Mecanismo de ação dos probióticos.....	124
6.1.6 Associação entre o sucesso do tratamento e as espécies de <i>Candida</i> ..	126
6.2 AÇÃO ANTIFÚNGICA DE <i>LACTOBACILLUS</i> SP. PROBIÓTICOS, TESTE IN VITRO.....	127
6.2.1 <i>Lactobacillus</i> x <i>Candida</i>	128
6.2.2 <i>Lactobacillus</i> x inibição de crescimento de <i>Candida</i> com relação à origem de isolamento (palato ou prótese).....	129
6.2.3 <i>Lactobacillus</i> x inibição de crescimento de <i>Candida</i> com relação às espécies.....	131
6.2.4 <i>Lactobacillus</i> x sensibilidade aos antifúngicos: <i>miconazol</i> e <i>nistatina</i>	131
7 CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS	136
ANEXOS	147

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O indivíduo, desde o seu nascimento, passa por um processo contínuo de adaptação e readaptação da população de microrganismos, de acordo com a resposta imunológica do seu organismo. O desenvolvimento normal da microbiota inicia-se por um processo gradual, determinado por fatores externos como composição da microbiota materna, dieta, ambiente e aspectos genéticos (1). No entanto, qualquer alteração deste equilíbrio pode ocasionar em infecção, como acontece quando a virulência do microrganismo supera a resistência do hospedeiro, passando a exercer sua ação parasitária e ocorrendo a manifestação da doença (2).

Um exemplo desse evento é a colonização por *Candida* que, geralmente, é assintomática. Porém, quando ocorre denso crescimento da levedura, o quadro infeccioso denominado de candidose ou candidíase é observado clinicamente, no qual a mucosa apresenta-se com lesões e pode ser sintomático (3). Essa característica confere à levedura o caráter oportunista e comensal.

O gênero *Candida* possui diversas espécies consideradas patogênicas para o homem, como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, entre outras.

Estima-se que entre 7% a 69% da população adulta mundial utilizam próteses totais (4). A utilização de próteses dentárias mal adaptadas e não higienizadas adequadamente pode causar no indivíduo a estomatite sob prótese, comumente, associada à levedura do gênero *Candida*. Os usuários de próteses totais são em sua maioria idosos, sendo estes muito vulneráveis à infecção por *Candida*, pois além do fator prótese outros fatores predisponentes estão associados, como deficiência do sistema imunológico, condição de higiene bucal precária, presença de doenças sistêmicas, uso de medicamentos que diminuem a salivagem, má-alimentação e doenças crônicas (3). Acima dos 60 anos de idade, encontra-se na cavidade bucal uma maior prevalência das espécies de *C. albicans* seguida da espécie *C. glabrata* (5, 6).

Para o tratamento da infecção por *Candida* na cavidade bucal, comumente, é utilizada a nistatina ou o nitrato de miconazol. Além dos desconfortos gastrointestinais promovidos por estas drogas, a resistência de algumas cepas de

Candida aos fármacos ocorre em virtude de seu uso indiscriminado ao longo dos anos (7, 8).

Por outro lado, existe a preocupação com o ser humano no sentido de promover a saúde por meio de terapias alternativas ou naturais, como ocorre com o uso dos probióticos que, por definição, são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (9, 10).

Inicialmente, as bactérias probióticas foram estudadas na microbiota intestinal humana e foi observado que elas possuíam influências benéficas como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando no aumento da resistência contra patógenos. Assim, descobriu-se que a utilização de culturas probióticas estimulava a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (11). Não somente foi observada essa capacidade com bactérias patogênicas, mas também com leveduras do gênero *Candida* sp. isoladas da vagina (12).

Conhecendo essas características dos probióticos, a hipótese formulada foi de que os probióticos seriam capazes de reduzir a prevalência e prevenir a colonização de *Candida* oral em indivíduos susceptíveis a desenvolverem a doença.

O objetivo principal desta pesquisa foi, portanto, verificar a influência dos probióticos na redução da prevalência de *Candida* oral de pacientes edentados usuários de próteses totais. Os objetivos específicos foram: elaborar um bioproduto para ser aplicado em seres humanos, verificar prevalência de *Candida* neste grupo de indivíduos e testar ação antifúngica em estudo *in vitro*.

Uma vez comprovada a eficácia dos probióticos *Lactobacillus* estes poderão ser utilizados como uma alternativa profilática e terapêutica contra o microrganismo *Candida*, sendo uma opção para indivíduos intolerantes e/ou resistentes aos antifúngicos, nistatina e miconazol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Candida*

Na década de 1930 pouco se conhecia sobre a candidose sistêmica e doenças associadas às espécies de *Candida*. Na década de 1990 com o aumento dos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), os casos de candidíase superficial tornaram-se mais comuns, devido a queda do sistema imunológico. Desta maneira, estes indivíduos passaram do estado de portador da levedura à doente (13). Com isso, pôde-se conhecer mais sobre as doenças provocadas por *Candida*.

A colonização por *Candida* é considerada por diversos autores como sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento da infecção fúngica sistêmica (14). No entanto, observa-se que grande parte da população saudável e assintomática apresenta a levedura, sem manifestar a infecção.

Frequentemente o gênero *Candida* pode ser isolado de diferentes sítios orais incluindo bochecha, língua, mucosa palatina (15), próteses dentárias (16), placa dental, carie dental (17) e microbiota subgengival (18).

2.1.1. Prevalência de *Candida*

Segundo a revisão de literatura de Perezous (19), a prevalência de *Candida* em indivíduos saudáveis variou entre 20% a 50% e nos usuários de prótese foi maior: 75%. As taxas de prevalência, em média, variavam entre 25% a 75% de levedura na cavidade bucal de humanos saudáveis, sendo que diferem muito entre autores, como observado no quadro 2.1.

Quadro 2.1 Prevalência de *Candida* associada ao uso de prótese

Autores (referência)	Data	Quantidade total de sujeitos com prótese	Prevalência de <i>Candida</i> (%)
Wright et al.(20)	1985	53	66%
Cumming et al. (21)	1990	121	51 (78%) com <i>Candida</i> sp. e 65 (54%) com estomatite sob prótese
Lucas (22)	1993	51	34% isolada do palato e 94% da prótese
Lockhart et al. (5)	1999	29	86%
Darwazeh, Al-Refai and Mojawi (23)	2001	25	15 (60%)
Al-Karaawi et al.(24)	2002	32	62,5%
Barbeau et al.(25)	2003	68	29,4%
Perezous et al. (19)	2005	*	20% a 50% em indivíduos saudáveis e 75% em indivíduos com prótese
Abaci (26)	2011	110 indivíduos (90 com próteses)	43 dos 110 indivíduos com <i>Candida</i> sem estomatite sob prótese (35%)

*Revisão de literatura, dados baseados em estudos de 1991 a 1999 (27-29)

Percebe-se que a prevalência tem diminuído (28), não sendo mais de 66% dos usuários de próteses totais sem sinais de inflamação, conforme encontrado por Wright et al. (20). Essa ampla taxa de variação ocorre porque depende da amostra populacional e da técnica de sensibilidade dos testes para identificação de *Candida* (30).

Na revisão de literatura de Radford, Challacombe e Walter (28), os autores apresentaram uma tabela com a prevalência de estomatite sob prótese descrita por diversos autores, no período de 1952 à 1994, sendo reproduzida e atualizada no quadro 2.2, a seguir. A estomatite sob prótese é diagnosticada por seu aspecto

inflamatório da região do palato, podendo apresentar-se com alguns pontos hiperemiados à hiperemia difusa com hiperplasias.

Quadro 2.2 - Prevalência de estomatite sob prótese, no período de 1952 a 2011, em indivíduos usuários de próteses dentárias

Autores (referência)	Data	Quantidade total de sujeitos	Prevalência de estomatite sob prótese (%)
Nyquist (31)	1952	1090	27%
Budtz-Jorgensen (32)	1972	303	67%
Budtz-Jorgensen et al. (33)	1975	465	65%
Mikkonen et al. (34)	1984	3875	50%
Hand e Whitehill (35)	1986	629	27%
Brauer et al.(36)	1986	40	23%
Cumming et al.(21)	1990	121	54%
Wilkieson et al. (37)	1991	137	38%
Jorge Junior et al. (38)	1991	270	56%
Lucas (22)	1993	102 (51 grupo controle e 51 grupo experimental)	33,3% do grupo controle e 64,7% do grupo experimental
Corbet et al. (39)	1994	284	10%
Bardeau (25)	2003	68	70,6% (38,2%) *
Emani et al. (40)	2007		77,5%
Abaci (26)	2011	110	75%

* % isolada de *Candida* sp. em indivíduos com estomatite sob prótese

A prevalência da estomatite sob prótese variou entre 10% a 77,5%, sendo que esta não parece diminuir com o passar dos anos. Sabe-se que a levedura não é o único fator predisponente para a estomatite sob prótese, como será abordado a seguir, no item 2.1.5 Estomatite sob prótese.

Em idosos a candidose pseudomembranosa é muito comum de ser observada, de 10% a 15% na forma de “sapinho” (30) e também em neonatos com

sistema imunológico imaturo e com a microbiota gastrointestinal não estabilizada. Nestas condições, as células fúngicas invadem o estrato córneo, mas não penetram o estrato espinhoso (41). *Candida* associada à estomatite sob prótese afeta cerca de 25% a 65% dos usuários de próteses (42). Nestes casos não há penetração na camada espinhosa, mas é induzida infiltração de neutrófilos e linfócitos (30).

Candida albicans é o microrganismo mais frequentemente isolado na cavidade bucal, principalmente, na região do dorso da língua; pode também ser encontrado na mucosa jugal e superfície dentária (17). Além disso, essa espécie é a principal causadora da candidose na cavidade oral de humanos (41, 43, 44). Outras espécies também são consideradas patogênicas ao homem, como: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* (44, 45), *Candida lusitanae*, *Candida paraplois* e *Candida stelltoidea* (45).

2.1.2 Os fatores predisponentes do hospedeiro

Os fatores mais comuns que predispõe o indivíduo à manifestação da candidose na cavidade bucal são: condição de higiene oral precária; hipossalivação; doenças crônicas; uso de medicamentos; depressão; uso de próteses dentárias mal adaptadas (46, 47); baixo pH salivar (17); tabagismo (17); alta concentração de açúcares na saliva (48); AIDS e radioterapia (49).

2.1.3 Manifestações clínicas da doença

As manifestações clínicas da doença podem variar desde lesões superficiais na mucosa até infecções sistêmicas extremamente graves (50). A candidose pode ocorrer em qualquer idade; no entanto, são mais graves em neonatos, imunocomprometidos e idosos. De acordo com a sua manifestação clínica e histológica, a candidose bucal pode apresentar-se como pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica (51).

A candidose pseudomembranosa é caracterizada por placas esbranquiçadas em toda cavidade oral, passível de serem removidas à raspagem (52). Leveduras, hifas e células epiteliais descamadas podem ser observadas microscopicamente, inclusive com resposta inflamatória no tecido conjuntivo fibroso apresentado por linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares. Geralmente há leve ardor.

A candidose eritematosa é caracterizada por áreas eritematosas, no dorso da língua, palato e mucosa jugal (52). O epitélio é invadido por hifas e neutrófilos; e o tecido conjuntivo fibroso apresenta processo inflamatório por linfócitos, plasmócitos e polimorfonucleares.

A candidose hiperplásica é caracterizada por placas esbranquiçadas, difíceis de serem removidas (52). Comumente, acomete indivíduos acima de 60 anos. O epitélio apresenta-se hiperplásico paraqueratinizado com invasão da levedura na superfície e no tecido conjuntivo fibroso observa-se escasso infiltrado inflamatório crônico.

A queilite angular é outra manifestação clínica de candidose que afeta a comissura labial e é acompanhada por rachaduras nesta região, com aspecto esbranquiçado. A dor geralmente ocorre durante a mastigação. Os principais fatores predisponentes são a desnutrição, salivação excessiva (sialorréia) e perda de dimensão vertical de oclusão.

Ainda o gênero *Candida* está envolvido em outras doenças da cavidade bucal como: glossite romboide, câncer bucal e líquen plano (41).

2.1.4 Placa dental – biofilme

A placa dental, biofilme, é composta por vários microrganismos enclausurados numa matriz de glicoproteínas e polissacarídeos produzidos pelos componentes da microbiota (53). O gênero *Candida* e uma gama variada de bactérias estão presentes neste biofilme. A manifestação da candidose é um fator que está associado com a formação do biofilme na superfície dos dentes e da prótese dentária.

O biofilme encontrado nas próteses totais representa um reservatório de microrganismos patogênicos, importante para o desenvolvimento da estomatite sob

prótese (54). Esses microrganismos ficam enclausurados e são difíceis de serem removidos, podendo até dificultar a ação de drogas antimicrobianas (55) e do sistema imunológico do próprio indivíduo, sendo o motivo de insucesso do tratamento da estomatite sob prótese e de recidivas de infecções (19). Portanto, é de suma importância a higienização oral e das próteses para se evitar a instalação da doença (56) e reinfecções. O controle da placa é o meio mais indicado para se prevenir futuras infecções por *Candida* sp.

2.1.5 Estomatite sob prótese

A estomatite sob prótese é a lesão inflamatória associada ao uso das próteses, localizada na região do palato. O fator etiológico desta manifestação clínica está basicamente relacionado com o uso de próteses: mal adaptadas (57), durante a noite, para dormir (25) e com higiene precária (54). Há outros fatores associados com a estomatite sob prótese como tabagismo (25) e presença da levedura do gênero *Candida* (58).

A maior prevalência da estomatite sob prótese está associada ao gênero feminino, ao uso contínuo e à higiene precária das próteses (38). Porém não está associada com a idade do usuário, idade das próteses, estabilidade e oclusão (38).

Clinicamente, a doença pode ser dividida segundo a classificação de Newton, sendo baseada nos aspectos clínicos das lesões. A classificação de Newton é dividida em três classes: I – pontos hiperemiados, II – hiperemia difusa e III – hiperplásica ou hiperemia granular (59).

Classe I – aparecem pontos hiperemiados sobre região do palato; estes são eritemas localizados nos ductos de glândulas salivares palatinas menores.

Classe II – a mucosa apresenta-se de modo geral hiperemiada e sangra facilmente; engloba toda região da mucosa em contato com a prótese.

Classe III – a mucosa do palato apresenta-se com hiperplasias, sangra facilmente e tem aspecto granular.

No entanto, esta classificação não depende da presença de *Candida* (26), ou seja, a estomatite sob prótese é observada clinicamente e independente do indivíduo apresentar ou não a levedura. Mas, segundo a literatura, em indivíduos

com a inflamação mais extensa é observada uma maior prevalência de *Candida* e uma maior quantidade de biofilme nas próteses (25).

2.1.6 Fatores de Virulência de *Candida* como patógeno oportunista

Todos os microrganismos patogênicos apresentam fatores de virulência cuja função é auxiliar na invasão dos tecidos do hospedeiro. A virulência de *Candida* sp. pode ocorrer por meio de adesão às células epiteliais, capacidade de dimorfismo, mudanças fenotípicas, interferência ao sistema imune do hospedeiro e produção de exoenzimas, como fosfolipase e proteinases (41).

2.1.6.1 Adesão

O fenômeno de adesão é o primeiro passo no processo de colonização (60), depois ocorre formação de um biofilme fino e, em seguida, uma colonização acentuada. A capacidade de aderir-se às células do hospedeiro está correlacionada a fatores: próprios da levedura, como toxicidade (61), manana, quitina, lipídeo extracelular, hidrofobicidade, fenótipo, e formação de tubo germinativo (62); fatores ambientais, como nutrição (açúcares da dieta), pH, cátions, saliva, bactérias, lectinas, anticorpo humoral, soro e antifúngicos (62) que modulam a aderência de *Candida* em relação à expressão de adesão (61); e também fatores do hospedeiro, como: tamanho da célula da mucosa, fibronectina, fibrina, hormônios sexuais e ser portador de *Candida* (62).

Segundo Cannon et al. (41), o mecanismo de adesão é um processo complexo, que pode ocorrer por hidrofobicidade, ligações proteína-proteína, ligação à lectina e mecanismo indefinido.

Acredita-se que a levedura é atraída, inicialmente, às células epiteliais bucais por meio de forças físicas, como interações de van der Waals, hidrofobicidade e ligação eletrostática. Após esta aproximação, interações das células do hospedeiro são mediadas pelas proteínas, ligantes de lectina, da parede

celular da levedura que interagem com uma porção terminal da glicoproteína humana, que atua como um receptor primário (62).

As fibronectinas e lamininas são receptores que podem mediar a aderência de *Candida* a outros microrganismos, formando um biofilme complexo na cavidade oral (63). Essas adesinas presentes na parede celular da levedura, incluindo o fibrinogênio colágeno e entactina, reconhecem as proteínas da matriz extracelular e ligam-se às células epiteliais e receptores endoteliais. Além disso, metade dos carboidratos nas manoproteínas de *Candida* pode ligar-se às glicoproteínas do hospedeiro em macrófagos esplênicos (64). Se a adesão for contínua a colonização acarreta em infecção, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos.

As leveduras do gênero *Candida* aderem-se a vários tipos de células do hospedeiro como epitélio (65), endotélio (66, 67) e células fagocíticas (68). Assim como em superfícies revestidas por saliva como as próteses dentárias (69).

A própria composição da superfície celular da espécie *C. albicans* é dinâmica, ou seja, para se defender do sistema imune do hospedeiro a cepa de levedura comensal pode aderir-se a outros receptores, promovendo a candidose (68), sendo, portanto, depende da interação com o hospedeiro.

2.1.6.2 Morfogênese - capacidade de dimorfismo

A mudança das condições ambientais pode induzir a morfogênese de *Candida albicans*, ou seja, pode variar da forma de levedura à hifa, sendo que esta última apresenta em sua superfície uma série de proteínas que favorecem a penetração nas células epiteliais do hospedeiro (70), além de maior capacidade de aderência (19, 43), pois aumenta a expressão de receptor de fibronectina (71).

2.1.6.3 Mudanças fenotípicas

As espécies de *C. albicans* e *C. glabrata* possuem o fenômeno de *switching*, que confere a estas espécies a capacidade de modificarem de seus fenótipos, assim

como, apresentarem morfologia e propriedades fisiológicas variadas, contribuindo para a patogenicidade de *Candida*. No entanto, este fenômeno ainda não está muito bem elucidado, mas há evidências de que a mudança fenotípica favorece a sobrevivência da levedura em ambientes adversos e altera a sua superfície antigênica, escapando dos mecanismos de defesa imunológico do hospedeiro, inclusive do tratamento antifúngico (72). A espécie *C. dubliniensis* isolada da cavidade bucal também apresenta alta frequência de mudança fenotípica (73), porém não há relatos para as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

2.1.6.4 Produção de exoenzimas - fosfolipase e proteinase

A fosfolipase pode desempenhar um papel ativo na invasão dos tecidos do hospedeiro atuando nas lesões, onde a membrana das células epiteliais é atingida, permitindo que as extremidades das hifas penetrem no citoplasma.

A produção de proteinase é utilizada para aumentar a capacidade do microrganismo em colonizar e penetrar nos tecidos do hospedeiro, assim como, se defender do sistema imunológico degradando proteínas, como imunoglobulinas, complemento e citocinas (74). A virulência dos microrganismos do gênero *Candida* quando supera a resistência do hospedeiro exerce sua ação parasitária, ocorrendo, desta forma, uma infecção denominada candidose (2).

O fluxo e a composição da saliva estabelecem um equilíbrio dinâmico entre as diversas espécies de *Candida* e outros membros da microbiota comensal, prevenindo o estabelecimento de candidose em hospedeiro imunocompetente (21). Mesmo assim, estima-se que ocorra a colonização em 25% a 50% dos indivíduos saudáveis (75).

2.1.6.5 Mecanismos de defesa do hospedeiro

A cavidade oral pode ser protegida contra microrganismos patogênicos através da barreira mecânica promovida pela mucosa bucal, pela saliva que lubrifica

a cavidade e pelo sistema imunológico (76). A imunoglobulina A (Ig A) presente na secreção salivar e produzida por meio de uma resposta imune humoral é indispensável no combate à levedura, impedindo a progressão e a proliferação da mesma (77). Anticorpos Ig A salivar podem ajudar na imunidade oral no combate à levedura através dos seguintes mecanismos: impedindo a aderência microbiana; neutralização de enzimas, toxinas e vírus; atuação em sinergismo com outros fatores, tais como lisozima e lactoferrina (78). Em contraste com outros tipos de imunoglobulinas, como a imunoglobulina G (Ig G) que é modulada pela resposta imune individual, os níveis de Ig A são diretamente proporcionais à força exercida pelo patógeno (79).

Todos os anticorpos (imunoglobulinas), inclusive a Ig A, agem de duas maneiras para proteger o corpo dos agentes patogênicos: por ataque direto ao invasor ou por ativação do sistema complemento. Os anticorpos apresentam uma natureza bivalente que pode interagir com múltiplos sítios antigênicos dos agentes invasores. A inativação do invasor via ataque direto pode ocorrer das seguintes maneiras: aglutinação, em que partículas grandes com antígenos em sua superfície formam um aglomerado com a imunoglobulina; precipitação, o complexo molecular de antígeno solúvel e anticorpo é tão grande que se torna insolúvel e precipitado; neutralização, os anticorpos cobrem os sítios tóxicos do antígeno; lise, os anticorpos potentes são ocasionalmente capazes de atacar diretamente as membranas de antígenos celulares e, desse modo, causar ruptura da célula. A maior parte da proteção vem através dos efeitos amplificados do sistema complemento, já que as ações diretas não são bastante fortes para proteger o corpo (80).

A resposta imunológica sistêmica gerada pelas lesões bucais localizadas ainda não foram muito estudadas e, portanto, não se sabe muito a respeito (81). A infecção por *Candida* denominada de candidose, quando ocorre na cavidade bucal, induz uma resposta imune caracterizada pela produção de fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α) e interferons- gama (IFN- γ). Essas citocinas apresentam um importante papel na defesa do hospedeiro no combate a patógenos intracelulares.

Para controlar a disseminação da *C. albicans* presente na cavidade bucal devido a uma estomatite sob prótese, uma resposta imunológica localizada é fundamental. Um adequado reconhecimento do patógeno realizado através da expressão de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), presentes nas células do hospedeiro, é o responsável pela ativação dos mecanismos efetores da

imunidade inata e das células efetoras não imunes garantindo a resposta imunológica (81). Os RRP's reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), os quais estão presentes na parede celular da *C. albicans*, e podem ser exemplificados por: glucano, manana, manoproteínas, glicoproteínas e outras proteínas, sendo manana e β -1-3 glucano altamente imunogênicas (81-83).

2.1.7 Tratamento

Para o tratamento da candidose oral é, frequentemente, utilizada a nistatina ou o nitrato de miconazol. A nistatina é um antibiótico antifúngico que atua na membrana celular fúngica, resultando em alteração na permeabilidade da membrana celular e, conseqüentemente, extravasamento do conteúdo citoplasmático. O miconazol atua na inibição da biossíntese do ergosterol na célula fúngica o que ocasiona necrose e morte celular.

Em usuários de próteses totais, comumente, recomenda-se aplicação tópica desses fármacos, através do bochecho com nistatina, sem as próteses, deglutindo em seguida, durante 15 dias de utilização. O nitrato de miconazol, gel oral, deve ser colocado sobre a superfície interna da base da prótese, previamente higienizada. O gel deve ficar em contato direto com a mucosa e a aplicação é a cada 6 horas durante 15 dias aproximadamente.

Apesar de serem bem tolerados, ambos podem causar distúrbios gastrointestinais leves e transitórios, como náuseas, vômito e diarreia, após ingestão via oral (84). As desvantagens relatadas pela baixa eficácia dos agentes tópicos na cavidade bucal são devido à diminuição de sua concentração nos tecidos infectados em decorrência dos efeitos diluentes da saliva (85), assim como pela resistência de algumas cepas de *Candida* aos fármacos em virtude de seu uso indiscriminado ao longo dos anos (7, 8).

2.2 Probióticos

2.2.1 Definição

Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (9, 10). Os probióticos mais utilizados são bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

2.2.2 Histórico

As bactérias probióticas vêm sendo estudadas na microbiota intestinal humana e são verificadas influências benéficas como, por exemplo, efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando no aumento da resistência contra patógenos. Assim, descobriu-se que a utilização de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (11).

2.2.3 Gêneros e espécies

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos em alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (86). Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L.*

helveticus, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (82, 87).

Na classificação das bactérias lácticas, o gênero *Lactobacillus* é considerado como tal, devido à sua característica fisiológica, morfológica, modo de fermentação da glicose, multiplicação em diferentes temperaturas, configuração de ácido láctico produzido, tolerância às condições ácidas e básicas. As bactérias lácticas apresentam duas principais vias de fermentação de carboidratos: glicólise, que resulta na formação de ácido láctico (fermentação homoláctica/homofermentativas) e a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase, que resulta em produtos como etanol, dióxido de carbono e acetato, bem como, ácido láctico (fermentação heteroláctica/heterofermentativas) (88). As bactérias lácticas são capazes de produzir outras substâncias antimicrobianas além do ácido láctico, como peróxido de hidrogênio, diacetil, outros ácidos orgânicos e também são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de origem proteica, denominadas de bacteriocinas.

2.2.4 Seleção de bactérias probióticas

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: a bactéria ser de origem humana; apresentar estabilidade frente ao ácido e a bile; ter a capacidade de aderir à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; ser capaz de produzir compostos antimicrobianos, e ser metabolicamente ativo no intestino. Outros critérios fundamentais são: a segurança para uso humano, o histórico de não patogenicidade e não estarem associadas a outras doenças, tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (82, 83, 89).

Entretanto, os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele se destina. Em outras palavras, mais ensaios devem ser realizados para comprovação da eficácia dos probióticos destinados para o uso em humanos (9, 10).

2.2.5 Mecanismos de ação dos probióticos

Os possíveis mecanismos de atuação atribuídos aos probióticos são: produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e por sítios de adesão; alteração do metabolismo microbiano, aumentando ou diminuindo da atividade enzimática; estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento tanto dos níveis de anticorpos quanto da atividade dos macrófagos (12, 83, 90-93).

Os compostos antimicrobianos produzidos por probióticos conhecidos são: ácido acético, ácido láctico (94), bacteriocinas (95-97), peróxido de hidrogênio, entre outros (98).

As bacteriocinas são pequenas proteínas com características catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas. Este composto pode ser produzido por diversos microrganismos, assim como, pode variar quanto ao seu espectro de ação, à quantidade de resíduos de aminoácidos (de 20 a 60) e propriedades bioquímicas (99). A propriedade antimicrobiana das bacteriocinas é devido ao seu efeito bactericida e bacteriostático, ao seu pequeno e amplo espectro de ação e à capacidade de se ligar em sítios específicos e inespecíficos de bactérias sensíveis (100). As bactérias lácticas produzem bacteriocinas, conhecidas como bioconservantes, cuja utilização em alimentos tem a finalidade de aumentar o tempo de vida útil do produto, inibindo o crescimento de microrganismos deteriorantes, como *Listeria monocytogenes* e *Clostridium*.

Os probióticos atuam na resposta imunológica interagindo com os linfonodos mesentéricos, resultando no aumento de Ig A contra patógenos intestinais e antígenos alimentares (101).

2.2.6 Benefícios

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à

colonização por patógenos; diminuição da população de microrganismos patogênicos (94, 98); digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imunológico (1); alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (90).

Outros efeitos benéficos dos probióticos que ainda estão sendo estudados são relacionados à: diminuição do risco de câncer de cólon, de doença cardiovascular e das concentrações plasmáticas de colesterol; efeitos anti-hipertensivos (102); redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*; controle da colite induzida por rotavírus e por *Clostridium difficile*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (1, 91).

O probiótico mais pesquisado no trato gastrointestinal (TGI) (103) foi *Lactobacillus* GG, que é uma variação de *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*, e mostraram que essa espécie reduziu a duração da diarreia, promovendo uma melhora significativa em poucos dias. LGG modula a imunidade intestinal pelo aumento dos níveis de imunoglobulinas (Ig A) secretadas por células da mucosa intestinal, assim como, pela liberação de interferons e por facilitar o transporte dos antígenos.

2.2.7 Probióticos na cavidade oral

Na cavidade oral, as bactérias probióticas têm a capacidade de modificar o equilíbrio microbiológico do hospedeiro e reduzir o crescimento de patógenos, como de *Candida* (104). Em 2001, Sookkhee et al. (96) isolaram cepas de *L. paracasei* subsp. *paracasei* D6 e N14 e *L. rhamnosus* N8 da saliva e testaram, *in vitro*, a atividade antimicrobiana contra *C. albicans*. Hatakka et al. (81) utilizaram queijo contendo probióticos, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. rhamnosus* LC705 e *Propionibacteriu freudenreichii* ssp *shermanii* JS, e estes reduziram a prevalência de *Candida* oral em idosos. Ishikawa et al. (105) utilizaram um bioproduto, cuja composição era *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*, de uso tópico sobre a parte interna das prótese totais superiores, e também observaram redução da prevalência de *Candida* sp. No entanto, Koll et al. (106) isolaram *Lactobacillus* spp. e não obtiveram efeito positivo contra *C. albicans*.

Em camundongos, a cepa *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 reduziu o número de células de *Candida* da cavidade oral, possivelmente pela indução da produção de interleucina 4 (IL-4) e IFN- γ nos nódulos linfáticos e óxido nítrico (NO) na saliva (107). Os lactobacilos também possuem a capacidade aderir-se ao epitélio da mucosa, competindo deste modo pelos sítios de adesão (12), além de produzirem diferentes metabólitos, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (108) e peptídeos cíclicos antifúngicos (109), os quais inibem o crescimento da levedura.

Além de *Candida*, os probióticos podem ter ação contra outros microrganismos como os que estão envolvidos na doença periodontal (110-113). Koll et al. (106) caracterizaram os lactobacilos isolados da saliva e do fluido subgengival de 67 indivíduos saudáveis. Os resultados mostraram que a maioria das cepas isoladas teve a capacidade de inibir o crescimento de patógenos relacionados à periodontite, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, assim como para o agente etiológico da cárie dentária, *Streptococcus mutans*. Porém, os autores admitiram não saberem ao certo se os lactobacilos estavam presentes devido ao consumo frequente de produtos lácteos, levando a colonização temporária, ou se o ambiente oral era o seu habitat permanente.

Lactobacillus paracasei apresentou resultados semelhantes na ação contra *P. gingivalis* (113). Outros estudos descreveram que os probióticos, *Lactobacillus reuteri* (110) *L. reuteri* ATCC 55730 e ATCC PTA 5289 (111), reduziram a inflamação gengival, o sangramento e a placa bacteriana (110), além de diminuir os níveis de mediadores inflamatórios do fluido gengival crevicular (111) e da saliva (112).

Os efeitos dos probióticos sobre a diminuição da incidência de cárie (114-120) também foram relatados, nos quais se verificou a redução de *S. mutans* na cavidade oral após o consumo de produtos contendo probióticos, *L. reuteri* ATCC 55730 (115-117), bem como a sua capacidade de prevenir a doença cárie (118-120).

O método de reação em cadeia polimerase (PCR), utilizando *primers* específicos para 16S rDNA, é utilizado para caracterização das cepas de *Lactobacillus* da cavidade oral humana, como uma fonte potencial de probióticos (121). Das amostras coletadas na superfície de dente saudável, mucosa oral, superfície de cárie e lesão de cárie profunda, foram identificadas as cepas de *Lactobacillus salivarius* BGHO1, *Lactobacillus fermentum* BGHO36 e BGHO64,

Lactobacillus gasseri BGHO89 e *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* BGHO99. Estas apresentaram ação antagônica sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus flavus*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus mutans*, mas não sobre o crescimento de *Candida albicans*. Além disso, as cepas de *L. gasseri* BGHO89 e *L. salivarius* BGHO1 foram tolerantes ao baixo pH e alta concentração de sais biliares (121).

2.2.8 Probióticos em alimentos

Há estudos no Brasil, na área de tecnologia de alimentos (122-129), que mostraram a utilização de diversos alimentos, como iogurtes, mousse de goiaba, queijo tipo minas frescal e petit suisse, acrescidos de bactérias probióticas. Estes alimentos, conhecidos como alimentos funcionais, são valorizados no mundo todo, pois eles visam proporcionar uma maior qualidade de vida dos indivíduos (130).

Do ponto de vista imunológico, observa-se em diversos estudos (131-134) o grande interesse em introduzir a utilização de probióticos em alimentos e nutracêuticos com a finalidade de se aumentar a resistência do sistema imune dos indivíduos, reduzindo o risco de determinadas doenças e evitando-se, assim, a utilização de medicamentos que possam causar efeitos adversos.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Visando promover benefícios à saúde dos indivíduos propensos à candidose e à estomatite sob prótese, por meio de terapias alternativas com probióticos, o presente estudo teve por objetivo geral e objetivos específicos as seguintes questões:

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência dos probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* HS111 e *Lactobacillus acidophilus* HS101, na redução da prevalência de *Candida* oral de edentados, usuários de próteses totais.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar o bioproduto contendo probióticos para ser aplicado em usuários de próteses totais com *Candida* sp.
- Avaliar a capacidade dos probióticos em eliminar da cavidade bucal o microrganismo *Candida* sp. como medida profilática.
- Descrever a prevalência das espécies de *Candida* isoladas do palato e das próteses totais.
- Verificar se existe associação entre a ação dos probióticos com as espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal.
- Verificar se o mecanismo de ação dos probióticos contra *Candida* sp. é por meio da produção de bacteriocinas.
- Verificar a capacidade de inibição de *Candida* sp. por outras cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* HS101 e *L.rhamnosus* Lr-32 e *L.rhamnosus* Howaru), estudo *in vitro*.

- Avaliar se existe associação entre a inibição completa de crescimento de *Candida* pelas cepas *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* HS101, *L.rhamnosus* Lr-32 e *L.rhamnosus* Howaru de acordo com a origem de onde foram isoladas as leveduras: palato e prótese total.
- Verificar quais são as espécies de *Candida* com maior probabilidade de serem inibidas pelas cepas: *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* HS101 e *L.rhamnosus* Lr-32 e *L.rhamnosus* Howaru.
- Verificar se existe correlação do teste de inibição completa de *Candida* por estas cepas de *Lactobacillus* aos testes com antifúngicos convencionais: nistatina e miconazol.
- Verificar se existe diferença entre a distribuição das espécies de *Candida* isoladas do palato e da prótese.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Elaboração do bioproduto

Para a seleção dos lactobacilos que seriam utilizados no bioproduto, procurou-se saber quais eram as espécies que apresentavam potencial antifúngico e foi verificado na literatura que as principais eram as espécies *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*. Um dos cuidados que se tomou foi com relação às cepas, cujas amostras de probióticos deveriam ser certificadas e seguras, GRAS (Generally Recognized as Safe), ao consumo humano.

Na elaboração do bioproduto, a princípio, pensou-se em fazer uma suspensão oral de probióticos, como a nistatina, mas verificou-se que os probióticos perderiam a sua viabilidade, não permanecendo viáveis durante o tempo total do experimento de 5 semanas. Os probióticos também não sobreviveriam em contato com conservantes. Então, decidiu-se colocar em cápsulas os probióticos liofilizados e estas armazenadas em temperatura de geladeira por até 70 dias, conseguindo garantir desta forma a sua viabilidade. Foi adicionado aroma de morango (Kraft Foods, Brasil) para dar um sabor agradável.

Portanto, o bioproduto foi elaborado na forma de apresentação em cápsula, contendo *Lactobacillus rhamnosus* HS111 (HardiStrain™- Probiotics; Future Ceuticals, EUA) e *Lactobacillus acidophilus* HS101 (HardiStrain™- Probiotics; Future Ceuticals, EUA) em quantidades iguais, na dosagem de 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por cápsula. O produto placebo teve a mesma forma de apresentação em cápsula e com aroma de morango (Kraft foods, Brasil), porém sem probióticos.

A dosagem de 10^8 UFC, uso diário, foi baseada na recomendação da ANVISA: consumo de 10^8 UFC até 10^9 UFC de probióticos na porção diária em alimento (www.anvisa.gov.br).

O modo de uso consistiu em abrir a cápsula, despejar o seu conteúdo na parte interna da prótese superior, previamente higienizada (figura 4.1) e, em seguida, assentar a prótese e utilizar como de costume. A condição necessária era de que o produto ficasse em contato íntimo com a mucosa do palato, por este motivo

a administração foi considerada tanto de uso tópico como sistêmico, devido à ingestão da parte solubilizada na saliva. Verificou-se que o produto não interferiu na adaptação da prótese total, segundo relato dos sujeitos da pesquisa.

Figura 4.1 - Aplicação do bioproduto na parte interna da prótese total

A apresentação do produto por ser em cápsula confere ao bioproduto (probióticos) o registro como medicamento, segundo informação da ANVISA:

“A fim de evitar confusão do consumidor, os probióticos nas formas de apresentação em cápsulas, tabletes e comprimidos não serão considerados alimentos, uma vez que estes produtos são registrados como medicamentos”.

Sabe-se que quando um alimento é suplementado com probióticos estes são chamados de alimentos funcionais. A denominação nutracêutico refere-se a um alimento ou parte de alimentos que oferecem benefícios medicinais, prevenindo e/ou tratando doenças. Os nutraceuticos podem abranger nutrientes isolados, suplementos nutricionais e dietéticos, alimentos geneticamente modificados, alimentos funcionais, ervas e alimentos processados como cereais, sopas e bebidas (135). Os nutracêuticos devem demonstrar segurança ao consumo humano e não devem apresentar risco de toxicidade ou efeitos adversos de drogas (136).

Apesar de o bioproduto elaborado poder ser registrado como medicamento, visou-se que o bioproduto tivesse função nutracêutica, conferindo benefícios à saúde do indivíduo, prevenindo a candidose, com adequado perfil de segurança.

4.2 Aplicação em seres humanos

Os participantes gerais da pesquisa foram 158 voluntários, idade acima de 60 anos, gênero masculino e feminino, que realizaram o tratamento na Disciplina de Prótese Total II da Faculdade de Odontologia da USP (FOUSP), no período de 2008 a 2010. Estes responderam um questionário, denominado como ficha do paciente (anexo C); foram submetidos à um exame intra-oral, com a finalidade de verificar se apresentavam algum tipo de lesão que indicasse a presença da doença, e à coleta inicial da amostra (tempo inicial = t0), por esfregaço na região do palato pelo método SWAB, para verificar a presença de *Candida* sp. através de testes laboratoriais. Os participantes dispostos a colaborar com a pesquisa assinaram e concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo D) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo número 124/2008 (anexo A e B). Uma vez coletada as amostras, estas foram levadas ao Laboratório de Leveduras Patogênicas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB-USP), cultivadas em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, incubadas por 24 a 48 horas e quantificadas em UFC/mL, como descrito a seguir no subitem 4.3 coleta da amostra.

4.2.1 Critérios de exclusão e inclusão

Foram excluídos da pesquisa os indivíduos que apresentaram alteração cognitiva; uso de algum tipo de medicamento para tratamento de infecções orais, principalmente, com ação antifúngica, assim como, o uso de colutório bucal; consumo de qualquer produto como iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, em geral, contendo probióticos, como Yakult, Activia, Actimel, Sofyl, Biofibras, Danoninho, Chamyto, etc; intolerância à lactose ou aos derivados do leite; distúrbios

gastrointestinais graves; cardiopatias; transplantes recentes; histórico de reações a antibióticos e de distúrbios imunológicos (AIDS); e saúde geral descompensada. Foram também excluídos da pesquisa os indivíduos que apresentaram a candidose oral com suas manifestações clínicas, mas foram encaminhados para tratamento, com Terapia Fotodinâmica (PDT) ou com antifúngico convencional, nistatina oral - % 500.000 UI – 5 mL, três vezes ao dia durante duas semanas.

Para os indivíduos serem incluídos na pesquisa, eles tiveram que apresentar achado subclínico para *Candida* na cavidade oral, utilizar próteses totais, e não apresentar nenhum dos fatores de exclusão descrito anteriormente. A inclusão na pesquisa não dependeu de idade, condição socioeconômica, etnia e gênero.

4.2.2 Protocolo de intervenção

O protocolo de estudo e a intervenção realizada foi duplo-cego randomizado. Portanto, os sujeitos da pesquisa (59 indivíduos) incluídos no experimento foram divididos aleatoriamente em dois grupos: experimental e placebo, de acordo com a distribuição aleatória dos frascos, ou seja, cada participante recebeu um frasco do produto indicado em seu rótulo fórmula A ou B. O produto foi utilizado durante 5 semanas, uma cápsula diariamente. Tanto a pesquisadora quanto os sujeitos desconheciam qual dos frascos continha o produto com os probióticos. Somente na fase final da pesquisa, depois de registrada a contagem de unidade formadora de colônias (UFC) de *Candida* da última coleta, foi revelado o grupo experimental, que utilizou o produto contendo probióticos, e o grupo placebo, produto sem probióticos.

Após este período de utilização do produto (placebo e experimental), foram novamente coletadas as amostras (subitem 4.3), pelo método SWAB, da mesma forma como foi realizada inicialmente, para verificar se houve redução da contagem de *Candida* após a intervenção.

Considerou-se sucesso no tratamento aqueles resultados em que nesta última coleta (t1) não se isolou nenhuma levedura, ou seja, UFC igual a zero, e o fracasso no tratamento foi o que apresentou redução parcial ou não redução da UFC de *Candida*.

4.3 Coleta das amostras e cultivo

O diagnóstico laboratorial da presença de *Candida* sp. na cavidade oral pode ser feito por diversas técnicas como: esfregaço, SWAB, bochecho, cultura por *imprint*, coleta da saliva total e biópsia da mucosa.

Para realização da presente pesquisa foram isoladas amostras de *Candida* da cavidade bucal de indivíduos edentados totais que utilizavam próteses totais, através de coletas das amostras pelo método SWAB. Tal método foi selecionado, pois ele permite quantificar em unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida* sp. por mililitro (mL), verificando assim a prevalência deste microrganismo em idosos usuários de próteses. Além de possibilitar o isolamento da levedura para realização dos outros experimentos. O SWAB foi realizado com o auxílio de uma escova cervical (Kolplast ci Ltda, Itupeva- SP, Brasil), passada em toda extensão do palato, por 10 segundos (figura 4.2).

Figura 4.2 - Coleta da amostra pelo método SWAB

Em seguida, as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio contendo solução salina (figura 4.3) e transportadas ao Laboratório de Leveduras Patogênicas do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo

(ICB-USP), para se realizar a cultura, quantificação, isolamento e identificação das espécies de *Candida*, conforme descrito a seguir.

Figura 4.3 - Coleta da amostra sendo colocada em solução salina

4.3.1 – Processamento das amostras

As amostras coletadas foram homogeneizadas através de agitação em vortex (figura 4.4).

Figura 4.4 - Amostra após homogeneização em vortex

Foram feitas dez diluições seriadas do homogeneizado, sendo que 0,1 mL de cada solução foi semeada em triplicata na superfície do meio ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) com cloranfenicol em placas (figura 4.5).

Figura 4.5 - Solução sendo semeada sobre ASD

Após incubação a 37°C, por um período de 24 a 48 horas, as leveduras foram quantificadas em UFC/mL (figura 4.6).

Figura 4.6 - Colônias de *Candida* sp.

4.4 Identificação das espécies de *Candida*

A identificação das espécies de *Candida* foi realizada pelo método convencional, segundo técnicas do Manual *The Yeasts* (137), ou seja, foram realizados os testes descritos a seguir e, posteriormente, comparados na chave de identificação.

4.4.1 Tubo germinativo (137)

Este é um teste que caracteriza rápida e presuntivamente a espécie *Candida albicans*. Uma amostra da colônia de *Candida* é colocada em soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil), com o auxílio de uma alça de platina calibrada (0,01mL), emulsioná-la de forma asséptica em 0,5 mL de soro. Incubar a 37°C por um período máximo de 3 horas. Após 1,5 hora, uma gota da suspensão é colocada numa lâmina-lamínula para ser observado em microscópio de luz, aumento de 400 vezes, se há formação de tubo germinativo (figura 4.7) na primeira, segunda e terceira hora. O teste quando positivo aparecerá um fino filamento cilíndrico originado do bastoconídeo da levedura, ausente de constrição em toda sua extensão, incluindo a base.

Figura 4.7 - Leveduras com tubo germinativo

4.4.2 Microcultivo em ágar fubá (137)

A técnica baseia-se no princípio de que algumas espécies de *Candida* têm a capacidade de filamentar, formando hifas e pseudo-hifas, quando em meio Tween-80. Assim como podem ser observadas estruturas morfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas como bastoconídeos, clamidoconídeos e artroconídeos, favorecendo a identificação das espécies. Para a realização deste teste, devem-se esterilizar placas de Petri de vidro contendo papel filtro, três lâminas e lamínula, sendo duas utilizadas como suporte para a lâmina em que será feito o teste. Sobre a lâmina é colocado aproximadamente 3 mL de meio ágar fubá fundido (Corn Meal agar, Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA), com o auxílio de uma pipeta estéril, formando um quadrado pequeno em seu centro. Espera-se solidificar. Com uma alça de platina, uma porção pequena da colônia de *Candida* deve ser semeada na forma de duas estrias paralelas. Coloca-se a lamínula estéril, pressionando-a levemente e, em seguida, é colocado um pouco de água destilada estéril umedecendo o papel filtro. A incubação é realizada em temperatura de 25°C e após 24 horas são observadas em microscópio de luz, aumento de 400 vezes, as estruturas morfológicas anteriormente citadas. É indicado que este seja observado durante 2 a 3 dias, não se esquecendo de repor a água destilada estéril durante o período de observação (figura 4.8).

Figura 4.8 - Presença de clamidoconídeo (1), hifas (2) e bastoconídeos (3)

4.4.3 Assimilação de carboidratos e nitrogênio (Auxanograma) (137)

Algumas espécies de *Candida* apresentam capacidade de utilizar determinado carboidrato como substrato, para sua viabilidade celular. Desta forma, a técnica consistiu em utilizar um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono, meio YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA), sem o qual a célula fúngica não pode crescer. Por infusão, 1 mL do inóculo da levedura, previamente preparado em solução salina em concentração 5 da escala de MacFarland, foi homogeneizado em 20 mL de meio basal fundido a 47°C. Após a solidificação deste, diretamente sobre a superfície foram colocados os discos impregnados com os açúcares (Laborclin, Paraná, Brasil). A única fonte de carbono que a levedura poderia assimilar foram os açúcares utilizados: inositol (INO),

sacarose (SAC), lactose (LAC), dulcitol (DUL), melibiose (MEL), rafinose (RAF), raminose (RAM), maltose (MAL), trealose (TRE), xilose (XIL) e glicose (GLI), sendo esta última o controle de viabilidade. A assimilação de carboidrato pode ser observada através da formação de um halo ao redor dos discos que contém os açúcares, conforme ilustrado na figura 4.9, assimilação dos açúcares TRE, MAL, GLI e SAC.

Figura 4.9 - Assimilações de açúcares. A glicose (GLI) e melibiose (MEL) foram colocados os açúcares diretamente no meio

Para assimilação de nitrogênio, algumas leveduras apresentam assimilação ao nitrato de potássio (nitrogênio inorgânico) como única fonte de nitrogênio na sua viabilidade biológica. Então, utiliza-se meio livre de nitrogênio, YCB (Yeast Carbon Base, Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) e em 20 mL deste meio fundido a 47°C, por infusão é colocado 1mL de suspensão da levedura, previamente

preparada correspondendo à escala 5 de MacFarland, homogeneizando por *pour-plate*. Após solidificação do meio, colocam-se os discos impregnados com nitrato de potássio (KNO_3), com peptona e glicose (Laborclin, Paraná, Brasil). A peptona é utilizada para controle da viabilidade do inóculo, pois todas as leveduras a utilizam como fonte nitrogenada.

4.4.4 Fermentação de carboidratos (Zimograma) (137)

A fermentação de carboidratos é uma característica fenotípica em que algumas espécies de *Candida* possuem sistemas enzimáticos eficientes, capazes de degradar açúcares para produção de energia, formando gás carbônico. Para esta técnica são distribuídos em tubos de ensaio pequeno, contendo tubo de Durhan invertido em seu interior, meio basal para fermentação em quantidade de 3 mL. Os tubos são esterilizados em autoclave e armazenados. Para execução do teste, adiciona-se 1,5 mL da solução de açúcares (glicose, maltose, sacarose ou lactose; 6% em água destilada) (INLAB, Brasil), mantendo a relação 1:1 de solução de açúcares para meio basal. Após a diluição, coloca-se a 0,2 mL da suspensão de levedura, na escala 5 de MacFarland, incubando a 37°C por 10-14 dias. É observada a fermentação quando há a formação de bolhas de ar no interior dos tubos de Durhan (figura 4.10).

Figura 4.10 - Presença de fermentação por *Candida*

4.4.5 Técnica para diferenciação de *Candida dubliniensis* e *Candida albicans*

Há semelhança fenotípica entre *C. dubliniensis* e *C. albicans*, o que confunde em sua identificação quando realizada pelos métodos convencionais, como os testes de assimilação de carboidratos, cromogênico (CHROMagar, Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA), atividade de β -glicosidase e crescimento a temperaturas de 42 e 45°C. O teste cromogênico é um método sugestivo de identificação através das cores das colônias, por exemplo, quando a colônia é verde clara, o indicativo é de *C. albicans* e verde escura, *C. dubliniensis*. O teste de crescimento de 42°C a 45°C foi preconizado por Sullivan e Coleman (138). Neste as amostras semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) são incubadas a 42°C e o crescimento a esta temperatura é sugestivo de *C. albicans*, e o não crescimento, *C. dubliniensis*. Como esses métodos são sugestivos, optou-se pelo método auxiliar para identificação de *C. dubliniensis* de Alves et al.(139). O método consiste em semear a cultura de *Candida* em caldo hipertônico, ou seja, meio Sabouraud dextrose caldo suplementado com 6,5% de cloreto de

sódio, sendo que apenas a espécie *C. albicans* apresenta crescimento no período de incubação de 96 horas, enquanto que *C. dubliniensis* não exibe qualquer crescimento.

4.5 Mecanismo de ação dos probióticos: bacteriocinas

O teste de detecção da produção de bacteriocinas foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com a colaboração do Prof. Dr. Svetoslav Todorov (Slavi) e Profa. Dra. Bernadette Franco. Os procedimentos foram seguidos conforme método descrito na literatura, por De Martinis e Franco (95) modificados.

Os tubos de ensaio foram preparados contendo caldo de MRS Lactobacilli (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) com o inóculo a serem testadas das espécies de *Lactobacillus*: *L. acidophilus* NCFM (Danisco, Madison, WI, USA), *L. acidophilus* HS101 (HardiStrain™- Probiotics; Future Ceuticals, EUA), *L. rhamnosus* Lr-32 (Danisco, Madison, WI, USA), *L. rhamnosus* HS111 (HardiStrain™- Probiotics; Future Ceuticals, EUA) e *L. rhamnosus* Howaru (Danisco, Madison, WI, USA) (figura 4.11).

Figura 4.11 - Repique de 24 horas de *Lactobacillus* sp. em caldo de MRS Lactobacilli

O meio com o inóculo foram incubados a 37°C por 24 horas, em condições anaeróbicas, depois foram transferidos 1,5 mL deste meio com *Lactobacillus* sp. para *ependorfs* (figura 4.12).

Figura 4.12 - *Eppendorfs* contendo meio caldo de MRS Lactobacilli e cepas de *Lactobacillus* sp.

Os *ependorfs* foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C, figura 4.13 e figura 4.14.

Figura 4.13 - *Eppendorfs* colocados na parte interna da centrífuga (Centrifuge 5417C)

Figura 4.14 - Rotação da centrífuga em 14000 rpm por 10 minutos a 4°C

Ao terminar a centrifugação, o sobrenadante de cada cultura foi colocado em outro *eppendorf* e, em seguida, aquecido a 80°C por 10 minutos, para degradar proteínas (figuras 4.15 e 4.16). Com o objetivo de eliminar o efeito antimicrobiano do ácido láctico, o pH do sobrenadante de cada cultura foi ajustado para 6,0 com NaOH 1M estéril.

Figura 4.15 - Aquecimento a 80°C por 10 minutos

Figura 4.16 – Banho de água dos *ependorfs* contendo o sobrenadante de *Lactobacillus*

Ao término do aquecimento, esperou-se esfriar para uso da suspensão no teste de bacteriocina.

Prepararam-se placas de Petri com infusão de *Candida*, na concentração de 0,5 da escala de McFarland, em 20 mL de ASD (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA), figura 4.17. Foram testadas 65 espécies de *Candida*, sendo 25 *C. albicans*, 17 *C. tropicalis*, 11 *C. glabrata*, 9 *C. guilliermondii*, 1 *C. krusei*, 1 *C. kefyr* e 1 *C. parapsilosi*. Para o controle positivo foi preparado placas de Petri contendo cerca de 20 mL de caldo infusão-cérebro-coração (BHI, Oxoid Ltd, UK) suplementado com 0,8% de ágar (Oxoid Ltd, UK) e contendo 10^5 - 10^6 células viáveis por mL de *Listeria monocytogenes* Scott A.

Figura 4.17 - Placas de Petri contendo *Candida*, na concentração de 0,5 da escala de McFarland, em 20 mL de ágar Sabouraud dextrose (ASD)

Após o resfriamento da suspensão, fez-se a inoculação de 10 microlitros do sobrenadante nestas placas com o microrganismo (*Candida* ou *Listeria*), figura 4.18.

Figura 4.18 - Placa de Petri preparada com ASD e inóculo de *Candida* sp.

Após a absorção do sobrenadante, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, com posterior avaliação da formação de halo de inibição. Observou-se a formação do halo no controle positivo, placa de Petri com *Listeria* (figura 4.19).

Figura 4.19 - Formação de halo de inibição, no controle positivo com *Listeria*

Após a formação do halo foi realizado o teste de sensibilidade das substâncias antagonísticas à proteases, para saber se o que formou o halo de inibição foi realmente bacteriocina, de acordo com o método descrito por Todorov e Dicks (140).

Os sobrenadantes das culturas (figura 4.20) obtidas por centrifugação 10.000 rpm por 10 minutos foram tratados com 1,0 mg/mL de: alfa-amylase (Sigma – Aldrich, Suíça), protease de *Streptomyces griseus* tipo XIV (Sigma- Albrich, Japão), alfa-chymotrypsin de pâncreas bovino tipo II (Sigma- Aldrich, USA) e proteinase K (Sigma- Aldrich, USA) e o sobrenadante que formou halo sem enzima (figura 4.21). Após a adição das enzimas, os *eppendorfs* contendo os sobrenadantes foram incubados a 37°C por 2 horas (Figura 4.22).

Figura 4.20 - Eppendorfs contendo sobrenadantes das culturas e que foram adicionados enzimas

Figura 4.21 - Enzimas utilizadas para o teste de sensibilidade de substâncias antagonísticas a proteases: alfa-amylase, protease de Streptomyces griseus tipo XIV, alfa-chymotrypsin de pâncreas bovino tipo II e proteinase K

Figura 4.22 - *Eppendorfs* contendo os sobrenadantes com as enzimas incubados a 37°C por 2 horas

Em seguida, transferiu-se 10 microlitros do sobrenadante tratado para um ponto nas placas. As placas de Petri foram preparadas (figura 4.23) contendo ágar de soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura – TSAYE (Oxoid Ltd, UK). Estas foram recobertas com 5 mL de caldo BHI (Oxoid Ltd, UK) suplementado com 0,8% de ágar (Oxoid Ltd, UK) e contendo 10^5 - 10^6 UFC/mL da cultura de microrganismo indicador, *Listeria*, e incubadas a 37°C por 24h em anaerobiose.

Figura 4.23 - Placas sendo preparadas para o teste de sensibilidade das substâncias antagonísticas à proteases

A destruição da substância antagonista devido à ação das enzimas proteolíticas é comprovada pelo halo inibitório ao redor do ponto onde foi colocado o sobrenadante tratado, sendo confirmado que este é bacteriocina.

Caso desejasse caracterizar-se a bacteriocina, seria necessário continuar as avaliações, por: formação do halo de inibição com cepas (DF2Mi, DF3Mi, DF4Mi, DF5Mi, DF6Mi e DF60Mi) que apresentem sensibilidade às proteases; espectro de atividade dos sobrenadantes das culturas bacteriocinogênicas; influência do pH, temperatura e agentes químicos na atividade das bacteriocinas.

4.6 Estudo *in vitro* da ação antifúngica de cepas de *Lactobacillus*

A metodologia de Fitzsimmons e Berry (141) modificada foi realizada conforme descrito a seguir.

Foram preparadas, por infusão, placas contendo ágar MRS *Lactobacilli* (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) e o inóculo de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* e *L. rhamnosus*) (figura 4.24).

Estas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em condições anaeróbicas, em jaras (Probac, Brasil) com geradores de anaerobiose, Anaerobac (Probac, Brasil). As cepas de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* testadas foram, respectivamente: *L. acidophilus* **HS101** (HardiStrain™- Probiotics; Future Ceuticals, EUA); *L. acidophilus* **NCFM** e *L. rhamnosus* **Lr32 e HN0001- Howaru® Premium Probiotics** (Danisco, Madison, WI, USA).

Figura 4.24 - Placa de Petri contendo meio ágar de MRS com infusão de *Lactobacillus*

Após o crescimento de *Lactobacillus*, o meio foi cortado na região central, medindo 2 cm. (figura 4.25) e transferidos a outra placa estéril.

Figura 4.25 - Recorte do meio com *Lactobacillus*

Em suas laterais, foram preenchidas com meio fundido a 47°C de ágar Sabouroud dextrose (ASD) (figura 4.26), com o auxílio de uma pipeta até nivelar com o meio já solidificado de MRS contendo lactobacilo. Esperou-se solidificar o ASD, para assim, serem utilizadas neste teste. A modificação realizada na metodologia de Fitzsimmons e Berry (141) foi a troca do meio a ser preenchido nas laterais, onde ao invés de ágar MYPG (Bacto YM Agar, Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) com sodium thiocyanate (0.81 g/l) (POCH) e 20 mg/ml catalase (Sigma-Aldrich, USA), foi utilizado o meio ASD, pois a levedura do gênero *Candida* apresenta excelente crescimento neste meio.

Figura 4.26 - Preenchimento das laterais com ASD

Preparou-se o inóculo da levedura em concentração de 0,5 da escala de MacFarland (figura 4.27). Este foi semeado sobre o meio para o teste de inibição por bactérias lácticas, seguida de pré-incubação a 4°C por 4 horas e incubação a 37°C por 24 horas em condições aeróbicas.

Figura 4.27 - Densimat para preparação do inóculo de *Candida*

Os resultados foram avaliados visualmente de acordo com a inibição do crescimento da levedura sobre a faixa de 2 cm de probióticos, segundo Strus et al. (12), sendo interpretados como nenhuma inibição, inibição parcial ou total (figura 4.28).

Figura 4.28 - Possíveis resultados para este teste: não inibição, inibição parcial e inibição completa

4.7 Teste de susceptibilidade aos antifúngicos nistatina e nitrato de miconazol

Para os testes de sensibilidade a nistatina e ao miconazol foi utilizado o método de difusão em ágar a partir de disco, segundo o documento M44-A (CLSI, 2004) (142).

4.7.1 Preparação do inóculo

Todas as amostras em estudo foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA) por 24 horas a 37° C, para garantir a pureza e a viabilidade das mesmas; este processo foi repetido por duas vezes.

Preparou-se uma suspensão de cada amostra de *Candida* em 5 mL de água deionizada estéril, sendo a turvação do tubo ajustada em 0,5 da escala de Mcfarland.

Cada amostra da suspensão foi distribuída sobre a superfície do meio ágar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, Mich, USA), suplementado com 2% de glicose e 0,5 g/mL de azul de metileno. A distribuição da suspensão foi realizada com um SWAB estéril, alginatado (Diagnostic Cefar – Farmaco, São Paulo, Brasil), movimentando-o em três direções. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos para uma completa absorção da suspensão.

Figura 4.29 - Preparo do inóculo e distribuição da suspensão sobre meio ágar Müller Hinton

4.7.2 Execução do método de difusão em ágar a partir de disco segundo o documento M44-A (CLSI, 2004) (142)

O disco de antifúngico foi depositado na superfície do meio e levemente pressionado sobre o ágar. A avaliação da sensibilidade realizou-se após 24 horas de incubação a 37°C, segundo critérios de sensibilidades indicados pelo fabricante, medindo-se com um paquímetro o diâmetro os halos de inibição (figura 4.30).

Figura 4.30 - Medição da zona de inibição segundo método de difusão em ágar a partir de disco

4.7.3 Interpretação dos resultados do método de difusão em ágar a partir de disco

O critério para avaliar a sensibilidade ao miconazol e a nistatina foi o recomendado pelo fabricante (CECON-SP), segundo quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Interpretação dos resultados de acordo com a zona de inibição

Antifúngicos	Símbolo	Conc/ disco	Zona de inibição (mm)	CIM mcg/mL	Interpretação
Nistatina	NY	100 U.I.	>10	--	Sensível
			--	--	--
			<10	--	Resistente
Miconazol	MCZ	50 mcg	>20	<1,56	Sensível
			20 - 10	1,56 - 6,4	Intermediário
			<10	>6,4	Resistente

4.8 Análise dos resultados

Para testar se a probabilidade do tratamento teve sucesso *in vivo* ou se os probióticos tiveram ação antifúngica *in vitro*, de acordo com cada uma das variáveis do estudo, utilizou-se inicialmente para as variáveis qualitativas os testes qui-quadrado tradicionais (assintótico), testes qui-quadrado exatos ou testes exatos de Fisher dependendo das características de cada variável (143). Foi considerado sucesso de tratamento, no teste *in vivo*, quando os probióticos reduziram a prevalência de *Candida* por completo, ou seja, ausência de crescimento em UFC de *Candida*. No teste *in vitro*, as cepas de *Lactobacillus* testadas foram consideradas com ação antifúngica contra *Candida* quando estas inibiram totalmente o crescimento de *Candida* sobre o meio MRS. Para as variáveis quantitativas foram utilizados modelos de regressão logística simples (144). O nível de significância considerado neste trabalho foi de 5%.

Utilizou-se o software SAS 9.2 (SAS Institute Inc.) para as análises estatísticas deste trabalho.

5 RESULTADOS

5 Resultados

5.1 Aplicação dos probióticos em seres humanos

Dos 158 voluntários, 59 indivíduos participaram da pesquisa, ou seja, 37% dos usuários de próteses totais eram portadores de *Candida* oral, assintomáticos para candidose e estomatite sob prótese. Destes, 30 sujeitos da pesquisa receberam o pote A e 29 o pote B (figura 5.1).

Depois de registrada a quantidade de UFC da última coleta, revelou-se qual era o grupo experimental, que utilizou os probióticos, sendo aquele que recebeu o pote A e o grupo placebo, B. Neste segundo grupo, quatro indivíduos desistiram de participar da pesquisa, por uso inadequado do produto, por vontade própria ou por achar que o produto estava fazendo mal. Portanto, foram considerados no total 55 os sujeitos da pesquisa.

Figura 5.1 - Fluxograma dos sujeitos da pesquisa (n)

Cada sujeito da pesquisa foi avaliado em relação à presença de *Candida*, em UFC, antes do início do tratamento e após 5 semanas de tratamento, sendo considerado tratamento de sucesso aquele que teve reduzida a zero a quantidade de UFC de *Candida* na coleta final. O sucesso do tratamento, a incidência ou não de *C. albicans* e a quantidade de UFC antes do início do tratamento foram estudadas em função de outras variáveis.

5.1.1. Análise exploratória

A análise exploratória dos dados está representada nas tabelas de 5.1 a 5.3. Nelas estão apresentadas medidas descritivas das variáveis do estudo tanto para toda a amostra como segmentadas por grupo. Esses dados foram obtidos a partir da coleta das amostras no tempo inicial (t0) e dos dados dos sujeitos da pesquisa, registrados no questionário, chamado de ficha do paciente (anexo C), aplicado aos sujeitos que participaram aleatoriamente da pesquisa e de amostras coletadas da cavidade bucal dos mesmos.

Na tabela 5.1 é apresentada a frequência em valores absolutos (Absol) e relativos (Rel) em %, sendo as variáveis distribuídas segundo os grupos da pesquisa experimental (probiótico) e controle (placebo).

Tabela 5.1 - Distribuição em número absoluto e relativo (%) dos sujeitos da pesquisa incluídos no grupo probiótico e placebo, quanto às variáveis: quantidade inicial de UFCs, gênero, etnia, grau de escolaridade, tipo de prótese, condição de higiene da prótese, tipo de alimentação, condição de saúde geral e/ou doenças, utiliza medicamentos, possui alergia, condição do intestino e se apresenta ardência bucal e boca seca

Variáveis	Grupo				Total	
	Probiótico		Placebo			
	Frequência		Frequência		Frequência	
	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
UFC inicial						
10 ²	8	26,7	4	16,0	12	21,8
10 ³	8	26,7	8	32,0	16	29,1
10 ⁴	8	26,7	8	32,0	16	29,1
10 ⁵	6	20,0	1	4,0	7	12,7
10 ⁶	0	0,0	3	12,0	3	5,5
10 ⁷	0	0,0	1	4,0	1	1,8
Gênero						
Feminino	22	78,6	13	61,9	35	71,4
Masculino	6	21,4	8	38,1	14	28,6
Etnia						
Leucoderma	13	50,0	9	47,4	22	48,9
Melanoderma	12	46,2	8	42,1	20	44,4
Outros	1	3,9	2	10,5	3	6,7

continuação

Variáveis	Grupo				Total	
	Probiótico		Placebo			
	Frequência		Frequência		Frequência	
	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
Escolaridade						
Nenhuma	0	0,0	4	18,2	4	8,0
Fund. incompleto	19	67,9	12	54,6	31	62,0
Fund. completo	2	7,1	4	18,2	6	12,0
Médio completo	5	17,9	2	9,1	7	14,0
Sup. incompleto	1	3,6	0	0,0	1	2,0
Sup. completo	1	3,6	0	0,0	1	2,0
Prótese						
Unimaxilar	6	21,4	2	9,1	8	16,0
Bimaxilar	22	78,6	20	90,9	42	84,0
Higiene						
Limpa	5	25,0	4	22,2	9	23,7
Ruim	15	75,0	14	77,8	29	76,3
Alimentação						
Normal	24	92,3	17	81,0	41	87,2
Ruim	2	7,7	4	19,1	6	12,8
Sáude						
Sáude boa	7	25,0	4	19,1	11	22,5
Hipertensão	12	42,9	14	66,7	26	53,1
Colesterol	7	25,0	2	9,5	9	18,4
Diabetes	8	28,6	3	14,3	11	22,5
Triglicérides	6	21,4	1	4,8	7	14,3
Doença cardíaca	2	7,1	3	14,3	5	10,2
Outras doenças	7	25,0	8	38,1	15	30,6
Usa medicamentos						
Não	10	38,5	1	5,3	11	24,4
Sim	16	61,5	18	94,7	34	75,6
Tem alergia						
Não	17	63,0	14	66,7	31	64,6
Sim	10	37,0	7	33,3	17	35,4
Intestino						
Sem problema	22	78,6	12	63,2	34	72,3
Diarreia frequente	2	7,1	1	5,3	3	6,4
Intestino preso	4	14,3	6	31,6	10	21,3

continuação

Variáveis	Grupo				Total	
	Probiótico		Placebo			
	Frequência		Frequência		Frequência	
	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
Ardência bucal						
Não	25	92,6	18	90,0	44	91,5
Sim	2	7,4	2	10,0	4	8,5
Boca seca						
Não	20	74,1	13	61,9	33	68,8
Sim	7	25,9	8	38,1	15	31,3

Os dados expostos na tabela 5.1 permitem-nos observar uma uniformidade nas características entre os dois grupos, tratamento e placebo, importantes do ponto de vista estatístico. Quanto à prevalência de *Candida*, antes do início do tratamento, a maior parte dos pacientes tinha um valor da UFC de 10^2 (21,8%), 10^3 (29,1%) ou 10^4 (29,1%), ou seja, pode-se observar que 80% deles enquadram-se abaixo de 10^4 UFC/ mL, valor este considerado de baixa prevalência de *Candida*. O máximo valor de UFC inicial foi de 10^7 que foi observado em apenas um paciente.

Foi observado que o gênero feminino predominou nesta pesquisa em 71,4% (78,6% no grupo tratamento e 61,9% no grupo placebo), assim como, a maioria utilizavam próteses bimaxilares (84%) e apresentavam higiene ruim inicialmente (76,3%). A etnia teve distribuição equilibrada entre leucodermas (48,9%) e melanodermas (44,4%). A escolaridade, em geral pode ser considerada baixa, com 62,0% dos pacientes com curso fundamental incompleto, 8,0% sem nenhum estudo e apenas 2,0% com curso superior completo.

Uma alta proporção dos sujeitos tinha alimentação normal (87,2%), composta de arroz, feijão, legumes, carnes (macias) e frutas. Uma baixa proporção à algum tipo de alergia (24,4%) ou problemas intestinais (27,7%). As doenças mais frequentes observadas foram: hipertensão (53,1%), diabetes (22,5%) e colesterol alto (18,4%), enquanto apenas 22,5% dos pacientes tinha a saúde boa. A maioria usava medicamentos (75,6%) para controlar essas doenças.

A tabela 5.2 mostra a distribuição da frequência das espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal dos usuários de próteses totais, de acordo com o grupo

tratamento e placebo. Estas espécies foram obtidas a partir da coleta das amostras, por meio do método *swab* na região do palato, e identificação das espécies.

Tabela 5.2 - Distribuição de frequências das espécies de *Candida*

<i>Candida</i>	Grupo				Total	
	Tratamento		Placebo			
	Frequência		Frequência		Frequência	
	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
<i>C. albicans</i>	12	46,2	13	59,1	25	52,1
<i>C. guilliermondii</i>	7	26,9	8	36,4	15	31,3
<i>C. tropicalis</i>	5	19,2	3	13,6	8	16,7
<i>C. glabrata</i>	5	19,2	3	13,6	8	16,7
Outras	2	7,7	1	4,6	3	6,3

A espécie de *Candida* com maior prevalência na amostra foi de *C. albicans* que estava presente em 52,1% dos pacientes, seguida pela *C. guilliermondii* (31,3%), *C. tropicalis* (16,7%) e *C. glabrata* (16,7%). Apenas 6,3% dos pacientes tinham as espécies *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. parapsilosis*. Em ambos os grupos, a espécie de *Candida albicans* foi a mais frequente (46,2% no grupo tratamento e 59,1% no grupo placebo) e as espécies, de modo geral, apresentaram uniformidade de distribuição entre os grupos.

A média e desvio padrão (DP) das variáveis quantitativas foram dispostos de acordo com o grupo: tratamento e placebo (tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Média e desvio padrão das variáveis quantitativas: idade, condição sócio-econômica e idade da prótese

Variável	Grupo				Total	
	Tratamento		Placebo			
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Idade	61,2	9,2	62,1	10,7	61,6	9,8
Pessoas na resid.	4,5	1,8	3,6	1,8	4,1	1,9
Núm. de cômodos	4,0	1,4	3,7	1,5	3,9	1,4
Renda (em mín.)	3,0	2,1	2,3	1,1	2,7	1,8
Idade da prótese	5,7	3,9	6,2	3,9	5,9	3,9

A idade variou de 40 a 80 anos e a média apresentou-se semelhante entre os grupos (61,2 anos no grupo tratamento e 62,1 no grupo placebo). A idade média dos pacientes era 61,6 anos, ou seja, os participantes eram idosos. Com os dados de renda média (2,7 salários mínimos), número médio de pessoas que residiam na mesma casa (4,1) e o número médio de cômodos (3,9), observou-se que o grupo estudado tinha condição sócio-econômica baixa. A idade média da prótese era de 5,9 anos, indicando que as próteses estavam sendo utilizadas um pouco mais de tempo que o recomendável, pois se recomenda trocar as próteses a cada 5 anos.

As medidas descritivas são, em geral, próximas em ambos os grupos. A variável em que a distribuição de frequências apresentou maior discrepância nos dois grupos foi o uso de medicamentos (tabela 5.1). No grupo placebo, apenas 5,3% não usavam medicamentos, enquanto este número era de 38,5% no grupo tratamento. No entanto, esta diferença não é um problema, uma vez que na parte inferencial em que foi avaliado o sucesso do tratamento as variáveis também foram estudadas conjuntamente a partir de modelos de regressão.

5.1.2 Análise inferencial

Foram desenvolvidos testes e modelos para se avaliar o sucesso do tratamento, a presença ou não de *Candida albicans* e quantidade de UFC em relação às demais variáveis do estudo. As 3 subseções seguintes descrevem cada uma dessas análises. Em todas as análises é importante lembrar que a população do estudo é composta de usuários de próteses totais e portadores assintomáticos de *Candida*. Portanto, todas as conclusões discutidas são válidas apenas para essa população.

5.1.2.1 Estudo do sucesso do tratamento

O valor da UFC de *Candida* foi avaliado antes do início do tratamento e após 5 semanas. Foi considerado sucesso de tratamento cujo valor da UFC ficou igual a

zero após 5 semanas. Para testar se a probabilidade do sucesso no tratamento variava de acordo com cada uma das variáveis do estudo, utilizou-se inicialmente para as variáveis qualitativas os testes qui-quadrado tradicionais (assintótico), testes qui-quadrado exatos ou testes exatos de Fisher, dependendo das características de cada variável (143). Para as variáveis quantitativas foram utilizados modelos de regressão logística simples (144). O nível de significância considerado nestes testes e nos demais deste trabalho foi de 5%. As variáveis significantes foram, em seguida, estudadas a partir de um modelo de regressão logística múltipla, para verificar se a probabilidade do sucesso no tratamento variou de acordo com cada uma dessas variáveis.

Após a intervenção, observamos o sucesso do tratamento no grupo que utilizou os probióticos, *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101, assim como o fracasso do tratamento para o grupo placebo, conforme representado na tabela 5.4. e na figura 5.2.

Tabela 5.4 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por grupo

Grupo	Resultado do tratamento				Total		Valor p
	Fracasso		Sucesso				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
Probiótico	5	16,7	25	83,3	30	100,0	< 0,0001
Placebo	23	92,0	2	8,0	25	100,0	
Total	28	50,9	27	49,1	55	100,0

Figura 5.2 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por grupo

Dentre os 30 pacientes do grupo experimental (probióticos), 25 (83,3%) tiveram sucesso no tratamento. Já no grupo placebo, apenas 2 (8,0%) tiveram o valor de UFC zerado após 5 semanas de tratamento. Concluimos que a probabilidade de sucesso no tratamento é maior no grupo experimental do que no grupo placebo ($p < 0,0001$). Vale ressaltar, ainda, que dos 5 pacientes do grupo que utilizou os probióticos, que não tiveram sucesso no tratamento, 4 deles apresentaram redução parcial da mesma, embora o valor da UFC não tenha sido reduzido a zero após 5 semanas de tratamento.

Além de se conhecer a frequência das espécies de *Candida* destes sujeitos da pesquisa, a finalidade da identificação das espécies foi de avaliar se os probióticos atuavam seletivamente, ou seja, se havia associação entre o sucesso do tratamento e as espécies de *Candida*, após a intervenção, segundo a tabela 5.5, que apresenta os resultados para as variáveis de espécie da *Candida*.

Tabela 5.5 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por espécie de *Candida*

Candida	Resultado do tratamento				Total		Valor p
	Fracasso		Sucesso				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
C. albicans							0,154
Não	10	43,5	13	56,5	23	100,0	
Sim	16	64,0	9	36,0	25	100,0	
C. guilliermondii							0,482
Não	19	57,6	14	42,4	33	100,0	
Sim	7	46,7	8	53,3	15	100,0	
C. tropicalis							0,442
Não	23	57,5	17	42,5	40	100,0	
Sim	3	37,5	5	62,5	8	100,0	
C. glabrata							1,000
Não	22	55,0	18	45,0	40	100,0	
Sim	4	50,0	4	50,0	8	100,0	
Outras							1,000
Não	24	53,3	21	46,7	45	100,0	
Sim	2	66,7	1	33,3	3	100,0	

Entre aqueles que tinham *C. albicans*, por exemplo, 36,0% dos pacientes tiveram sucesso no tratamento, enquanto entre aqueles que não tinham essa espécie 56,5% tiveram sucesso ($p = 0,154$). Realizando-se os testes para cada uma das espécies, concluiu-se não haver indícios de que a probabilidade do tratamento ter sucesso varie em função da presença ou não de qualquer uma das espécies de *Candida* ($p > 0,15$).

A tabela 5.6 apresenta os resultados para o UFC inicial, para as variáveis sócio-demográficas qualitativas e para o tipo e higiene da prótese.

Tabela 5.6 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por UFC inicial, variáveis sócio-demográficas qualitativas e tipo e higiene da prótese

Variável	Resultado do tratamento				Total		Valor p
	Fracasso		Sucesso				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
UFC inicial							0,197
10 ²	4	33,3	8	66,7	12	100,0	
10 ³	9	56,3	7	43,8	16	100,0	
10 ⁴	9	56,3	7	43,8	16	100,0	
10 ⁵	2	28,6	5	71,4	7	100,0	
10 ⁶	3	100,0	0	0,0	3	100,0	
10 ⁷	1	100,0	0	0,0	1	100,0	
Gênero							0,240
Feminino	16	45,7	19	54,3	35	100,0	
Masculino	9	64,3	5	35,7	14	100,0	
Etnia							0,732
Leucoderma	10	45,5	12	54,6	22	100,0	
Melanoderma	11	55,0	9	45,0	20	100,0	
Outros	2	66,7	1	33,3	3	100,0	
Escolaridade							0,138
Nenhum	4	100,0	0	0,0	4	100,0	
Fund. incompleto	13	41,9	18	58,1	31	100,0	
Fund. completo	4	66,7	2	33,3	6	100,0	
Médio completo	4	57,1	3	42,9	7	100,0	
Sup. incompleto	1	100,0	0	0,0	1	100,0	
Sup. completo	0	0,0	1	100,0	1	100,0	
Prótese							0,704
Unimaxilar	5	62,5	3	37,5	8	100,0	
Bimaxilar	21	50,0	21	50,0	42	100,0	
Higiene							0,450
Limpa	4	44,4	5	55,6	9	100,0	
Ruim	18	62,1	11	37,9	29	100,0	
Alimentação							1,000
Normal	22	53,7	19	46,3	41	100,0	
Ruim	3	50,0	3	50,0	6	100,0	
Usa medicamentos							0,035
Não	2	18,2	9	81,8	11	100,0	
Sim	20	58,8	14	41,2	34	100,0	
Tem alergia							0,489
Não	15	48,4	16	51,6	31	100,0	
Sim	10	58,8	7	41,2	17	100,0	

continuação

Variável	Resultado do tratamento				Total		Valor p
	Fracasso		Sucesso				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
Intestino							0,402
Sem problema	15	44,1	19	55,9	34	100,0	
Diarréia frequente	1	33,3	2	66,7	3	100,0	
Intestino preso	7	70,0	3	30,0	10	100,0	
Ardência bucal							1,000
Não	22	51,2	21	48,8	43	100,0	
Sim	2	50,0	2	50,0	4	100,0	
Boca seca							0,907
Não	17	51,5	16	48,5	33	100,0	
Sim	8	53,3	7	46,7	15	100,0	

Entre as mulheres, por exemplo, 54,3% tiveram sucesso no tratamento, enquanto entre os homens, 35,7% tiveram sucesso ($p = 0,240$). Concluiu-se, ainda, não haver indícios de que a probabilidade do tratamento ter sucesso varie em função de qualquer uma dessas variáveis ($p > 0,13$).

Entre as pessoas que usavam medicamento, 41,2% tiveram sucesso no tratamento, enquanto entre aqueles que não usavam nenhum remédio observou-se sucesso no tratamento em 81,8% dos pacientes ($p = 0,035$). Assim, considerando-se essa variável isoladamente, há indícios de que as pessoas que usam medicamento tenham uma menor probabilidade de ter sucesso no tratamento. No entanto, foi necessária uma avaliação a partir de modelos de regressão para checar se a variável realmente estava relacionada com a probabilidade de ter sucesso no tratamento. Concluiu-se não haver indícios de que a probabilidade do tratamento ter sucesso varie em função das demais variáveis de saúde ($p > 0,40$).

A tabela 5.7 apresenta os resultados para as variáveis de doença.

Tabela 5.7 - Distribuição de frequências do sucesso ou não do tratamento segmentada por doenças do paciente

Variável	Resultado do tratamento				Total		Valor p
	Fracasso		Sucesso				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
Saúde boa							0,675
Não	20	52,6	18	47,4	38	100,0	
Sim	5	45,5	6	54,6	11	100,0	
Hipertensão							0,033
Não	8	34,8	15	65,2	23	100,0	
Sim	17	65,4	9	34,6	26	100,0	
Colesterol elevado							0,725
Não	21	52,5	19	47,5	40	100,0	
Sim	4	44,4	5	55,6	9	100,0	
Diabetes							0,791
Não	19	50,0	19	50,0	38	100,0	
Sim	6	54,6	5	45,5	11	100,0	
Triglicérides elevado							0,702
Não	22	52,4	20	47,6	42	100,0	
Sim	3	42,9	4	57,1	7	100,0	
Doença cardíaca							1,000
Não	22	50,0	22	50,0	44	100,0	
Sim	3	60,0	2	40,0	5	100,0	
Outras doenças							0,686
Não	18	52,9	16	47,1	34	100,0	
Sim	7	46,7	8	53,3	15	100,0	

Entre as pessoas com hipertensão, apenas 34,8% tiveram sucesso no tratamento, enquanto entre aqueles que não tinham a doença observou-se sucesso no tratamento em 65,4% dos pacientes ($p = 0,033$). Assim, considerando-se essa variável isoladamente, há indícios de que pessoas com hipertensão tenham uma menor probabilidade de ter sucesso no tratamento. No entanto, foi necessário estudar essa variável conjuntamente com outras variáveis significantes para verificar se realmente a probabilidade do tratamento ter sucesso variou em função do paciente ter ou não hipertensão ou se a variável só foi significativa devido ao efeito de outras variáveis (e isso foi feito no final desta subseção). Concluiu-se, ainda, não haver indícios de que a probabilidade do tratamento ter sucesso varie em função das demais variáveis de doença ($p > 0,67$).

A tabela 5.8 apresenta os resultados do sucesso ou fracasso do tratamento para as variáveis quantitativas do estudo, como idade, número de pessoas que residem no mesmo lar, número de cômodos da residência, renda familiar em salários mínimos e idade (anos) das próteses.

Tabela 5.8 - Média e desvio padrão das variáveis quantitativas segmentados pelo sucesso ou não do tratamento

Variável	Resultado do tratamento				Total		Valor P
	Fracasso		Sucesso				
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Idade	63,0	10,6	60,1	8,8	61,6	9,8	0,311
Pessoas na resid.	3,8	1,8	4,5	2,0	4,1	1,9	0,197
Núm. de cômodos	3,9	1,4	3,8	1,5	3,9	1,4	0,886
Renda (em mín.)	2,4	1,2	2,9	2,2	2,7	1,8	0,346
Idade da prótese	6.3	3.7	5.6	4.0	5.9	3.9	0.568

Para estas variáveis a parte descritiva apresentada traz a média e o desvio padrão de cada variável entre aqueles que tiveram sucesso no tratamento e entre aqueles que não tiveram sucesso. No entanto, como a variável resposta neste caso é o sucesso ou não do tratamento, conforme já mencionado, foram ajustados modelos de regressão logística simples para testar se a probabilidade do tratamento ter sucesso varia de acordo com cada uma das variáveis, ao invés de testar se a média de cada variável é diferente entre quem tem sucesso ou não no tratamento. Não há indícios de que a probabilidade do tratamento ter sucesso varie de acordo com alguma das variáveis quantitativas do estudo ($p > 0,19$).

Assim, de todas as variáveis analisadas individualmente, apenas 3 foram significantes para o sucesso no tratamento: grupo (probiótico ou placebo), hipertensão (tem ou não) e uso de medicamento (sim ou não). Ajustou-se um modelo de regressão logística múltipla para o sucesso ou não do tratamento tendo essas 3 variáveis como preditoras. A tabela 5.9 apresenta esses resultados.

Tabela 5.9 - Resultados do modelo de regressão logística para o sucesso ou não do tratamento

Variáveis do modelo final	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances		
					Pontual	IC (95%)	
Intercepto		-2,442	0,737				
Grupo	Placebo			< 0,0001			
	Tratamento	4,052	0,885		57,5	10,1	325,9
Variáveis Excluídas	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances		
					Pontual	IC (95%)	
Hipertensão	Não			0,1842			
	Sim						
Usa medicamentos	Não			0,9439			
	Sim						

Na presença das demais variáveis significantes, pode-se notar que a probabilidade do tratamento ter sucesso varia apenas em função do grupo ($p < 0,0001$). Há indícios de que hipertensão ($p = 0,18$) e medicamentos ($p = 0,94$) foram significantes na análise individual apenas porque o grupo placebo tem uma maior proporção de pacientes hipertensos e uma maior proporção de pacientes que usam medicamentos do que o grupo probiótico.

Como o estudo é prospectivo e apenas uma variável foi significativa, podemos analisar o risco relativo entre os níveis da variável grupo. A tabela 5.10 apresenta os resultados.

Tabela 5.10 - Risco relativo do sucesso do tratamento entre pacientes tratados com probiótico e tratados com placebo

Risco Relativo		
Pontual	IC (95%)	
10,4	2,7	39,7

Estima-se que o risco de um paciente do grupo probiótico ter sucesso no tratamento seja 10,4 vezes o risco de um paciente do grupo placebo ter sucesso no tratamento. Com 95% de confiança, estima-se ainda que a razão entre esses riscos esteja entre 2,7 e 39,7.

5.1.2.2 Estudo da presença ou não de *Candida albicans*

Nesta subseção foi estudada se a presença ou não de *C. albicans* variou em função de outras variáveis do estudo. A presença ou não de *C. albicans* também é uma variável binária, portanto, foram utilizados os mesmos testes e modelos mencionados na subseção anterior (5.1.2.1).

A tabela 5.11 apresenta os resultados para as variáveis sócio-demográficas qualitativas (gênero, etnia e grau de escolaridade), tipo de prótese (uni ou bimaxilar) e higiene da prótese (limpa ou ruim).

Tabela 5.11 - Distribuição de frequências da presença ou não de *C. albicans* segmentada por variáveis sócio-demográficas qualitativas e tipo e higiene da prótese

Variável	Presença de <i>C. albicans</i>				Total		Valor p
	Não		Sim				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
Gênero							0,318
Feminino	15	46,97	17	53,1	32	100,0	
Masculino	8	66,7	4	33,3	12	100,0	
Etnia							0,720
Leucoderma	11	52,4	10	47,6	21	100,0	
Melanoderma	10	58,8	7	41,2	17	100,0	
Outros	1	33,3	2	66,7	3	100,0	
Escolaridade							0,131
Nenhum	2	50,0	2	50,0		100,0	
Fund. incompleto	16	61,5	10	38,5		100,0	
Fund. completo	0	0,0	0	0,0		100,0	
Médio completo	1	14,3	6	85,7		100,0	
Sup. incompleto	1	100,0	0	0,0		100,0	
Sup. completo	1	100,0	0	0,0		100,0	
Prótese							1,000
Unimaxilar	3	50,0	3	50,0	6	100,0	
Bimaxilar	20	51,3	19	48,7	39	100,0	
Higiene							0,712
Limpa	3	33,3	6	66,7	9	100,0	
Ruim	11	42,3	15	57,7	26	100,0	

Observou-se que 53,1% das mulheres apresentaram *C. albicans*, enquanto os homens apenas 33,3% tinham essa espécie de *Candida* ($p = 0,318$). Não há

indícios de que a probabilidade de apresentar *C. albicans* varie em função de alguma das variáveis sócio-demográficas qualitativas e do tipo e higiene da prótese ($p > 0,13$).

Quanto à condição de saúde dos sujeitos da pesquisa, ser boa ou apresentar alguma doença, como hipertensão, colesterol, diabetes, triglicérides, são apresentados na tabela 5.12.

Tabela 5.12 - Distribuição de frequências da presença ou não de *C. albicans* segmentada por doenças do paciente

Variável	Presença de <i>C. albicans</i>				Total		Valor p
	Não		Sim				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
Sáude boa							0,281
Não	19	55,9	15	44,1	34	100,0	
Sim	3	30,0	7	70,0	10	100,0	
Hipertensão							1,000
Não	10	50,0	10	50,0	20	100,0	
Sim	12	50,0	12	50,0	24	100,0	
Colesterol							1,000
Não	17	48,6	18	51,4	35	100,0	
Sim	5	55,6	4	44	9	100,0	
Diabetes							0,457
Não	16	45,7	19	54,3	35	100,0	
Sim	6	66,7	3	33,3	9	100,0	
Triglicerídes							1,000
Não	19	51,4	18	48,7	37	100,0	
Sim	3	42,9	4	57,1	7	100,0	
Doença cardíaca							1,000
Não	19	48,7	20	48,7	37	100,0	
Sim	3	60,0	4	57,1	7	100,0	
Outras doenças							0,322
Não	14	45,2	17	54,8	31	100,0	
Sim	8	61,5	5	38,5	13	100,0	

Verificamos que entre aqueles com boa saúde, por exemplo, 44,1% apresentaram *C. albicans*, enquanto entre aqueles com alguma doença, 70,0%, tinham essa espécie de *Candida* ($p = 0,281$). Portanto, também não há indícios de que a probabilidade de apresentar *C. albicans* varie em função das variáveis de doença ($p > 0,28$).

Avaliamos a presença ou não de *C. albicans* com as variáveis: condição alimentar (normal ou ruim), utilização de medicamentos, alergia, intestino (sem problemas, com diarreia ou constipado), ardência bucal e boca seca (tabela 5.13).

Tabela 5.13 - Distribuição de frequências da presença ou não de *C. albicans* segmentada por variáveis de saúde

Variável	Presença de <i>C. albicans</i>				Total		Valor p
	Não		Sim				
	Frequência		Frequência		Frequência		
	Absol	%	Absol	%	Absol	%	
Alimentação							0,343
Normal	20	54,1	17	46,0	37	100,0	
Ruim	1	20,0	4	80,0	5	100,0	
Usa medicamentos							1,000
Não	5	55,6	4	44,4	9	100,0	
Sim	16	51,6	15	48,4	31	100,0	
Tem alergia							0,835
Não	14	50,0	14	50,0	28	100,0	
Sim	7	46,7	8	53,3	15	100,0	
Intestino							<0,001
Sem problema	19	63,3	11	36,7	30	100,0	
Diarréia frequente	2	100,0	0	0,0	2	100,0	
Intestino preso	0	0,0	10	100,0	10	100,0	
Lesão							0,173
Não	16	61,5	10	38,5	26	100,0	
Hiperpl. e hiperem.	5	38,5	8	61,5	13	100,0	
Ardência bucal							0,333
Não	21	55,3	17	44,7	38	100,0	
Sim	1	25,0	3	75,0	4	100,0	
Boca seca							0,586
Não	14	48,3	15	51,7	29	100,0	
Sim	8	57,1	6	42,9	14	100,0	

Tivemos como resultado que aqueles com intestino preso, 100% apresentaram *C. albicans*, enquanto entre aqueles sem problemas intestinais, apenas 36,7% tinham essa espécie de *Candida* ($p < 0,001$). Dessa forma, há fortes indícios de que os usuários de próteses totais, portadores assintomáticos de *Candida* e com intestino preso tenham maior probabilidade de apresentar *C. albicans* do que os usuários de próteses totais, portadores assintomáticos de *Candida*, mas sem esse problema intestinal. Concluiu-se, ainda, não haver indícios

de que a probabilidade de apresentar *C. albicans* varie em função das demais variáveis de saúde ($p > 0,17$).

Das variáveis quantitativas (idade, quantidade de pessoas que residem na mesma casa, número de cômodos, renda familiar e idade da prótese), podemos notar que não há indícios de que a probabilidade de apresentar *C. albicans* varie em função de algumas das variáveis quantitativas do estudo ($p > 0,07$) (tabela 5.14).

Tabela 5.14 - Média e desvio padrão das variáveis quantitativas segmentados pela presença ou não de *C. albicans*

Variável	Presença de <i>Candida albicans</i>				Total		Valor p
	Não		Sim				
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
Idade	59,9	9,4	63,0	11,0	61,4	10,2	0,329
Pessoas na resid.	4,0	1,9	4,1	2,0	4,0	1,9	0,753
Núm. de cômodos	3,4	1,5	4,2	1,4	3,8	1,5	0,074
Renda (em mín.)	2,5	1,2	2,7	2,3	2,6	1,8	0,762
Idade da prótese	6.2	4,0	6.6	3.6	6.4	3,8	0,741

Como a única variável significativa para a presença ou não de *C. albicans* foi o intestino, podemos estimar diretamente o risco relativo entre os níveis dessa variável.

A tabela 5.15 apresenta os resultados.

Tabela 5.15 - Risco relativo da presença de *C.albicans* entre pacientes com intestino preso e demais pacientes

Risco Relativo		
Pontual	IC (95%)	
2,9	1,8	4,7

Estima-se que o risco de um indivíduo que tem intestino preso apresentar *C. albicans* seja 2,9 vezes o risco de um indivíduo que não tenha este problema intestinal ter essa espécie de *Candida*. Com 95% de confiança, estima-se ainda que a razão entre esses riscos esteja entre 1,8 e 4,7.

5.1.2.3 Quantidade de UFC

O valor da quantidade de UFC inicial é uma variável que na amostra assume apenas 6 diferentes valores: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 ou valores de 2 a 7 se considerarmos em transformação logarítmica. Como a variável assume poucos diferentes valores e esses valores não se iniciam em zero, ela não pode ser ajustada pelas distribuições de probabilidade discretas mais conhecidas. Dessa forma, consideramos o valor de UFC como ordinal e para verificar se a distribuição desta variou em função de outras variáveis do estudo, utilizamos o modelo de regressão logística ordinal com chances proporcionais (144).

Para quase todas as variáveis do estudo, não se rejeitou a hipótese de que as chances são proporcionais, exceto para as variáveis: sexo e ardência bucal. Por esse motivo, testamos se a distribuição dos valores de UFC inicial variava em função do sexo e da ardência bucal a partir de testes qui-quadrado exatos.

A tabela 5.16 apresenta os resultados para as variáveis: sócio demográficas qualitativas, tipo de prótese e higiene da mesma. Verificou-se que entre as mulheres, 28,6% apresentaram UFC inicial 10^2 , 17,1% tinham UFC inicial 10^3 e 54,3% apresentaram UFC inicial 10^4 ou maior, enquanto entre os homens 7,1% apresentaram UFC inicial 10^2 , 64,3% tinham UFC inicial 10^3 e 28,6% apresentaram UFC inicial 10^4 ou maior ($p = 0,012$).

Tabela 5.16 - Distribuição de frequências da quantidade de UFC inicial segmentada por variáveis sócio demográficas qualitativas e tipo e higiene da prótese

Variável	UFC inicial (em potências de 10)								Valor p
	2		3		4		≥ 5		
	Frequência		Frequência		Frequência		Frequência		
	#	%	#	%	#	%	#	%	
Gênero									0,012
Feminino	10	28,6	6	17,1	11	31,4	8	22,9	
Masculino	1	7,1	9	64,3	2	14,3	2	14,3	
Etnia									0,280
Leucoderma	6	27,3	4	18,2	5	22,7	7	31,8	
Melanoderma	5	25,0	9	45,0	4	20,0	2	10,0	
Outros	0	0,0	2	66,7	0	0,0	1	33,3	
Escolaridade									0,168
Nenhum	2	50,0	1	25,0	0	0,0	1	25,0	
Fund. incompleto	5	16,1	8	25,8	9	29,0	9	29,0	
Fund. completo	1	16,7	4	66,7	1	16,7	0	0,0	
Médio completo	3	42,9	1	14,3	2	28,6	1	14,3	
Sup. incompleto	0	0,0	1	100,0	0	0,0	0	0,0	
Sup. completo	0	0,0	0	0,0	1	100,0	0	0,0	
Prótese									0,526
Unimaxilar	2	25,0	3	37,5	2	25,0	1	12,5	
Bimaxilar	9	21,4	12	28,6	11	26,2	10	23,8	
Higiene									0,545
Limpa	4	44,4	1	11,1	2	22,2	2	22,2	
Ruim	7	24,1	7	24,1	10	34,5	5	17,2	

Dessa forma, há indícios de que, antes do tratamento, as mulheres têm maior probabilidade que os homens de apresentarem valores iguais ou maiores que 10^4 UFC, pois eles apresentaram maior probabilidade de ter quantidade de 10^3 UFC. Concluiu-se ainda não haver indícios de que a distribuição da quantidade de UFC inicial varie em função de alguma das demais variáveis, etnia ($p = 0,280$), grau de escolaridade ($p = 0,16$), tipo de prótese ($p = 0,526$) e condição de higiene da mesma ($p = 0,545$).

As tabelas 5.17 e 5.18 apresentam os resultados para as variáveis de saúde e doença, incluindo alimentação e medicamentos, há indícios de que a distribuição dos valores de UFC inicial varie apenas em função da ardência bucal ($p = 0,026$). Entre aqueles com ardência bucal, 75,0% apresentaram UFC inicial de 10^2 , enquanto aqueles sem ardência bucal apenas 16,3% tinham UFC de 10^2 antes do início de tratamento.

Tabela 5.17 - Distribuição de frequências da quantidade de UFC inicial segmentada por doenças do paciente

Variável	UFC inicial (em potências de 10)								Valor p
	2		3		4		≥ 5		
	Frequência		Frequência		Frequência		Frequência		
	#	%	#	%	#	%	#	%	
Sáude boa									0,832
Não	8	21,1	12	31,6	10	26,3	8	21,1	
Sim	3	27,3	2	18,2	3	27,3	3	27,3	
Hipertensão									0,942
Não	5	21,7	7	30,4	6	26,1	5	21,7	
Sim	6	23,1	7	26,9	7	26,9	6	23,1	
Colesterol									0,606
Não	10	25,0	11	27,5	10	25,0	9	22,5	
Sim	1	11,1	3	33,3	3	33,3	2	22,2	
Diabetes									0,832
Não	8	21,1	12	31,6	10	26,3	8	21,1	
Sim	3	27,3	2	18,2	3	27,3	3	27,3	
Triglicerídes									0,420
Não	9	21,4	12	28,6	10	23,8	11	26,2	
Sim	2	28,6	2	28,6	3	42,9	0	0,0	
Doença cardíaca									0,165
Não	9	20,5	12	27,3	12	27,3	11	25,0	
Sim	2	40,0	2	40,0	1	20,0	0	0,0	
Outras doenças									0,864
Não	8	23,5	9	26,5	10	29,4	7	20,6	
Sim	3	20,0	5	33,3	3	20,0	4	26,7	

Tabela 5.18 - Distribuição de frequências da UFC inicial segmentada por variáveis de saúde

Variável	UFC inicial (em potências de 10)								Valor p
	2		3		4		≥ 5		
	Frequência		Frequência		Frequência		Frequência		
	#	%	#	%	#	%	#	%	
Alimentação									0,850
Normal	10	24,4	12	29,3	11	26,8	8	19,5	
Ruim	1	16,7	2	33,3	2	33,3	1	16,7	
Usa medicamentos									0,267
Não	2	18,2	2	18,2	3	27,3	4	36,4	
Sim	8	23,5	11	32,4	8	23,5	7	20,6	
Tem alergia									0,903
Não	7	22,6	9	29,0	7	22,6	8	25,8	
Sim	4	23,5	4	23,5	6	35,3	3	17,7	
Intestino									0,517
Sem problema	7	21	11	32	8	24	8	24	
Diarréia frequente	0	0	1	33	0	0	2	67	
Intestino preso	3	30	2	20	4	40	1	10	
Lesão									0,394
Não	5	16,7	10	33,3	7	23,3	8	26,7	
Hiperpl. e hiperem.	5	38,5	2	15,4	3	23,1	3	23,1	
Ardência bucal									0,026
Não	7	16	13	30	13	30	10	23	
Sim	3	75	0	0	0	0	1	25	
Boca seca									0,115
Não	7	21,2	6	18,2	11	33,3	9	27,3	
Sim	4	26,7	7	46,7	2	13,3	2	13,3	

Dessa forma, há indícios de que pacientes com ardência bucal apresentem maior probabilidade de ter UFC inicial menor do que aqueles sem ardência bucal. Para as demais variáveis não há indícios de que a distribuição da quantidade UFC inicial varie em função de qualquer uma delas ($p > 0,11$).

Para o estudo da distribuição dos valores de UFC inicial em função das variáveis quantitativas do estudo (idade dos sujeitos da pesquisa, número de pessoas que residem na mesma casa, número de cômodos, renda familiar e idade da prótese) observamos que também não houve resultado significativo ($p > 0,103$) (tabela 5.19).

Tabela 5.19 - Média e desvio padrão das variáveis quantitativas segmentados pela UFC inicial

Variável	UFC inicial (em potências de 10)								Valor p
	2		3		4		≥ 5		
	Méd	DP	Méd	DP	Méd	DP	Méd	DP	
Idade	64,3	9,8	60,1	10,9	60,2	8,4	62,5	10,4	0,698
Pessoas na resid.	4,6	1,8	4,5	2,5	3,5	1,5	3,7	1,3	0,162
Núm. de cômodos	4,2	1,1	3,9	1,6	3,8	1,5	3,6	1,6	0,345
Renda (em mín.)	2,9	1,9	2,8	2,3	2,1	0,9	2,9	1,5	0,651
Idade da prótese	8,5	2,9	5,0	4,0	4,9	3,6	5,9	4,1	0,103

Como as variáveis significantes foram aquelas que a suposição de chances proporcionais foi rejeitada, não foi possível estudar as duas conjuntamente a partir de um modelo de regressão. Assim, estimaram-se separadamente apenas riscos relativos entre os níveis das duas variáveis significantes. A tabela 5.20 apresenta os resultados.

Tabela 5.20 - Risco relativo de determinados valores de UFC inicial entre níveis de sexo e ardência bucal

Variável	UFC inicial (potências de 10)	Maior Risco	Risco Relativo		
			Pontual	IC (95%)	
Gênero	3	Masculino	3,8	1,6	8,6
	2 ou 4 ou maior	Feminino	2,3	1,1	4,8
Ardência bucal	2	Sim	4,6	1,9	11,1

Estimou-se que o risco de um homem ter UFC de 10^3 antes do tratamento seja 3,8 vezes o risco de uma mulher ter UFC de 10^3 antes do tratamento. Com 95% de confiança, estimou-se ainda que a razão entre esses riscos esteja entre 1,6 e 8,6. Estimou-se também que o risco de um paciente com ardência bucal ter UFC de 10^2 antes do tratamento seja 4,6 vezes o risco de um paciente sem ardência bucal ter UFC de 10^2 antes do tratamento. Com 95% de confiança, estima-se que a razão entre esses riscos esteja entre 1,9 e 11,1.

5.2 Bacteriocinas

Dos 65 isolados de *Candida* sp. testados, nenhum apresentou a formação do halo de inibição com o sobrenadante dos cinco *Lactobacillus*, ou seja, não houve produção de bacteriocinas pelos probióticos com efeito inibitório contra *Candida*

isoladas da cavidade bucal. Apenas foi observada a formação de halo no controle positivo, placa de Petri com *Listeria*, que em teste subsequente foi confirmado que o sobrenadante de *L. rhamnosus* Lr-32 produziu bacteriocina que inibiu *Listeria*.

5.3 Ação antifúngica dos probióticos: *Lactobacillus* sp, teste *in vitro*

Foram isoladas 82 amostras de *Candida* de origem do palato e das próteses dos participantes da pesquisa. Foram identificadas as espécies destas amostras para se conhecer a sua prevalência. Para cada amostra foi testado *in vitro* a capacidade de inibição completa de *Candida* por cada uma das 4 cepas de *Lactobacillus*: *L. acidophilus* HS101, *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr32 e *L. rhamnosus* Howaru ®, de acordo com a metodologia descrita em material de métodos no item 4.6.

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software SAS 9.2 (SAS Institute Inc.).

5.3.1. Análise exploratória

A tabela 5.21 apresenta a distribuição de frequências das variáveis do estudo: origem da amostra, espécies de *Candida* e susceptibilidade aos antifúngicos convencionais (nistatina e miconazol).

Tabela 5.21 - Distribuição de frequências em número absoluto e relativo (%) das variáveis do estudo: origem da amostra, espécies de *Candida* e sensibilidade ao miconazol e nistatina

Variável	Frequência	
	Absol	Rel (%)
Origem da amostra		
Palato	39	47,6
Prótese	43	52,4
Espécie de <i>Candida</i>		
<i>C. albicans</i>	29	37,7
<i>C. glabrata</i>	11	14,3
<i>C. guilliermondii</i>	14	18,2
<i>C. tropicalis</i>	19	24,7
outros	4	5,2
Miconazol		
resistente	4	8,2
intermediário	9	18,4
sensível	36	73,5
Nistatina		
resistente	2	4,1
sensível	47	95,9

A tabela 5.21 expõe a distribuição geral das 82 amostras analisadas, 47,6% foram isoladas da cavidade bucal, mais especificamente do palato, enquanto que 52,4% foram das próteses. A espécie de *Candida* mais comum foi de *C. albicans* (37,7%), seguida por *C. tropicalis* (24,7%), *C. guilliermondii* (18,3%), *C. glabrata* (14,3%) e 5,2% de outras espécies. A maior parte das amostras apresentou-se sensível ao miconazol (73,5%) e à nistatina (95,9%).

Utilizando o método descrito por Fitzsimmons e Berry (141) modificado, foi avaliada a capacidade de inibição completa de *Candida* sp. pelas espécies de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, sendo que a probabilidade da levedura ser inibida completamente variou de acordo com a espécie de lactobacilo testada (tabela 5.22).

Tabela 5.22 - Distribuição em número absoluto e relativo da inibição completa de *Candida* pelas espécies de *Lactobacillus* testadas

Espécie de <i>Lactobacillus</i>	Inibiu completamente <i>Candida</i>			
	Não		Sim	
	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
<i>L. acidophilus</i> HS 101	41	50,0	41	50,0
<i>L. acidophilus</i> NCFM	35	42,7	47	57,3
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	17	20,7	65	79,3
<i>L. rhamnosus</i> Howaru	32	51,6	30	48,4

A cepa *L. rhamnosus* Lr-32 inibiu completamente a levedura em 79,3% das amostras, enquanto a cepa de *L. rhamnosus* Howaru inibiu pouco menos que 50% as demais cepas estudadas inibiram completamente, 50% e 57,3%.

A probabilidade de inibição completa de *Candida* por *Lactobacillus* variou também em função da origem de onde as amostras foram isoladas, palato e prótese total (tabela 5.23).

Tabela 5.23 - Distribuição em número absoluto e relativo (%) da inibição completa de *Candida* segundo as espécies de *Lactobacillus* e a origem de onde foram isoladas a levedura, palato e prótese

Cepas de <i>Lactobacillus</i>	Origem das amostras	Inibiu completamente <i>Candida</i>			
		Não		Sim	
		Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
<i>L. acidophilus</i> HS 101	Palato	31	79,5	8	20,5
	Prótese	10	23,3	33	76,7
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Palato	23	59,0	16	41,0
	Prótese	12	27,9	31	72,1
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	Palato	13	33,3	26	66,7
	Prótese	4	9,3	39	90,7
<i>L. rhamnosus</i> Howaru	Palato	17	73,9	6	26,1
	Prótese	15	38,5	24	61,5

Para a cepa *L. acidophilus* HS101, observou-se 76,7% de inibição completa da *Candida* entre as amostras de prótese e apenas 20,5% entre as amostras de boca. Para as outras 3 cepas de *Lactobacillus* a proporção amostral de inibição completa de *Candida* também foi bem maior entre as amostras de prótese do que entre as amostras de boca.

Foi avaliada a inibição completa da levedura de acordo com as espécies de *Candida* e de *Lactobacillus*. A probabilidade da levedura ser inibida completamente por lactobacilos variou em função de algumas espécies de *Candida* (tabela 5.24).

Tabela 5.24 - Distribuição de frequências da variável de inibição completa de *Candida* segmentada pela espécie de lactobacilo e espécie de *Candida*

Espécie de <i>Lactobacillus</i>	Espécie de <i>Candida</i>	Inibiu completamente <i>Candida</i>			
		Não		Sim	
		Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
<i>L. acidophilus</i> HS 101	<i>C. albicans</i>	8	27,6	21	72,4
	<i>C. glabrata</i>	10	90,9	1	9,1
	<i>C. guilliermondii</i>	9	64,3	5	35,7
	<i>C. tropicalis</i>	6	31,6	13	68,4
	outros	3	75,0	1	25,0
<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>C. albicans</i>	5	17,2	24	82,8
	<i>C. glabrata</i>	8	72,7	3	27,3
	<i>C. guilliermondii</i>	7	50,0	7	50,0
	<i>C. tropicalis</i>	9	47,4	10	52,6
	outros	2	50,0	2	50,0
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	<i>C. albicans</i>	1	3,5	28	96,6
	<i>C. glabrata</i>	3	27,3	8	72,7
	<i>C. guilliermondii</i>	6	42,9	8	57,1
	<i>C. tropicalis</i>	3	15,8	16	84,2
	outros	2	50,0	2	50,0
<i>L. rhamnosus</i> Howaru	<i>C. albicans</i>	6	28,6	15	71,4
	<i>C. glabrata</i>	9	81,8	2	18,2
	<i>C. guilliermondii</i>	5	55,6	4	44,4
	<i>C. tropicalis</i>	9	52,9	8	47,1
	outros	3	75,0	1	25,0

A cepa *L. acidophilus* NCFM inibiu completamente 82,8% das amostras de *C. albicans*, mas inibiu completamente apenas 27,3% das amostras de *C. glabrata*. Para a maioria das espécies de lactobacilos, observou-se uma alta proporção de amostras com *C. albicans* inibidas completamente e uma baixa proporção de amostras com *C. glabrata* inibidas completamente.

A probabilidade de inibição completa de *Candida* por lactobacilos não variou em função da sensibilidade de *Candida* ao miconazol e à nistatina (tabelas 5.25 e 5.26).

Tabela 5.25 - Distribuição de frequências da variável de inibição completa de *Candida* segmentada pela espécie de *Lactobacillus* e sensibilidade ao miconazol

Espécie de <i>Lactobacillus</i>	Miconazol	Inibiu completamente <i>Candida</i>			
		Não		Sim	
		Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
<i>L. acidophilus</i> HS101	Resistente	2	50,0	2	50,0
	Intermediário	4	44,4	5	55,6
	Sensível	12	34,3	23	65,7
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Resistente	1	25,0	3	75,0
	Intermediário	5	55,6	4	44,4
	Sensível	12	34,3	23	65,7
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	Resistente	1	25,0	3	75,0
	Intermediário	2	22,2	7	77,8
	Sensível	7	20,0	28	80,0
<i>L. rhamnosus</i> Howaru	Resistente	2	50,0	2	50,0
	Intermediário	4	50,0	4	50,0
	Sensível	17	48,6	18	51,4

Tabela 5.26 - Distribuição de frequências da variável de inibição completa de *Candida* segmentado pela espécie de lactobacilo e sensibilidade à nistatina

Espécie de <i>Lactobacillus</i>	Nistatina	Inibiu completamente <i>Candida</i>			
		Não		Sim	
		Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)
<i>L. acidophilus</i> HS 101	Resistente	0	0,0	2	100,0
	Sensível	18	39,1	28	60,9
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Resistente	0	0,0	2	100,0
	Sensível	18	39,1	28	60,9
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	Resistente	0	0,0	2	100,0
	Sensível	10	21,7	36	78,3
<i>L. rhamnosus</i> Howaru	Resistente	0	0,0	2	100,0
	Sensível	23	51,1	22	48,9

A cepa *L. rhamnosus* Howaru inibiu completamente *Candida* em 50% das amostras resistentes ao miconazol, em 50% das amostras intermediárias e em 51,4% das amostras sensíveis a essa droga. Para as demais espécies de lactobacilo e para ambas às drogas, o comportamento é semelhante se levarmos em consideração que poucas amostras não foram sensíveis ao miconazol e à nistatina.

5.3.2. Análise inferencial

O fato de uma mesma amostra de *Candida* ter sido testada com mais de uma cepa de *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* Lr-32, *L. rhamnosus* Howaru, *L. acidophilus* HS101 e *L. acidophilus* NCFM) gera dependência entre as observações. Dessa forma, a análise estatística desta parte do trabalho levou em consideração essa dependência e utilizou um modelo de equações de estimação generalizadas (145), para testar a probabilidade de *Candida* ser inibida completamente por *Lactobacillus*, variando em função de sua cepa. Como a variável resposta é binária (inibiu ou não completamente o microrganismo *Candida*) considerou-se que ela tem distribuição binomial. A função de ligação utilizada foi a logito. Portanto, tem-se um modelo de equações de estimação generalizadas com função de ligação logito para variáveis com distribuição binomial, ou seja, modelo logístico de equações de estimação generalizadas. Para todos os testes e modelos desta parte do trabalho de ação antifúngica dos lactobacilos, foi considerado um nível de significância de 5%.

5.3.2.1 Avaliação das cepas de *Lactobacillus*

Ajustamos o modelo logístico de equações de estimação generalizadas e concluímos que a probabilidade do microrganismo *Candida* ser inibido completamente varia em função da cepa de lactobacilo ($p < 0,0001$, tabela 5.27). Para realizar comparações das espécies duas a duas foram feitas comparações múltiplas com ajuste de Bonferroni (146).

Tabela 5.27 - Valores p da comparação das probabilidades de inibição completa de *Candida* entre as cepas de lactobacilos baseados em um modelo logístico de equações de estimação generalizadas

Comparação	Valor p	Maior probab. de inibição completa
Espécies	< 0,0001	
<i>L. acidophilus</i> HS101 e <i>L. acidophilus</i> NCFM	0,1336	---
<i>L. acidophilus</i> HS 101 e <i>L. rhamnosus</i> Lr-32	< 0,0001	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32
<i>L. acidophilus</i> HS101 e <i>L. rhamnosus</i> Howaru	0,0797	---
<i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>L. rhamnosus</i> Lr-32	0,0002	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32
<i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>L. rhamnosus</i> Howaru	0,0184	---
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32 e <i>L. rhamnosus</i> Howaru	< 0,0001	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32

Como foram necessárias 6 comparações duas a duas, considerou-se significantes aquelas em que $p < 0,05/6 = 0,0083$. Com esse critério concluímos que a probabilidade do microrganismo *Candida* ser inibido completamente é maior para a cepa *L. rhamnosus* Lr-32 quando comparado a qualquer uma das outras três cepas estudadas (tabela 5.27). Portanto, concluímos que não há indícios da probabilidade da levedura ser inibida completamente varie entre as demais cepas: *L. acidophilus* HS101, *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Howaru.

Na tabela 5.28 estão apresentados os resultados do modelo logístico de equações de estimação generalizadas final.

Tabela 5.28 - Resultados do modelo logístico de equações de estimação generalizadas para a inibição completa ou não de *Candida*

Variável	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances IC		
					Pontual	(95%)	
Intercepto		0,011	0,183				
<i>Lactobacillus</i>	demais cepas						
	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	1,298	0,234	< 0,0001	3,7	2,3	5,8

Segundo os resultados do modelo logístico de equações de estimação generalizadas final, estima-se que a chance da levedura ser inibida completamente por *L. rhamnosus* Lr-32 é 3,7 vezes a chance de a mesma ser inibida completamente por *L. acidophilus* HS101, por *L. acidophilus* NCFM e por *L. rhamnosus* Howaru. Com 95% de confiança e estimando-se ainda que a razão entre essa chance está entre 2,3 e 5,8.

5.3.2.2 Avaliação segundo as variáveis: origem da amostra de *Candida* (palato ou prótese), espécie de *Candida*, sensibilidade ao miconazol e sensibilidade à nistatina

Nesta seção foi estudado se a probabilidade de inibição completa de *Candida* por cada cepa de *Lactobacillus* variou em função de outras variáveis: origem da amostra (boca ou prótese), da espécie de *Candida*, da sensibilidade ao miconazol e da sensibilidade à nistatina. Para tanto, foram utilizados testes qui-quadrado (143) e quando as suposições do teste qui-quadrado tradicional assintótico (143) não eram satisfeitas utilizou-se o teste qui-quadrado exato. Em seguida, as variáveis significantes foram incluídas em um modelo de regressão logística (144) para estudar se a probabilidade de inibição completa de *Candida* por lactobacilos variou em função de cada uma das variáveis, mesmo quando as demais variáveis foram consideradas. Para as variáveis significantes com mais de 2 níveis, também foram utilizadas comparações múltiplas com ajuste de Bonferroni. Em todos os modelos de regressão logística foi utilizado o teste de Hosmer e Lemeshow (144) para verificar se o modelo estava bem ajustado. Para todos os modelos não se rejeitou a hipótese de que o modelo está bem ajustado e, portanto, as conclusões obtidas são válidas.

5.3.2.2.1 *L. acidophilus* HS 101

A tabela 5.29 apresenta os valores p dos testes qui-quadrado para a cepa *L. acidophilus* HS101, segundo as variáveis: origem da amostra, espécie de *Candida* e sensibilidade aos antifúngicos, miconazol e nistatina.

Tabela 5.29 - Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de *Candida* por *L. acidophilus* HS101 varia de acordo com as variáveis: origem da mostra, espécie de *Candida* e susceptibilidade ao miconazol e nistatina

Variável	Valor p
Origem da amostra	< 0,0001
Espécie de <i>Candida</i>	0,0007
Miconazol	0,6898
Nistatina	0,5213

A probabilidade da cepa *L. acidophilus* HS101 inibir completamente *Candida* variou em função da origem da amostra ($p < 0,0001$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0007$). Porém, não houve indícios de que probabilidade desta cepa probiótica, *L. acidophilus* HS 101, em inibir completamente a levedura varie em função da sensibilidade ou não de *Candida* ao miconazol ($p = 0,6898$) e à nistatina ($p = 0,5213$).

A tabela 5.30 apresenta os resultados do modelo de regressão logística para a cepa *L. acidophilus* HS 101, segundo as espécies de *Candida* e a origem da amostra.

Tabela 5.30 - Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de *Candida* por *L. acidophilus* HS101

Variável	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances Pontual IC (95%)		
Intercepto		-4,416	1,279				
<i>Candida</i>	<i>glabatra</i>						
	outras	1,861	1,257	0,0014	6,4	0,5	75,5
	<i>albicans</i> e <i>tropicalis</i>	3,940	1,242		51,4	4,5	586,1
Origem	boca			< 0,0001			
	prótese	2,938	0,713		18,9	4,7	76,3

Na presença das demais variáveis, a probabilidade desta cepa em inibir completamente a levedura variou em função da origem da amostra ($p < 0,0001$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0014$). Comparando-se amostras de mesma espécie de *Candida*, estimou-se que a chance da cepa *L. acidophilus* HS 101 em inibir completamente a levedura de uma amostra de prótese foi 18,9 vezes a chance em relação à amostra de boca. Comparando-se amostras de mesma origem, estimou-se também que a chance deste lactobacilo em inibir completamente *C. albicans* ou *C. tropicalis* foi 51,4 vezes a chance de inibir completamente *C. glabatra*. Entre as demais espécies de *Candida* não foram observadas diferenças significantes.

5.3.2.2.2 *L. acidophilus* NCFM

A tabela 5.31 apresenta os valores p dos testes qui-quadrado para o lactobacilo *L. acidophilus* NCFM.

Tabela 5.31 - Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de *Candida* por *L. acidophilus* NCFM varia de acordo com as variáveis: origem da mostra, espécie de *Candida* e susceptibilidade ao miconazol e nistatina

Variável	Valor p
Origem da amostra	0,0045
Espécie de <i>Candida</i>	0,0120
Miconazol	0,4709
Nistatina	0,5213

A probabilidade da cepa *L. acidophilus* NCFM inibir completamente *Candida* variou em função da origem da amostra ($p = 0,0045$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0120$). Porém, não há indícios de que probabilidade deste probióticos, *L. acidophilus* NCFM, em inibir completamente a levedura varie em função da sensibilidade ou não de *Candida* ao miconazol ($p = 0,4709$) e à nistatina ($p = 0,5213$).

A tabela 5.32 apresenta os resultados do modelo de regressão logística para a cepa *L. acidophilus* NCFM.

Tabela 5.32 - Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de *Candida* por *L. acidophilus* NCFM

Variável	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances		
					Pontual	IC (95%)	
Intercepto		-1,727	0,786				
<i>Candida</i>	<i>C. glabrata</i>						
	outras	0,945	0,791	0,0038	2,6	0,5	12,1
	<i>C. albicans</i>	2,682	0,887		14,6	2,6	83,1
Origem	boca			0,0111			
	prótese	1,400	0,552		4,1	1,4	12,0

Na presença das demais variáveis a probabilidade da cepa *L. acidophilus* NCFM inibir completamente *Candida* variou em função da origem da amostra ($p = 0,0111$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0038$). Comparando-se amostras de mesma espécie de *Candida*, estimou-se que a chance do lactobacilo probióticos, *L.*

acidophilus NCFM, em inibir completamente a levedura de uma amostra de prótese é 4,1 vezes a chance de inibir completamente *Candida* de uma amostra de boca. Comparando-se amostras de mesma origem, estimou-se também que a chance desta cepa *L. acidophilus* NCFM inibir completamente a espécie *C. albicans* é 14,6 vezes a chance de inibir completamente a espécie *C. glabrata*. Entre as demais espécies de *Candida* não foram observadas diferenças significantes.

5.3.2.2.3 *L. rhamnosus* Lr-32

A tabela 5.33 apresenta os valores p dos testes qui-quadrado para a cepa *L. rhamnosus* Lr-32.

Tabela 5.33 - Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de *Candida* por *L. rhamnosus* Lr-32 variou de acordo com as variáveis: origem da mostra, espécie de *Candida* e susceptibilidade ao miconazol e nistatina

Variável	Valor p
Origem da amostra	0,0073
Espécie de <i>Candida</i>	0,0118
Miconazol	1,0000
Nistatina	1,0000

A probabilidade da cepa *L. rhamnosus* Lr-32 inibir completamente a levedura variou em função da origem da amostra ($p = 0,0073$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0118$). Porém, não há indícios de que probabilidade deste probiótico, *L. rhamnosus* Lr-32, inibir completamente *Candida* varie em função da sensibilidade ou não de *Candida* aos antifúngicos convencionais, miconazol ($p = 1,0000$) e à nistatina ($p = 1,0000$).

A tabela 5.34 apresenta os resultados do modelo de regressão logística para o lactobacilo *L. rhamnosus* Lr-32.

Tabela 5.34 - Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de *Candida* pelo lactobacilo *L. rhamnosus* Lr-32

Variável	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances		
					Pontual	IC (95%)	
Intercepto		-0,604	0,606				
<i>Candida</i>	outros						
	<i>C. glabrata</i> e <i>C. tropicalis</i>	1,163	0,713	0,0138	3,2	0,8	13,0
	<i>C. albicans</i>	3,309	1,165		27,4	2,8	268,3
Origem	boca						
	prótese	1,745	0,702	0,0129	5,7	1,4	22,6

Na presença das demais variáveis, a probabilidade da cepa *L. rhamnosus* Lr-32 inibir completamente a levedura variou em função da origem da amostra ($p = 0,0129$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0138$). Comparando-se amostras de mesma espécie de *Candida* estimou-se que a chance deste probiótico, *L. rhamnosus* Lr-32, inibir completamente *Candida* de uma amostra de prótese é 5,7 vezes a chance de inibir completamente de uma amostra de boca. Comparando-se amostras de mesma origem, estimou-se também que a chance de *L. rhamnosus* Lr-32 inibir completamente *C. albicans* é 27,4 vezes a chance de inibir completamente outras espécies (excluindo *C. glabrata* e *C. tropicalis*). Entre as demais espécies de *Candida* não foram observadas diferenças significantes.

5.3.2.2.4 *L. rhamnosus* Howaru

A tabela 5.35 apresenta os valores p dos testes qui-quadrado para o lactobacilo *L. rhamnosus* Howaru.

Tabela 5.35 - Valores p dos testes se a probabilidade de inibição completa de *Candida* por *L. rhamnosus* Howaru varia de acordo com algumas variáveis: origem da mostra, espécie de *Candida* e susceptibilidade ao miconazol e nistatina

Variável	Valor p
Origem da amostra	0,0070
Espécie de <i>Candida</i>	0,0463
Miconazol	1,0000
Nistatina	0,4894

Conclui-se que a probabilidade do *L. rhamnosus* Howaru inibir completamente *Candida* varia em função da origem da amostra ($p = 0,0070$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0463$). Porém, não há indícios de que probabilidade da cepa *L. rhamnosus* Howaru inibir completamente *Candida* varie em função da sensibilidade ou não de *Candida* ao miconazol ($p = 1,0000$) e à nistatina ($p = 0,4894$).

A tabela 5.36 apresenta os resultados do modelo de regressão logística para o lactobacilo *L. rhamnosus* Howaru.

Tabela 5.36 - Resultados do modelo de regressão logística para a inibição completa ou não de *Candida* por *L. rhamnosus* Howaru

Variável	Nível	Estimativa	Erro padrão	Valor p	Razão de chances		
					Pontual	IC (95%)	
Intercepto		-2,317	0,912				
<i>Candida</i>	<i>C. glabrata</i>						
	outras	1,095	0,898	0,0371	3,0	0,5	17,4
	<i>C. albicans</i>	2,288	0,957		9,9	1,5	64,3
Origem	boca			0,0204			
	prótese	1,432	0,618		4,2	1,2	14,1

Na presença das demais variáveis, a probabilidade da cepa *L. rhamnosus* Howaru inibir completamente *Candida* variou em função da origem da amostra ($p = 0,0204$) e da espécie de *Candida* ($p = 0,0371$). Comparando-se amostras de mesma espécie de *Candida*, estimou-se que a chance deste probiótico, *L. rhamnosus* Howaru, inibir completamente *Candida* de uma amostra de prótese é 4,2 vezes a chance desta cepa inibir completamente *Candida* de uma amostra de boca. Comparando-se amostras de mesma origem, estimou-se também que a chance do lactobacilo *L. rhamnosus* Howaru inibir completamente *C. albicans* é 9,9 vezes a chance de inibir completamente *C. glabrata*. Entre as demais espécies de *Candida* não foram observadas diferenças significantes.

5.3.2.3 Associação entre origem da amostra e espécie de *Candida*

A tabela 5.37 apresenta a distribuição de frequências da espécie de *Candida* segmentada pela origem da amostra.

Tabela 5.37 - Distribuição de frequências da espécie de *Candida* segmentado pela origem da amostra

Espécie de <i>Candida</i>	Origem da amostra				Total	
	Palato		Prótese		Absol	Rel (%)
	Absol	Rel (%)	Absol	Rel (%)		
<i>C. albicans</i>	13	38,2	16	37,2	29	37,7
<i>C. glabrata</i>	6	17,6	5	11,6	11	14,3
<i>C. guilliermondii</i>	7	20,6	7	16,3	14	18,2
<i>C. tropicalis</i>	6	17,6	13	30,2	19	24,7
Outras	2	5,9	2	4,7	4	5,2
Total	34	100,0	43	100,0	77	100,0
p = 0,7679						

Pode-se notar que as frequências relativas são bem próximas para ambas as origens. Fazendo-se o teste qui-quadrado exato, conclui-se não haver indícios de que a distribuição da espécie de *Candida* varie de acordo com a origem da amostra ($p = 0,7679$).

6 DISCUSSÃO

6 Discussão

6.1 Aplicação dos probióticos em seres humanos

O usuário de prótese total é um candidato em potencial a apresentar candidose e estomatite sob prótese, pois além de normalmente ser idoso, pode sofrer fatores que o predispõe à doença, como a baixa imunidade, a higiene oral precária, o uso prótese dentária mal adaptada e, a presença da levedura do gênero *Candida* (3).

6.1.1 Prevalência de *Candida* sp. em usuários de próteses totais

A frequência encontrada em nosso estudo foi de 37% de indivíduos com achado subclínico para *Candida* sp. Esta prevalência foi semelhante ao descrito por Abaci (26), em que cerca de 39% apresentaram a levedura, sem manifestações clínicas da doença. Ao se comparar com outras pesquisas mais antigas (20, 24) a prevalência de *Candida* é maior. Geralmente, está associado o uso de prótese com a presença da levedura numa frequência de 50% a 60%. Em 1999, Radford, Challacombe e Walter (28) observaram que havia grande variação entre as pesquisas com relação à prevalência de *Candida*, 23% a 67%, devido aos critérios de delineamento do estudo, ou seja, à população escolhida, aos critérios de diagnóstico, aos dados do estudo e à metodologia empregada na pesquisa.

A menor prevalência de leveduras em usuários de próteses totais com achado subclínico para *Candida* nos faz acreditar que esses valores tendem a diminuir cada vez mais, pois há uma valorização muito grande em melhorar a qualidade de vida dos idosos. Diversos métodos para eliminação de *Candida* estão sendo estudados, incluindo novos produtos e materiais, a fim de se evitar a colonização por este microrganismo. Dentre estes, existem pesquisas com método de desinfecção de próteses em micro-ondas, clorexidina, EDTA tetrasódio (147), soluções à base de própolis, nano partículas de prata, fitoterápicos, etc. Por outro

lado, podemos observar que a população possui maior acesso às informações, valorizando o cuidado com a saúde bucal e geral.

A associação entre o gênero *Candida* e a estomatite sob prótese ocorre numa frequência em torno de 60% a 65% dos usuários de próteses dentárias (50, 57) e quando não manifestam a doença essa porcentagem aumenta para 75% (57). De acordo com esses relatos, apesar de observar que o microrganismo *Candida* está associado à estomatite sob prótese, existem casos em que ocorre a manifestação da doença sem que a levedura esteja presente (25). Assim como, existem pacientes assintomáticos que apresentam *Candida*. Portanto, a causa da estomatite sob prótese é multifatorial, além da presença da levedura, a doença está associada com a má higienização da prótese (38, 56), ao trauma provocado pela má adaptação da prótese (57) e à resposta do sistema imunológico do indivíduo.

6.1.2 Quantidade de UFC de *Candida*

Destes portadores assintomáticos, 80% apresentaram baixa prevalência, ou seja, quantidades menores que 10^4 UFC de *Candida*, tabela 5.1. Subentende-se que a baixa prevalência é característica de portadores assintomáticos de *Candida*, pois quando ocorre um aumento da proliferação da levedura e uma maior colonização, há indícios de que os fatores predisponentes para candidose estão conseguindo superar o sistema de defesa do indivíduo e, conseqüentemente, pode ocorrer a manifestação da doença.

A quantidade de UFC, quando correlacionada a todas as variáveis do estudo, foi estatisticamente significativa para as variáveis: ardência bucal (tabela 5.18 e 5.20) e gênero (tabela 5.16 e 5.20). Neste caso, os indivíduos que apresentaram ardência bucal apresentaram uma frequência maior de 10^2 UFC de *Candida* que outra quantidade (tabela 5.18). Para o gênero, os homens apresentaram maior quantidade de 10^3 UFC que as mulheres (tabela 5.16). Precisariamos investigar melhor se estas variáveis realmente apresentam associação com a quantidade de UCF de *Candida*, aumentando-se a quantidade da amostra.

6.1.3 Descrição dos sujeitos da pesquisa e características de suas próteses totais

Dos participantes da pesquisa, a maioria era composta pelo gênero feminino (71,4%), tabela 5.1. A procura pelo atendimento reabilitador protético por mulheres é maior que a procura por homens, acredita-se que esteja relacionado ao fato delas, além de se cuidarem mais, se disporem mais ao tratamento em Faculdades. O paciente que procura o serviço oferecido pela Disciplina de Prótese Total da FOUSP precisa: estar ciente de que deverá ter compreensão quanto aos passos clínicos, nos quais podem se repetir, quantas vezes forem necessárias, pois o paciente será atendido por alunos e estes se encontram em processo de aprendizado; estar disposto quanto aos horários e a demora do atendimento; não ter vergonha de se expor, pois será observado por alunos e professores, além de aguardar na recepção com tantos outros pacientes que se encontram na mesma condição de usuário de prótese total.

Os sujeitos da pesquisa foram, em sua maioria, usuários de próteses totais bimaxilares (84%, tabela 5.1), suas próteses tinham idade média de 6 anos (tabela 5.3) e estavam mal higienizadas (76,3%, tabela 5.1). Essas características são facilitadores para manifestar a doença na cavidade bucal (47, 147). Contudo se houver deficiência do sistema imunológico, a implicância que isso pode acarretar sistemicamente é preocupante (53). Por este motivo, é dever do cirurgião-dentista clínico geral, protesista e odontogeriatra orientarem sobre a importância da boa higiene bucal e das próteses, além de fazer a manutenção periódica das mesmas e da saúde dentária quando houver necessidade.

6.1.4 Sucesso do tratamento com probióticos: *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101

Os probióticos estão em crescente repercussão no meio médico (148), científico e na mídia, conseqüentemente, tem aumentado os adeptos ao seu uso,

devido aos benefícios promovidos ao organismo. As vantagens em se utilizar os probióticos são diversas, pois melhoram o funcionamento do sistema imunológico (149), do sistema gastrointestinal, combatem microrganismos patogênicos, assim como, existem pesquisas que afirmam a capacidade dos probióticos em reduzir o colesterol (150), a hipertensão arterial (151) e o risco de câncer de cólon (152).

Apenas um sujeito da pesquisa relatou mal estar ao utilizar o produto e optou em não participar mais da pesquisa. Ao final desta, foi revelado que o mesmo pertencia ao grupo B, placebo. Então, percebemos que o relato de mal estar foi um pretexto para não continuar com sua participação, ou o mesmo pode ter ficado sugestionado, pelo fato de achar que estava utilizando o produto com bactérias, pois ele sabia que estávamos testando a eficácia dos probióticos no combate à levedura. No entanto, o que ele não sabia era que, justamente, o produto que usou não continha as tais bactérias. Mas o que vale ressaltar é que nenhum dos outros participantes apresentou efeito adverso com o uso do bioproduto.

O bioproduto foi eficaz e seguro. Observamos a redução significativa da prevalência de *Candida* no grupo que utilizou os probióticos, *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101. O sucesso no tratamento ocorreu em 83,3% dos indivíduos que utilizaram o produto A (probióticos), com redução total da levedura, tabela 5.4. Estudos que testaram a ação de outras cepas de lactobacilos contra *Candida* da cavidade bucal também obtiveram resultados favoráveis, como foi para *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. rhamnosus* (96), *Lactobacillus rhamnosus* GG (81, 120, 153) e *L. rhamnosus* LC705 (81, 120). Em outro estudo, cepas de lactobacilos das espécies *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* inibiram o crescimento de *Candida albicans* vaginal (12). Assim como, *L. fermentum* ESS-1 também apresentou capacidade de inibição de *C. albicans* e *C. glabrata* isoladas da vaginal (154).

6.1.5 Mecanismo de ação dos probióticos

Os probióticos possuem alguns mecanismos de ação contra o gênero *Candida*. Quando estudados na mucosa intestinal, descobriu-se que alguns desses

mecanismos eram por competição pelos sítios de adesão e por nutrientes (155), bem como, estimulação do sistema imunológico (156).

In vitro, foi verificado que mecanismo que atuava contra *Candida* não era único, e sim uma associação de mecanismos (12). Dentre estes mecanismos, os lactobacilos aderem-se ao epitélio da mucosa, produzem peróxido de hidrogênio (12) e dipeptídeos cíclicos, como ácido piroglutâmico, que inibem a *Candida albicans* da vagina (109). O peróxido de hidrogênio é um metabólito oxigênio tóxico, que é produzido na combinação com lactoperoxidase-tiocianato e exerce efeito bactericida contra a maioria dos patógenos. Além dessas, outras substâncias de baixo peso molecular possuem atividade antifúngica para *Candida*, como as lactonas, que são produzidas por diferentes espécies de lactobacilos (109).

A modulação do sistema imune atua contra a colonização por *Candida* sp. (157), por meio da produção de interferon gama (IFN - γ), interleucina 4 (IL-4), aumento dos níveis de imunoglobulinas (IgA) na mucosa (102) e liberação de óxido nítrico (NO) na cavidade bucal de camundongos (107).

Como o produto foi utilizado sobre a prótese e em íntimo contato com a mucosa do palato, acreditamos que os probióticos atuaram topicamente contra a levedura por competição de nutrientes e sítios de adesão (155) e através da liberação de alguns compostos antimicrobianos. Assim como pode ter ocorrido ação sistêmica, devido à deglutição do produto solubilizado na saliva, que por sua vez pode ter promovido a estimulação do sistema imunológico, alterando os níveis de IgA salivar e recrutamento das células de defesa, como macrófagos e linfócitos. Mas, como não foram investigados esses mecanismos de ação em nossa pesquisa, não podemos afirmar com certeza quais foram.

Apenas testamos *in vitro* a produção de bacteriocinas por estes lactobacilos, quando em contato com as espécies de *Candida* isoladas, e verificamos que os lactobacilos não produziram bacteriocinas com efeito inibitório para nenhuma das espécies de *Candida*. Somente, foi observada a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 quando em contato com *Listeria*, patógeno utilizado como controle positivo. Assim, verificamos que as bacteriocinas não podem ser consideradas como atuantes contra *Candida*.

6.1.6 Associação entre o sucesso do tratamento e as espécies de *Candida*

As espécies de *Candida* foram identificadas para se conhecer a prevalência das espécies do grupo estudado, usuários de próteses totais e para verificar se houve associação destas com o sucesso do tratamento.

A espécie mais prevalente isolada da cavidade bucal foi de *C. albicans* (52,1%, tabela 5.2) (41, 43, 158, 159) porque é um fungo que apresenta dimorfismo de crescimento, na forma de levedura e de filamentos, importantes para o estabelecimento da infecção (41), assim como para a colonização, formação de biofilme, adesão no epitélio e invasão tecidual (53). As espécies de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. famata* e *C. parapsilosis* também foram isoladas (160) e a prevalência dessas três primeiras espécies tem aumentado, devido ao uso profilático de antifúngicos como os azoles (53). Além de apresentar esta resistência, a espécie *C. glabrata* coloniza mais frequentemente os idosos, sendo o aumento da prevalência proporcional à idade e independente do uso de próteses totais (5).

Quando correlacionada as espécies de *Candida* à intervenção com probióticos, verificamos que a probabilidade do tratamento ter sucesso (reduzir a zero a quantidade de UFC de *Candida*) não variou em função de qualquer uma das espécies ($p > 0,15$), ou seja, os lactobacilos testados não atuaram de forma específica para nenhuma das espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal dos usuários de próteses totais, conforme observado na tabela 5.5.

Ao analisar estatisticamente a presença de *C. albicans* em relação a todas as variáveis do estudo, observamos que em 100% dos indivíduos com intestino constipado apresentaram esta espécie, neste grupo estudado (tabela 5.13 e 5.15). Não há relatos na literatura sobre esta associação, portanto, este achado deve ser mais bem elucidado.

6.2 Ação antifúngica de *Lactobacillus* sp. probióticos, teste *in vitro*

O teste *in vitro* das cepas de *Lactobacillus* teve como objetivo eliminar as dúvidas e vieses em relação à ação antifúngica dos probióticos. A primeira delas é conhecer qual dentre os *Lactobacillus*, *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101, estaria agindo contra o microrganismo *Candida*, uma vez que o bioproduto foi elaborado associando essas duas cepas. A segunda, se outras cepas de lactobacilos também apresentariam semelhante ação antifúngica. Outra dúvida que surgiu foi verificar se a inibição do crescimento de *Candida* pelas cepas de lactobacilos tinha associação com: as espécies de *Candida* e a origem destas (prótese ou palato). Além de verificar se existe correlação com o teste de sensibilidade, ou seja, de maneira a comparar se os probióticos eram eficazes na inibição completa de crescimento de *Candida* tanto quanto a sensibilidade da levedura ao miconazol e à nistatina.

Na tabela 5.21 observamos que a frequência de *Candida* isolada das próteses foi um pouco maior que no palato. Isso pode ter ocorrido devido ao fato de se coletar mais facilmente o biofilme da prótese, que é estruturado por microrganismos diversos, inclusive *Candida* (54). É imprescindível ao cirurgião-dentista orientar os usuários de próteses dentárias sobre a importância da higienização de suas próteses e da avaliação e troca periódica das mesmas, para evitar que se forme um reservatório de microrganismos patogênicos na boca.

Ainda na tabela 5.21 verificamos que a espécie mais prevalente foi *C. albicans* (37,7%), seguida por *C. tropicalis* (24,7%), *C. guilliermondii* (18,3%), *C. glabrata* (14,3%) e 5,2% de outras espécies. Há uma pequena diferença na prevalência entre as espécies *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* quando avaliada por sua origem de isolamento (tabela 5.37). A espécie *C. tropicalis* foi a segunda mais prevalente na prótese, enquanto que no palato destes sujeitos, a segunda mais prevalente foi *C. guilliermondii* e todas as outras espécies foram mais prevalentes no palato. Apesar de haver essa diferença de distribuição das espécies quanto à origem da amostra, segundo análise estatística, esta não foi estatisticamente significativa ($p = 0,7679$, tabela 5.37).

Na literatura, existem relatos de espécies emergentes como as espécies *C. glabrata* (161) e *C. dubliniensis*. Em nosso estudo observamos uma prevalência

razoável de *C. glabrata*, em torno de 14% e apenas uma espécie de *C. dubliniensis*. Frequentemente, isolam-se as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* da cavidade bucal (161), sendo que a espécie *C. glabrata* apresenta uma frequência de colonização que acompanha a idade, ou seja, a frequência é maior conforme a pessoa possui mais idade (5). Sua alta frequência também é observada em indivíduos HIV positivo (161), diabéticos (162) e que são submetidos à terapia antibiótica ou com imunossupressores (161). A espécie *C. glabrata* apresenta resistência à terapia antifúngica com fluconazol e itraconazol (163), e o resultado que nos chamou atenção foi em relação a sua menor resposta de inibição completa pelas cepas de *Lactobacillus* testadas, exceto por *L. rhamnosus* Lr-32, quando comparada às demais espécies de *Candida* (tabela 5.24).

6.2.1 *Lactobacillus* x *Candida*

Realizamos os testes com seguintes cepas de *Lactobacillus*: *L. rhamnosus* Lr-32, *L. acidophilus* HS 101, *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Howaru. Estas apresentaram capacidade de inibição completa da levedura, sendo o lactobacilo *L. rhamnosus* Lr-32 o mais eficaz, 79,3%. Quando comparada com as demais cepas, a probabilidade de inibição por *L. rhamnosus* Lr-32 foi significativamente maior, $p < 0,0001$ (tabela 5.27). Este resultado foi semelhante ao estudo realizado por Matsubara et al. (164) que testaram em modelo animal, camundongo imunossuprimido DBA/2, a inibição de crescimento de *C. albicans* por *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* Lr-32 e nistatina. Observaram que a cepa *L. rhamnosus* Lr-32 reduziu significativamente a levedura da cavidade oral destes camundongos.

As demais cepas testadas, *L. acidophilus* HS101, *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Howaru, também apresentaram capacidade em inibir o crescimento das espécies de *Candida*, porém numa proporção menor, entre 48,4% a 57,3% (tabela 5.22) e quando comparadas entre si não apresentaram diferença significativa, $p < 0,05/6$ (tabela 5.27). Portanto, acreditamos que as espécies *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*, de maneira geral, apresentam ação antifúngica. No entanto, somente podemos afirmar que a ação antifúngica foi significativamente melhor para *L. rhamnosus* Lr-32.

Inicialmente, estávamos testando a cepa *L. rhamnosus* HS111, mas tivemos problemas de contaminação da amostra e não conseguimos adquirir novamente esta cepa, por este motivo excluimos desta parte da pesquisa. Desta forma, não conseguimos testar *in vitro* e verificar qual era a cepa do bioproduto que agiu contra *Candida* oral, quando testados em seres humanos. Contudo, a cepa *L. acidophilus* HS101 teve capacidade de inibição completa da levedura *in vitro* em 50%, a ação da cepa *L. rhamnosus* HS111 pode ter agido mais eficazmente, ou ainda pode ter sido a associação das duas cepas que resultou no sucesso do tratamento com esses probióticos. Esta investigação precisa ser realizada em futuras pesquisas para melhores esclarecimentos.

6.2.2 *Lactobacillus* x inibição de crescimento de *Candida* com relação à origem de isolamento (palato ou prótese)

Quando verificada a associação entre as cepas de *Lactobacillus* e a origem das amostras de *Candida*, a inibição completa foi maior para as amostras isoladas da prótese ao invés do palato (tabela 5.23). Essa diferença foi significativa para todas as cepas testadas, segundo teste de regressão logística: *L. rhamnosus* Lr-32, $p = 0,0129$, sendo 5,7 vezes a chance de inibir completamente de uma amostra da prótese em relação à amostra da boca (tabela 5.34); *L. acidophilus* HS101, $p < 0,0001$, sendo 18,9 vezes a chance de inibir amostra da prótese em relação à amostra da boca (tabela 5.30); *L. acidophilus* NCFM, $p = 0,0111$, sendo 4,1 vezes a chance de inibir amostra da prótese em relação à amostra da boca (tabela 5.32), e *L. rhamnosus* Howaru ($p = 0,0204$), sendo 4,2 vezes a chance de inibir completamente de uma amostra da prótese em relação à amostra da boca (tabela 5.36).

As quatro cepas de *Lactobacillus* foram testadas com as mesmas amostras de *Candida* e todas apresentaram maior capacidade de inibição completa da levedura para aquelas isoladas das próteses. Sabemos que a distribuição das espécies de *Candida* não foi diferente em relação à origem das amostras, $p = 0,7679$ (tabela 5.37), ou seja, foram isoladas tanto das próteses quanto do palato as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*, em frequências

relativas bem próximas. Entretanto, acreditamos que haja alguma diferença entre as leveduras isoladas da prótese e do palato, talvez, diferenciem-se por sua afinidade de adesão aos sítios, como o epitélio humano e o acrílico das próteses dentárias, ou ainda, por sua capacidade de virulência por meio da produção de exoenzimas.

É sabido que a colonização de *Candida* inicia-se pelo fenômeno de adesão (60). Nas células epiteliais bucais a levedura é atraída por forças de natureza física. Depois do contato com as células do hospedeiro, a interação é feita por meio de proteínas, entre a parede celular da levedura com a porção terminal da glicoproteína humana (62). Outros receptores presentes na parede celular da levedura podem mediar a sua aderência a outros microrganismos presentes na cavidade bucal, e são chamados de adesinas. Nas próteses, geralmente, o gênero *Candida* está presente no biofilme. Este é formado por uma matriz de glicoproteínas e polissacarídeos produzidos pelos próprios microrganismos que compõe o biofilme (53), ficando enclausurados dentro desta estrutura também conhecida como placa dental. A adesão de *Candida* sobre a superfície da prótese também é promovida pela hidrofobicidade da superfície celular (165). Por outro lado, a superfície de acrílico das próteses dentárias também protege o biofilme formado, favorecendo a colonização da levedura, pois o ambiente é úmido, possui baixo pH e a prótese protege da ação de proteínas antifúngica presentes na saliva. Para esclarecer essa dúvida, é necessário investigar se a cepa que está presente no acrílico é a mesma isolada da mucosa, por meio de testes moleculares.

Outro fator a ser investigado é a produção de exoenzimas (fosfolipase e proteinase) produzidas por *Candida*, pois essas enzimas auxiliam tanto na invasão da levedura aos tecidos do hospedeiro, permitindo a sua colonização, quanto no mecanismos de defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro. Portanto, é importante verificar se as leveduras isoladas das próteses também secretam fosfolipase e proteinase.

6.2.3 *Lactobacillus* x inibição de crescimento de *Candida* com relação às espécies

Quando verificada a associação entre as cepas de *Lactobacillus* e as espécies de *Candida*, a inibição completa foi maior para algumas espécies (tabela 5.24). Essa diferença foi significativa para todas as cepas testadas, segundo teste de regressão logística: *L. rhamnosus* Lr-32 ($p = 0,0138$, sendo que a chance de inibir completamente *C. albicans* é 27,4 vezes a chance de inibir completamente outras espécies exceto *C. glabrata* e *C. tropicalis*, tabela 5.34), *L. acidophilus* HS101 ($p = 0,0014$, sendo que a chance de inibir *C. albicans* ou *C. tropicalis* é 51,4 vezes maior que a chance de inibir *C. glabrata* (tabela 5.30), *L. acidophilus* NCFM ($p = 0,0038$, sendo que a chance de inibir completamente a espécie *C. albicans* é 14,6 vezes a chance de inibir completamente a espécie *C. glabrata*, tabela 5.32) e *L. rhamnosus* Howaru ($p = 0,0371$, sendo que a chance de inibir completamente a espécie *C. albicans* é 9,9 vezes a chance de inibir completamente *C. glabrata*, tabela 5.36). O fato da espécie *C. albicans* ser a mais inibida por *Lactobacillus* é um resultado favorável, pois esta espécie é a mais prevalente da cavidade bucal. Portanto, os resultados deste estudo *in vitro* confirmam os resultados que obtivemos *in vivo*, os probióticos foram eficazes na inibição de *Candida* sp. Portanto, os probióticos das espécies testadas, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus*, possuem ação antifúngica.

6.2.4 *Lactobacillus* x sensibilidade aos antifúngicos: miconazol e nistatina

O tratamento convencional para a candidose oral, assim como para a estomatite sob prótese consiste em utilizar-se nistatina ou nitrato de miconazol, de duas a três vezes ao dia, durante 15 dias. Estes fármacos são eficazes na eliminação de *Candida* sp, no entanto, quando utilizados por idosos usuários de próteses totais, alguns relatam certo desconforto gastrointestinal. Por outro lado, atualmente tem-se valorizado muito as ações preventivas contra doenças e

tratamentos alternativos que buscam a melhora na qualidade de vida dos indivíduos, assim, os probióticos podem ser uma boa alternativa.

Os resultados desta parte do trabalho, em que verificamos se há correlação entre a capacidade dos probióticos em inibir o crescimento de *Candida* com a sensibilidade aos antifúngicos convencionais, evidenciaram que as espécies de *Candida* foram sensíveis ao miconazol em 73,5% e à nistatina em 95,9% (tabela 5.21), porém sem diferença estatisticamente significativa para qualquer uma das cepas de *Lactobacillus*: *L. acidophilus* HS 101 ($p = 0,6898$ para miconazol e $p = 0,5213$ para nistatina, tabela 5.29); *L. acidophilus* NCFM ($p = 0,4709$ para miconazol e $p = 0,5213$ para nistatina, tabela 5.31); *L. rhamnosus* Lr-32 ($p = 1,0000$ para miconazol e $p = 1,0000$ para nistatina, tabela 5.33), e *L. rhamnosus* Howaru ($p = 1,0000$ para miconazol e $p = 0,4894$ para nistatina, tabela 5.35). Podemos, portanto, afirmar que os probióticos possuem boa ação antifúngica contra *Candida* similar aos antifúngicos convencionais. Entretanto, não podemos afirmar que houve melhor ação antifúngica dos probióticos para aquelas espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos convencionais, pois poucas amostras foram resistentes, não sensíveis, aos fármacos.

Com base nesses conhecimentos e nos resultados obtidos, consideramos imprescindível a manutenção da saúde do indivíduo, em especial do idoso usuário de próteses totais, por meio de terapias com probióticos, sendo esta uma alternativa natural e eficaz.

7 CONCLUSÕES

7 Conclusões

Nós concluímos que:

- A elaboração do bioproduto, na forma de apresentação em cápsula, contendo os probióticos *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101 puderam ser utilizados pelos usuários de próteses totais, prevenindo a candidose, com adequado perfil de segurança.
- Os probióticos, na forma de bioproduto, foram eficazes na redução da prevalência de *Candida* oral quando utilizados por usuários de próteses totais.
- A capacidade dos probióticos em reduzir a levedura independe da espécie de *Candida*, assim como, da quantidade de UFC inicial e da condição de higiene. Portanto, a utilização tópica dos probióticos pode ser indicada como método preventivo contra infecções oportunistas causadas por *Candida* sp.
- As bacteriocinas não foram o mecanismo que probióticos atuaram na eliminação de *Candida*, pois não houve a produção dessas substâncias pelas cepas testadas de *Lactobacillus* quando em contato com as espécies de *Candida* isoladas da boca. Portanto, o mecanismo de ação dos probióticos contra *Candida* deve ser pesquisado em estudos futuros.
- Nos testes *in vitro*, as cepas de *Lactobacillus* testadas apresentaram capacidade de inibição de *Candida* sp. Portanto, as cepas analisadas possuem ação antifúngica contra *Candida* oral, isoladas de usuários de próteses totais.
- A cepa *L. rhamnosus* Lr-32 foi a que apresentou maior probabilidade de inibir completamente o microrganismo *Candida* quando comparada aos probióticos: *L. acidophilus* NCFM, *L. acidophilus* HS101 e *L.rhamnosus* Howaru.

- Para todas as cepas de *Lactobacillus*, a probabilidade de inibir completamente a levedura foi maior nas amostras de origem da prótese.
- *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior probabilidade de ser inibida completamente pelas cepas de *Lactobacillus*.
- A sensibilidade de *Candida* sp. aos antifúngicos nistatina e miconazol, não mostrou correlação com a resposta da ação antifúngica das cepas de *Lactobacillus*. Portanto, não podemos afirmar que houve melhor ação antifúngica dos probióticos para aquelas espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos convencionais, pois poucas amostras de *Candida* foram resistentes a estes fármacos.
- A distribuição das espécies de *Candida* não variou de acordo com a origem da amostra (palato ou prótese).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

1. Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci.* 2002 Feb;15(1):1-9.
2. Chimenos E, Puy D, Lopez J. Antifungal drugs in the management of mycosis. *Med Oral.* 1998 Mar-Apr;3(2):78-90.
3. Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis in the older patient. *J Am Geriatr Soc.* 1997 Jul;45(7):863-70.
4. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. *J Am Dent Assoc.* 2011 Feb;142 Suppl 1:1S-20S.
5. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res.* 1999 Apr;78(4):857-68.
6. Franca JC, Ribeiro CE, Queiroz-Telles F. [Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Jan-Feb;41(1):23-8.
7. Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002 Apr;50(4):243-60.
8. Belazi M, Velegraki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, et al. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Dec;19(6):347-51.
9. Food and Agriculture Organization of the United Nations WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. . Córdoba. 2001:34p.
10. Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* 2003 Mar;61(3):91-9.
11. Puupponen-Pimiä R, Aura AM, Oksmankaldentey KM, Myllärinen P, Saarela M, Mattila-Sanholm T, et al. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci Technol, Amsterdam.* 2002;13:3-11.
12. Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005 Jun;13(2):69-75.
13. Paula CR. Candidíase. In: ZAITZ, C. *Compêndio de Micologia Médica.* São Paulo: Ed. MEDSI; 1998.
14. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 1999 Aug;10(3):359-83.
15. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J.* 1979 Nov 20;147(10):267-72.
16. Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974;82(2):151-90.
17. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Arch Oral Biol.* 1980;25(1):1-10.
18. Rams TE, Slots J. *Candida* biotypes in human adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1991 Jun;6(3):191-2.

19. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005 Mar;93(3):288-93.
20. Wright PS, Clark P, Hardie JM. The prevalence and significance of yeasts in persons wearing complete dentures with soft-lining materials. *J Dent Res*. 1985 Feb;64(2):122-5.
21. Cumming CG, Wight C, Blackwell CL, Wray D. Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol*. 1990 Apr;5(2):82-5.
22. Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1993 Oct;21(5):313-6.
23. Darwazeh AM, Al-Refai S, Al-Mojaiwel S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *J Prosthet Dent*. 2001 Oct;86(4):420-3.
24. Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, et al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Feb;17(1):44-9.
25. Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Jan;95(1):51-9.
26. Abaci O. Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida* species isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. *Curr Microbiol*. Apr;62(4):1308-14.
27. Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992 Feb;73(2):171-80.
28. Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):99-116.
29. Spiechowicz E, Renner RP, Pollock JJ, Santarpia RP, 3rd, Ciechowicz B, Kowalczyk W, et al. Sensitivity of the replica method in the detection of candidal infection among denture wearers with clinically healthy oral mucosa. *Quintessence Int*. 1991 Sep;22(9):753-5.
30. Odds FC. *Candida and candidosis*. 2nd ed ed. London: Bailliere Tindall; 1988.
31. Nyquist G. A study of denture sore mouth; an investigation of traumatic, allergic and toxic lesions of the oral mucosa arising from the use of full dentures. *Acta Odontol Scand Suppl*. 1952;10(9):1-154.
32. Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis v candida agglutinins in human sera. *Acta Odontol Scand*. 1972 Sep;30(3):313-25.
33. Budtz-Jorgensen E. [The role of *Candida albicans* in the development of stomatitis in denture wearers]. *Med Hyg (Geneve)*. 1975 Oct 8;33(1164):1434-5.
34. Mikkonen M, Nyysönen V, Paunio I, Rajala M. Prevalence of oral mucosal lesions associated with wearing removable dentures in Finnish adults. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1984 Jun;12(3):191-4.
35. Hand JS, Whitehill JM. The prevalence of oral mucosal lesions in an elderly population. *J Am Dent Assoc*. 1986 Jan;112(1):73-6.
36. Brauer L, Bessermann M, Frijs-Madsen B, Brauer E. Oral health status and needs for dental treatment in geriatric patients in a Danish district hospital. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1986 Jun;14(3):132-5.

37. Wilkieson C, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, MacKenzie D. Oral candidosis in the elderly in long term hospital care. *J Oral Pathol Med*. 1991 Jan;20(1):13-6.
38. Jorge Junior J, de Almeida OP, Bozzo L, Scully C, Graner E. Oral mucosal health and disease in institutionalized elderly in Brazil. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1991 Jun;19(3):173-5.
39. Corbet EF, Holmgren CJ, Phillipsen HP. Oral mucosal lesions in 65-74-year-old Hong Kong Chinese. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1994 Oct;22(5 Pt 2):392-5.
40. Emami E, Seguin J, Rompre PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *Int J Prosthodont*. 2007 Sep-Oct;20(5):514-20.
41. Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res*. 1995 May;74(5):1152-61.
42. Budtz-Jorgensen E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990 Feb;48(1):61-9.
43. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*. 1994 Sep;31(3 Pt 2):S2-5.
44. Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*. 2000 Sep-Oct;18(5):553-62.
45. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.
46. Samaranayake LP. Denture stomatitis. *Aust Dent J*. 1992 Aug;37(4):319-20.
47. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jul;98(1):53-9.
48. Knight L, Fletcher J. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids, and diabetes mellitus. *J Infect Dis*. 1971 Apr;123(4):371-7.
49. Lopez-Martinez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol*. 2010 Mar 4;28(2):178-84.
50. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J*. 1998 Feb;43(1):45-50.
51. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev*. 2001 Apr;14(2):398-429.
52. Samaranayake LP. Superficial oral fungal infections. *Curr Opin Dent*. 1991 Aug;1(4):415-22.
53. ten Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, de Groot PW. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *J Dent Res*. 2009 Feb;88(2):105-15.
54. Nikawa H, Jin C, Makihiro S, Egusa H, Hamada T, Kumagai H. Biofilm formation of *Candida albicans* on the surfaces of deteriorated soft denture lining materials caused by denture cleansers in vitro. *J Oral Rehabil*. 2003 Mar;30(3):243-50.
55. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother*. 2000 Sep;46(3):397-403.

56. Dorocka-Bobkowska B, Konopka K. Susceptibility of candida isolates from denture-related stomatitis to antifungal agents in vitro. *Int J Prosthodont*. 2007 Sep-Oct;20(5):504-6.
57. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. Mar;16(2):e139-43.
58. Budtz-Jorgensen E. Clinical aspects of Candida infection in denture wearers. *J Am Dent Assoc*. 1978 Mar;96(3):474-9.
59. Newton AV. Denture sore mouth: a possible etiology. *Br Dent J*. 1962;1:357-60.
60. Kennedy MJ. Models for studying the role of fungal attachment in colonization and pathogenesis. *Mycopathologia*. 1990 Feb;109(2):123-37.
61. Nikawa H, Egusa H, Makihiro S, Okamoto T, Kurihara H, Shiba H, et al. An in vitro evaluation of the adhesion of Candida species to oral and lung tissue cells. *Mycoses*. 2006 Jan;49(1):14-7.
62. Sitheequ MA, Samaranayake LP. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(4):253-67.
63. Holmes AR, Cannon RD, Jenkinson HF. Interactions of Candida albicans with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J Ind Microbiol*. 1995 Sep;15(3):208-13.
64. Kanbe T, Cutler JE. Evidence for adhesin activity in the acid-stable moiety of the phosphomannoprotein cell wall complex of Candida albicans. *Infect Immun*. 1994 May;62(5):1662-8.
65. Fukayama M, Calderone RA. Adherence of cell surface mutants of Candida albicans to buccal epithelial cells and analyses of the cell surface proteins of the mutants. *Infect Immun*. 1991 Apr;59(4):1341-5.
66. Klotz SA. Adherence of Candida albicans to endothelial cells is inhibited by prostaglandin I₂. *Infect Immun*. 1994 Apr;62(4):1497-500.
67. Edwards JE, Jr., Mayer CL, Filler SG, Wadsworth E, Calderone RA. Cell extracts of Candida albicans block adherence of the organisms to endothelial cells. *Infect Immun*. 1992 Aug;60(8):3087-91.
68. Diamond RD. Interactions of phagocytic cells with Candida and other opportunistic fungi. *Arch Med Res*. 1993 Winter;24(4):361-9.
69. Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on Candida albicans adhesion to denture acrylic in vitro. *Arch Oral Biol*. 1992 Aug;37(8):613-22.
70. Kimura LH, Pearsall NN. Relationship between germination of Candida albicans and increased adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun*. 1980 May;28(2):464-8.
71. Santoni G, Gismondi A, Liu JH, Punturieri A, Santoni A, Frati L, et al. Candida albicans expresses a fibronectin receptor antigenically related to alpha 5 beta 1 integrin. *Microbiology*. 1994 Nov;140 (Pt 11):2971-9.
72. Soll DR. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop*. 2002 Feb;81(2):101-10.
73. Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, et al. Comparison of virulence factors of oral Candida dubliniensis and Candida albicans isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Aug;15(4):238-44.

74. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 2002 Jun;45(5-6):160-5.
75. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003 Nov;3(11):685-702.
76. Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc*. 1992 Jan;123(1):46-51.
77. Goncalves e Silva CR, Melo KE, Leao MV, Ruis R, Jorge AO. [Relationship between *Candida* in vaginal and oral mucosae and salivary IgA]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008 Jun;30(6):300-5.
78. Jafarzadeh A, Sadeghi M, Karam GA, Vazirinejad R. Salivary IgA and IgE levels in healthy subjects: relation to age and gender. *Braz Oral Res*. Mar;24(1):21-7.
79. Janket S, Meurman JH, Baird AE, Qvarnstrom M, Nuutinen P, Ackerson LK, et al. Salivary Immunoglobulins and Prevalent Coronary Artery Disease. *Journal of Dental Research*. 2010 Apr;89(4):389-94.
80. Guyton AC, Hall JE. Mecanismo de Ação dos Anticorpos. In: Koogan G, editor. *Tratado de Fisiologia Médica*; 1997. p. 408-9.
81. Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly--a randomized controlled trial. *J Dent Res*. 2007 Feb;86(2):125-30.
82. Collins JK, Thornton G, al e. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal* 1998;8(5-6):487-90.
83. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*. 2000 Dec 28;84(3):197-215.
84. Regezi JA. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. . 3 ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
85. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001;21(1):4-8.
86. Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, et al. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999 Jul-Nov;76(1-4):279-92.
87. Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci*. 2001 Feb;84(2):319-31.
88. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Rev Microbiol*. 2002;28(4):281-370.
89. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, et al. Market potential for probiotics. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb;73(2 Suppl):476S-83S.
90. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. [Revisão de literatura]. 2006 jan/mar;42(1):1-16.
91. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today*. 2003 Aug 1;8(15):692-700.
92. Fuller R. Probiotics in human medicine. *Gut*. 1991 Apr;32(4):439-42.
93. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry? *Eur J Oral Sci*. 2005 Jun;113(3):188-96.

94. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1999 Jan;39(1):13-126.
95. De Martinis EC, Franco BD. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. *Int J Food Microbiol*. 1998 Jun 30;42(1-2):119-26.
96. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. *J Appl Microbiol*. 2001 Feb;90(2):172-9.
97. Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol*. 2006 Apr;100(4):754-64.
98. Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009 Jun;36(6):506-13.
99. Kaiser AL, Montville TJ. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Appl Environ Microbiol*. 1996 Dec;62(12):4529-35.
100. Montville TJ, Bruno ME. Evidence that dissipation of proton motive force is a common mechanism of action for bacteriocins and other antimicrobial proteins. *Int J Food Microbiol*. 1994 Dec;24(1-2):53-74.
101. Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 2004 Mar 12;303(5664):1662-5.
102. Boderia P, Chcialowski A. Immunomodulatory effect of probiotic bacteria. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2009 Jan;3(1):58-64.
103. Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Gastroenterol*. 2000 Jan;95(1 Suppl):S11-3.
104. Payne S, Gibson G, Wynne A, Hudspeth B, Brostoff J, K. T. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to *Candida albicans* and the effects of tetracycline and *Lactobacillus plantarum* LPK. *Curr Issues Intest Microbiol*. 2003;4:1-8.
105. Ishikawa KH, Silva EG, Paula CR, Matsubara VH, Lopes D, Nakamae AEM. Utilization of probiotics for control the prevalence of oral candida in patients complete denture users. *Mycoses* 2009 Oct;52(Sup s1):113.
106. Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Apr;23(2):139-47.
107. Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol*. 2005 Jul;141(1):29-36.
108. Strus M, Brzychczy-Wloch M, Kucharska A, Gosiewski T, Heczko PB. [Inhibitory activity of vaginal *Lactobacillus* bacteria on yeasts causing vulvovaginal candidiasis]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2005;57(1):7-17.
109. Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Sep;68(9):4322-7.
110. Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J*. 2006;30(2):55-60.

111. Twetman L, Larsen U, Fiehn NE, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Coaggregation between probiotic bacteria and caries-associated strains: An in vitro study. *Acta Odontol Scand*. 2009 May 27;1-5.
112. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*. 2008 Oct;35(10):897-905.
113. Marcotte H, Koll-Klais P, Hultberg A, Zhao Y, Gmur R, Mandar R, et al. Expression of single-chain antibody against RgpA protease of *Porphyromonas gingivalis* in *Lactobacillus*. *J Appl Microbiol*. 2006 Feb;100(2):256-63.
114. Haukioja A, Loimaranta V, Tenovou J. Probiotic bacteria affect the composition of salivary pellicle and streptococcal adhesion in vitro. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):336-43.
115. Caglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta Odontol Scand*. 2006 Oct;64(5):314-8.
116. Caglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Investig*. 2007 Dec;11(4):425-9.
117. Caglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int J Paediatr Dent*. 2008 Jan;18(1):35-9.
118. Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res*. 2009;43(5):374-81.
119. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res*. 2001 Nov-Dec;35(6):412-20.
120. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*. 2002 Nov;47(11):799-804.
121. Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol Immunol*. 2007 Apr;22(2):111-7.
122. Buriti FC, Okazaki TY, Alegro JH, Saad SM. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. *Arch Latinoam Nutr*. 2007 Jun;57(2):179-85.
123. Buriti FCA, da Rocha JS, Assis EG, Saad SMI. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. *Lwt-Food Sci Technol*. 2005;38(2):173-80.
124. Buriti FCA, da Rocha JS, Saad SMI. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *Int Dairy J*. 2005 Dec;15(12):1279-88.
125. Cardarelli HR, Aragon-Alegro LC, Alegro JHA, de Castro IA, Saad SMI. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *J Sci Food Agr*. 2008 Jun;88(8):1318-24.

126. Cardarelli HR, Buriti FCA, Castro IA, Saad SMI. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. *Lwt-Food Sci Technol*. 2008;41(6):1037-46.
127. Correa SBM, Castro IA, Saad SMI. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *Int J Food Sci Tech*. 2008 Sep;43(9):1560-8.
128. Cruz AG, Antunes AEC, Sousa ALOP, Faria JAF, Saad SMI. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Res Int*. 2009 Nov;42(9):1233-9.
129. de Souza CHB, Buriti FCA, Behrens JH, Saad SMI. Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. *Int J Food Sci Tech*. 2008 May;43(5):871-7.
130. Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *Fems Immunology and Medical Microbiology*. 2010 Jun;59(1):53-9.
131. Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010 Jun 1;59(1):53-9.
132. Gill HS, Rutherfurd KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr*. 2001 Dec;74(6):833-9.
133. Gill HS, Rutherfurd KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol*. 2001 Jul;21(4):264-71.
134. Candore G, Balistreri CR, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, Lio D, Listi F, et al. Immunosenescence and anti-immunosenescence therapies: the case of probiotics. *Rejuvenation Res*. 2008 Apr;11(2):425-32.
135. de Felice SL. The need for research-intensive nutraceutical industry: what can congress do? (the claims research connection). In: Shaw S, editor. *Functional food nutraceutical or pharmaceutical?* London: IBC; 1996. p. 15-6.
136. Bagchi K, Musani A, Tomeh L, Taha A. Nutrition in humanitarian crises. *East Mediterr Health J*. 2004 Nov;10(6):747-53.
137. Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeast: A Taxonomic Study*. 4 ed. New York; 1998.
138. Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998 Feb;36(2):329-34.
139. Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002 May;43(1):85-6.
140. Todorov SD, Dicks LM. Parameters affecting the adsorption of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. *Biotechnol J*. 2006 Apr;1(4):405-9.
141. Fitzsimmons N, Berry DR. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios*. 1994;80(323):125-33.
142. Reid G, Soboh F, Bruce AW, Mittelman M. Effect of nutrient composition on the in vitro growth of urogenital lactobacilli and uropathogens. *Can J Microbiol*. 1998 Sep;44(9):866-71.
143. Agresti A. *Categorical Data Analysis*. 2nd ed. John Wiley and Sons: New Jersey; 2002.

144. Hosmer DW, Lemeshow S. Applied Logistic Regression. 2 ed. John Wiley and Sons: New York; 2000.
145. Hardin JW, Hilbe JM. Generalized estimating equations, Chapman and Hall: Boca Raton. 2003.
146. Neter J, Kutner MK, Nachtsheim CJ, Wasserman W. Applied Linear Statistical Models. 4 ed. Irwin: Chicago.; 1996.
147. Devine DA, Percival RS, Wood DJ, Tuthill TJ, Kite P, Killington RA, et al. Inhibition of biofilms associated with dentures and toothbrushes by tetrasodium EDTA. J Appl Microbiol. 2007 Dec;103(6):2516-24.
148. Falagas ME, Makris GC. Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. J Hosp Infect. 2009 Apr;71(4):301-6.
149. Gill HS, Guarner F. Probiotics and human health: a clinical perspective. Postgrad Med J. 2004 Sep;80(947):516-26.
150. Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels. Bratisl Lek Listy. 2005;106(2):67-72.
151. Jauhiainen T, Vapaatalo H, Poussa T, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Korpela R. *Lactobacillus helveticus* fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement. Am J Hypertens. 2005 Dec;18(12 Pt 1):1600-5.
152. Ishikawa H, Akedo I, Otani T, Suzuki T, Nakamura T, Takeyama I, et al. Randomized trial of dietary fiber and *Lactobacillus casei* administration for prevention of colorectal tumors. Int J Cancer. 2005 Sep 20;116(5):762-7.
153. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhannosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. Clin Infect Dis. 2006 Jun 15;42(12):1735-42.
154. Ronnqvist D, Forsgren-Brusk U, Husmark U, Grahn-Hakansson E. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. J Med Microbiol. 2007 Nov;56(Pt 11):1500-4.
155. Collado MC, Grzeskowiak L, Salminen S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. Curr Microbiol. 2007 Sep;55(3):260-5.
156. Walker WA. Mechanisms of action of probiotics. Clin Infect Dis. 2008 Feb 1;46 Suppl 2:S87-91; discussion S144-51.
157. Wagner RD, Pierson C, Warner T, Dohnalek M, Farmer J, Roberts L, et al. Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. Infect Immun. 1997 Oct;65(10):4165-72.
158. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. Aust Dent J. 1998 Aug;43(4):244-9.
159. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. Adv Med Sci. 2006;51 Suppl 1:77-80.
160. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. Aust Dent J. 1998 Jun;43(3):160-6.
161. Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida glabrata*: an emerging oral opportunistic pathogen. J Dent Res. 2007 Mar;86(3):204-15.

162. Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil.* 2002 May;29(5):452-7.
163. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA, et al. High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med.* 2003 Sep;17(6):477-81.
164. Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Ishikawa KH, Nakamae AEM. Treatment with probiotic in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis.* 2011.
165. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *APMIS.* 2002 Sep;110(9):601-10.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO FR – 200047 Protocolo 124/2008

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**Utilização de probióticos para o controle da prevalência de cândida em pacientes edentados totais**", de responsabilidade da pesquisador(a) Karin Hitomi Ishikawa, sob orientação do(a) Prof(a). Dr(a). Matsuyoshi Mori.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 18 de setembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO

Protocolo 124/08

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a acréscimo na metodologia com avaliação da atividade enzimática e de teste de sensibilidade a antifúngicos, bem como alteração do título do Projeto de: "Utilização de probióticos para o controle da prevalência de cândida em pacientes edentados totais", para: **"Utilização de probióticos para o controle da prevalência de Candida oral em pacientes edentados totais. Influência na produção de exoenzimas e susceptibilidade aos antifúngicos"**, de responsabilidade da pesquisador(a) Karin Hitomi Ishikawa, sob orientação do(a) Prof(a). Dr(a). Atlas Edson Moleros Nakamae.

São Paulo, 03 de setembro de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP

Anexo C - FICHA DO PACIENTE

NOME: _____ IDADE: _____
 GÊNERO ()M ()F ETNIA ()leucoderma ()melanoderma ()outro _____
 END.: _____
 TEL: _____ PROFISSÃO: _____

CONDIÇÃO SOCIO-ECONOMICA:

1. ESTUDO:
 () nenhum, () fundamental incompleto, () fundamental completo, () médio incompleto,
 () médio completo, () superior incompleto, () superior completo.
2. QUANTAS PESSOAS MORAM NA SUA CASA: _____
3. QUANTOS CÔMODOS TÊM: _____
4. RENDA FAMILIAR MÉDIA: _____ (salário mínimo)
5. ALIMENTAÇÃO:
 () sopa, () batido no liquidificador, () arroz, feijão, () carne, () verdura crua,
 () verdura cozida, () legumes, () frutas em geral, () frutas moles ou amassadas

EXAME CLÍNICO:

1. CONDIÇÃO DE SAÚDE GERAL: () boa () hipertensão () diabetes
 () colesterol () triglicérides () doença cardíaca () _____
 2. MEDICAMENTOS: _____
 3. ALERGIA: () sim _____ () não.
 4. PROBLEMAS INTESTINAIS: () não () intestino preso () diarreias frequentes
 5. LESÃO NA MUCOSA :
 () leucoplasias () hiperplasia () ulceração () lesão oral pigmentada
 6. LESÃO RELACIONADA A *CANDIDA*:
 () estomatite protética () queilite angular () glossite rombóide
 7. ARDÊNCIA BUCA () sim () não
 8. SENSÇÃO DE BOCA SECA () sim () não
 9. MUSCULATURA:
 Bucinador () rígido () normal () flácido
 Língua () rígida () normal () flácida
 Lábios () rígido () normal () flácido
 Freios labiais () rígido () normal () flácido
 Freio lingual () rígido () normal () flácido
 Inserções musculares () rígido () normal () flácido
 10. TIPO DE REBORDO:
 () alto () normal () baixo
 () reabsorvido () em lâmina () estrangulado;
 11. CONSISTÊNCIA DO REBORDO:
 () rígido () resiliente () flácido
 12. CONDIÇÃO DENTAL:
 () desdentado total sup e inferior () unimaxilar com problema periodontal
 () necessita de tratamento restaurador () em bom estado.
 13. TRATAMENTOS REALIZADOS RECENTEMENTE: _____
 14. ANTAGONISTA: () PPR provisória () PPR definitiva () dentado () necessita e não utiliza.
- PRÓTESE TOTAL:
1. UTILIZA PT? () bimaxilar () uni superior () uni inferior () não.

2. QUANTAS PRÓTESES USOU? _____

3. QUANTOS ANOS TÊM A PRÓTESE?

() 1 ano ou menos () 2 a 5 anos () 6 a 10 anos () mais de 10 anos

4. A PRÓTESE TOTAL:

Condição geral () íntegra () perfurada () com fratura () quebrada;

Dentes () em bom estado () faltando () quebrados () muito desgastados;

Dor () não sente () machuca pouco () machuca muito;

Adaptação () bem adaptada () sem retenção () sem estabilidade () báscula;

DVO () adequada () inadequada;

Estética () boa () prejudicada mas aceita () não está satisfeito;

Fonética () boa () prejudicada mas aceita () não está satisfeito;

Mastigação () boa () prejudicada mas utiliza () não utiliza a prótese.

CONDIÇÃO DE HIGIENE DA PRÓTESE INÍCIO: () limpa () placa () muita placa () cálculo

() muito cálculo () pigmento () opaca () odor desagradável

CONDIÇÃO DE HIGIENE DA PRÓTESE 5 SEMANAS: () limpa () placa () muita placa

() cálculo () muito cálculo () pigmento () opaca () odor desagradável

COLETA DA AMOSTRA DE SALIVA PARA AVALIAÇÃO LABORATORIAL:

____/____/____ - INÍCIO

____/____/____ - 5 SEMANAS

ORIENTAÇÃO AO PACIENTE: não comer, não beber (exceto água) e não fumar, no período de 1 hora antes da coleta.

Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: UTILIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA O CONTROLE DA PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* EM PACIENTES EDENTADOS TOTAIS.

Pesquisador (es) responsável(is): Karin Hitomi Ishikawa e Atlas Nakamae

Instituição/Departamento: FOU SP/ Departamento de Prótese Dentária

Telefone para contato: 3091-7882

Local da coleta de dados: Clínica da FOU SP, Disciplina de Prótese Total II

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa de forma totalmente voluntária.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes de você se decidir a participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha direito.

Objetivo do estudo: avaliar a influência de probióticos em pacientes usuários de próteses totais que apresentam *Candida* oral, como medida terapêutica e profilática para a manifestação da estomatite protética. Os probióticos são “Microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (ANVISA). Estes probióticos são encontrados em produtos alimentícios como leites fermentados e iogurtes.

Procedimentos. Sua participação nesta pesquisa consistirá em permitir a coleta de saliva para análise laboratorial e fazer o uso de um produto. Você terá que despejar o conteúdo da cápsula sobre a prótese superior já limpa, uma vez ao dia, durante cinco semanas.

Benefícios. Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre a eficácia dos probióticos no controle da *Candida*, trazendo diversos benefícios para sua saúde. Os mais conhecidos são aumento da resistência contra bactérias causadoras de doenças, melhora do funcionamento do intestino preso e controle da diarreia.

Riscos. A sua participação nesta pesquisa não representará qualquer risco de ordem física ou psicológica para você. Se por um acaso, o produto causar qualquer desconforto, mal estar, ou diarreia, você deverá suspender o uso do produto e comunicar imediatamente os pesquisadores, para que você seja atendido.

Sigilo. As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os sujeitos da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma.

Assinatura: _____

Nome: _____ Data: ____/____/____

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo SP

Tel.: (11) 3091.7840 Fax: (11) 3091.7842