UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARINE ERVOLINO DE OLIVEIRA

***Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da
presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue**

BAURU

2009

CARINE ERVOLINO DE OLIVEIRA

***Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

BAURU
2009

OLIVEIRA, CARINE ERVOLINO
OI4c *Candida albicans* e estomatite por dentadura:
avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese
total superior e no sangue / Carine Ervolino de Oliveira.
-- Bauru, 2009.
92 folhas.: 30cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de
Bauru.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução
total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros
meios eletrônicos.

Assinatura:

Bauru, de de 2009

Comitê de Ética em Pesquisa da
FOB-USP
Protocolo n°:
Data:

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que, de uma forma ou outra, me apoiaram a trilhar este caminho, especialmente a minha mãe que além de Sônia é também Maria...

*Maria, Maria
É um dom, uma certa magia
Uma força que nos alerta
Uma mulher que merece
Viver e amar
Como outra qualquer
Do planeta*

*Maria, Maria
É o som, é a cor, é o suor
É a dose mais forte e lenta
De uma gente que ri
Quando deve chorar
E não vive, apenas aguenta*

*Mas é preciso ter força
É preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo a marca
Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria*

*Mas é preciso ter manha
É preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca
Possui a estranha mania
De ter fé na vida....*

Milton Nascimento e Fernando Brant

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr. Vanessa Soares Lara, pela competência e eficiência com que conduziu a orientação deste trabalho. Por mais que expresse, minhas palavras não seriam capazes de traduzir a gratidão e o respeito que tenho pela sua pessoa. Pela enorme contribuição à minha formação profissional e incentivo ao longo deste período.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dr. Luís Antonio de Assis Taveira e Prof. Dr. Denise Tostes Oliveira, pela transmissão de conhecimentos durante os cursos de graduação e pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto, por todo apoio e pela colaboração para a seleção dos pacientes e por permitir a utilização dos equipamentos do Centro Integrado de Pesquisa (CIP).

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, exemplo de dedicação à pesquisa, agradeço pelas opiniões valiosas na banca de qualificação e por todo apoio para a realização da PCR. A você, toda admiração e respeito.

À Prof. Dr. Lucimar Falavinha Vieira, por gentilmente permitir a seleção de alguns pacientes do curso de especialização e durante a clínica da graduação.

À Prof. Dr. Nilce Emy Tomita, orientadora de iniciação científica e uma das responsáveis pelo início da minha vida acadêmica e científica. Agradeço pela orientação, amizade e por estimular meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Tadashi, pelos bons momentos compartilhados e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, pela colaboração na realização das análises estatísticas;

Ao Departamento de Ciências Biológicas, Disciplinas de Farmacologia e Fisiologia, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização deste trabalho. Particularmente a secretária Vera, a funcionária Eva, pessoas que tornaram o ambiente de trabalho sempre muito agradável e ao querido Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria grande mestre desde os tempos de graduação.

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização de parte deste trabalho; especialmente ao Luiz Henrique Marchesano e ao Narcizo Almeida Vieira, que coletaram o sangue de todos os pacientes e ao Narcizo que realizou todos os testes de glicemia e tipagem sanguínea. Obrigada por sempre serem tão solícitos e gentis.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Microbiologia, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização de parte deste trabalho. Particularmente a secretária Dalva e a Prof. Dr. Ana Paula Campanelli.

Ao Marcelo, funcionário do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), por toda solicitude.

Ao Thiago José Dionísio, técnico do laboratório das Disciplinas de Fisiologia e Farmacologia, que participou ativamente nas etapas de padronização e realização da PCR. Agradeço por toda sua paciência, gentileza e valiosas opiniões. A você, toda admiração e respeito.

Ao André Luis da Silva, ao Narciso Almeida Vieira, e a Thaís Helena Gasparoto, pela paciência, conselhos, sugestões, carinho e atenção com que me acompanharam e auxiliaram na realização de etapas desta pesquisa e por serem pessoas tão excepcionais. É difícil demonstrar o quanto sou grata. A vocês, todo meu carinho e admiração.

Às funcionárias da Patologia, Cris, Fatiminha e Marilza, por todo carinho e solicitude durante estes anos, que tornaram a convivência alegre e produtiva.

A todos os colegas do curso de pós-graduação Aroldo, Gastão, Erick, Eliane, Janaina, Karen, Milton, Patrícia, Renata, Rosário, Sylvie, Thiago e Vanessa, pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus queridos amigos Maria Carolina Vaz Goulart, Bruno Aiello Barbosa, Érika Sinara, Melaine Lawall e Simone Faustino companheiros de pós-graduação, por poder compartilhar com vocês tantos momentos felizes e tantas aflições. Obrigada por construirmos uma amizade tão sincera e saudável, bem como pelas risadas e pelo companheirismo que marcaram esta nossa fase de convivência acadêmica.

Aos queridos amigos de graduação Marina D. Garcia, Juliana M. Stornido, Nathália Bigelli, Tâmara S. Cintra e Augusto César R. Souza, pelo apoio durante os momentos mais difíceis e pela amizade que me proporcionam até hoje.

À minha mãe, Sonia Maria Ervolino, é difícil dizer o quanto fez por mim. A ela agradeço todo o estímulo e, principalmente, por ter me ensinado a andar com as próprias pernas. Aos meus irmãos Caroline e Juninho constantes no afeto e no companheirismo.

As minhas avós Durvalina Felipeti Ervolino e Olívia de Oliveira por nunca se esquecerem de mim e por suas constantes orações. Ao meu querido avô José Domingues de Oliveira (Zé Branco) *in memoriam*, pelo exemplo de ser humano, por todo carinho, respeito e lições que transmitiu durante toda sua vida; sua ausência me causa uma profunda tristeza, mas lembrar as alegrias que você gerou permite sentir como se você ainda estivesse aqui.

A todos os meus tios e tias, especialmente minhas tias Edna A. E. da Silva e Creuza de F. Ervolino, sempre presentes na minha vida. A todos os meus primos e primas, particularmente ao Edilson Ervolino, pela inspiração de sua prática profissional exemplar, por seus conselhos e pela amizade.

A todos os voluntários que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa. A vocês, meu muitíssimo obrigado.

À Deus pela oportunidade de aprendizado em mais uma vida.

*A vocês, meu agradecimento e a certeza de que todo trabalho se torna leve, gostoso e alegre quando se tem
amigas e amigos por perto.*

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa do excelentíssimo Diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

*À comissão de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa da Presidente, Prof. Dr.
Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.*

*Ao curso de pós-graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa do seu
Coordenador Prof. Dr. Luis Antonio de Assis Taveira.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de minha bolsa de
mestrado.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro,
possibilitando a obtenção de reagentes para a realização deste trabalho.*

Ao Programa de Apoio à Pós-graduação (PROAP), pelo incentivo financeiro.

Ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – Universidade de São Paulo na pessoa da Diretora do Departamento Hospitalar, Prof. Dr. Maria Irene Bachege, por autorizar a realização dos testes de glicemia no Laboratório de Patologia Clínica.

RESUMO

Existem poucos estudos a respeito da presença de constituintes fúngicos na circulação sanguínea de indivíduos com estomatite por dentadura (ED) (AHMAD et al., 2002), considerada uma forma localizada de candidose; o que poderia caracterizar o poder de invasão sistêmica do fungo nesta condição local, bem como um prévio reconhecimento desses antígenos por células presentes na circulação sanguínea do hospedeiro, o que poderia explicar aspectos específicos da resposta imune localizada e sistêmica. Assim sendo, este trabalho teve por objetivo avaliar a presença do fungo *Candida albicans* (*C. albicans*) no palato, na superfície interna das próteses totais superiores e no sangue de pacientes com ED, em dois momentos distintos. A população de estudo foi composta por indivíduos usuários de prótese total superior (PTS), com e sem estomatite por dentadura, avaliados e selecionados nas clínicas de graduação e pós-graduação da Disciplina de Prótese, do Departamento de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP). Indivíduos não usuários de próteses removíveis constituíram o grupo controle. Assim o trabalho foi constituído por três grupos, cada um com 14 pacientes. As lesões de estomatite por dentadura foram diagnosticadas clinicamente e por meio de confirmação microbiológica em CHROMAgar Candida, a partir de material biológico coletado da mucosa palatal e da superfície interna da PTS. A PCR foi realizada quando da ocorrência do crescimento de colônias verdes para diferenciação das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*. As amostras de sangue foram analisadas para a detecção de fragmentos de DNA responsáveis pela codificação da proteína da parede da hifa1(Hwp1) de *C. albicans*, utilizando a técnica da PCR. Os resultados demonstraram que nem os usuários de PTS, independentemente da presença de ED, nem os voluntários não usuários apresentaram a proteína Hwp1 no sangue, em nenhuma das amostras coletadas. A presença de fungos do gênero *Candida* foi mais frequente ($p \leq 0,005$) entre os usuários de PTS com ED quando comparado com os outros indivíduos. Além disso, pudemos constatar que os pacientes com diagnóstico clínico e microbiológico de ED não apresentaram distribuição sanguínea de *C. albicans*.

Palavras-chave: Estomatite sob prótese. *Candida albicans*.

Candida albicans and denture stomatitis: evaluation of the presence of yeast in the lesion, upper denture and blood

ABSTRACT

There are few studies about the presence of yeast constituents in the bloodstream of patients with denture stomatitis (DE), a localized kind of candidiasis; what could characterize the yeast systemic invasion power in this local condition, and also previous acknowledgement of these antigens by cells of the entertainer bloodstream, and explain specific features of the immune located and systemic answer. So being, this work had as a goal to evaluate the presence of the yeast *Candida albicans* (*C. albicans*) at the palate, at the internal surface of the upper denture and in the blood of patients with DE, at two different moments. The population of study was composed by individuals both with and without upper denture, with and without stomatitis, assessed and selected in the clinics of graduation and postgraduation of the Discipline of Prosthesis, of the Department of Prosthesis, of the Faculdade de Odontologia de Bauru of the University of São Paulo (FOB – USP). Individuals who are not users of removable dentures constituted the group control. So the work was constituted by three groups, each one with 14 patients. The injuries of stomatitis were diagnosed clinically and through microbiological confirmation in CHROMAgar Candida, from biological collected material of the palatal mucosa and of the internal surface of the upper denture. The PCR was carried out when the growth of green colonies for differentiation of the stain *C. albicans* and *C. dubliniensis* happened. The samples of blood were analyzed for the detection of fragments of DNA responsible for the codification of the hyphal wall protein (Hwp1) of *C. albicans*. The results demonstrated that not even the users of upper denture, independently of the presence of the DE, not even the volunteers who are not users presented the protein Hwp1 in the blood, in none of the collected samples. The yeast *Candida* presence was more frequent ($p \leq 0,005$) in the group 1 when compared with the other groups. Moreover, we can conclude that patients with clinic and microbiologic diagnostic have not presented bloodstream distribution of *C. albicans*.

Key words: Denture stomatitis. *Candida albicans*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1	CANDIDEMIA E CANDIDOSE SISTÊMICA	15
1.2	ESTOMATITE POR DENTADURA	18
1.3	ADESÃO, PENETRAÇÃO E VIRULÊNCIA DE <i>C. albicans</i> NA CAVIDADE BUCAL	22
1.4	MECANISMOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO NA CANDIDOSE	24
2	PROPOSIÇÃO	29
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	33
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	35
3.2	ISOLAMENTO DE <i>Candida</i> DA LESÃO E DA PRÓTESE TOTAL SUPERIOR, E DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO	36
3.2.1	Confirmação microbiológica das espécies de <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> através da Reação em da Polimerase (PCR)	37
3.2.1.1	Extração de DNA	37
3.2.1.2	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	37
3.2.1.3	Detecção dos produtos amplificados	38
3.3	AVALIAÇÃO SANGUÍNEA	39
3.3.1	Presença de <i>C. albicans</i>	39
3.3.1.1	Extração de DNA	40
3.3.2	Tipagem sanguínea	41
3.3.3	Glicemia em jejum	41
3.3.4	Glicemia Glicosilada	41
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
4	RESULTADOS	43
4.1	ASPECTOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DA AMOSTRAGEM	45
4.2	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DAS ESPÉCIES DE <i>Candida</i> ATRAVÉS DE CHROMAGAR <i>Candida</i> (ISOLAMENTO DE <i>Candida</i>)	48
4.2.1	Análise genotípica das espécies <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i> a partir das colônias verdes crescidas durante o teste CHROMagar <i>Candida</i>	51
4.3	AVALIAÇÃO SANGUÍNEA	53

4.3.1	Presença da proteína Hwp1	53
4.3.2	Tipagem sanguínea e nível glicêmico	54
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO 1	81
	ANEXO 2	85
	ANEXO 3	89

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Doenças infecciosas causadas por fungos representam um problema crítico para a saúde pública. Nos últimos anos, nota-se uma incidência crescente de infecções micóticas em virtude do aumento de indivíduos com comprometimento do sistema imunológico.

O fungo *Candida* pode ser encontrado em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003) como um organismo comensal, não causando danos aparentes nem induzindo inflamação nos tecidos adjacentes (AKPAN; MORGAN, 2002; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005). Contudo, sob certas condições predisponentes, o fungo pode multiplicar-se, tornando-se patogênico, e penetrar nos tecidos do hospedeiro causando inflamação e destruição tecidual (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006).

Candida pertence ao Reino *Fungi*, Filo *Deuteromycotina* ou *Fungi imperfecti* (SINDRIM; ROCHA, 2004), Classe Blastomices, Ordem Criptococales, Família Criptococaceae, Gênero *Candida*. O gênero *Candida* foi consagrado como *Nomen Conservandum* no 9º Congresso Internacional de Botânica, realizado em Montreal (Canadá) em 1959 (LACAZ et al., 1984).

A distribuição das leveduras do gênero *Candida* é muito ampla, tanto no meio ambiente como na microbiota normal do homem (ZAITZ; CAMPBELL; MARQUES; RUIZ; SOUZA, 1998; AKPAN; MORGAN, 2002). A detecção inicial de leveduras de *Candida* no homem coube a Hipócrates (460 a 337 a.C.) e Galeno (200 a 130 a.C.) que descreveram a presença de placas esbranquiçadas na cavidade bucal de recém-nascidos e pacientes debilitados (RIBEIRO et al., 2004).

Candida pode estar presente em solo e água, quando os mesmos são contaminados por dejetos humanos ou animais; frequentemente isolam-se várias espécies de *Candida* da microbiota normal da boca, dobras da pele, orofaringe, intestino, vagina (LACAZ et al., 1980; ZAITZ; CAMPBELL; MARQUES; RUIZ; SOUZA, 1998; CANNON; CHAFFIN, 2001; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; AKPAN; MORGAN, 2002), escarro (LACAZ et al., 1980; ZAITZ; CAMPBELL; MARQUES; RUIZ; SOUZA, 1998) e trato respiratório (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). *Candida albicans* (*C. albicans*) é a espécie mais frequentemente

isolada destes locais (AKPAN; MORGAN, 2002) e é considerada a principal espécie patogênica do gênero *Candida*, sendo descrita pela primeira vez por Langenbeck, em 1839, em afta de paciente com febre tifóide. Na década de 30, doenças do homem associadas a espécies de *Candida* eram bem mais raras, e a candidose ou candidose profunda era praticamente desconhecida. Atualmente, a candidose superficial está entre as infecções mais comuns da pele e mucosas, e tanto a candidose superficial como a profunda são problemas de saúde pública (ZAITZ; CAMPBELL; MARQUES; RUIZ; SOUZA, 1998).

Mais de duzentas espécies de *Candida* já foram descritas, mas somente 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). As espécies mais comuns são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guillierimondii*, *C. krusei* (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; AKPAN; MORGAN, 2002), *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (AKPAN; MORGAN, 2002). Com o advento da AIDS, uma nova espécie do gênero *Candida* tem sido descrita como *C. dubliniensis*, com aspectos similares a *C. albicans* (SULLIVAN; COLEMAN, 1998; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; RIBEIRO et al., 2004; CHAVASCO et al., 2006).

C. albicans foi isolada de primatas, mamíferos marsupiais e pássaros. Ela sobrevive melhor em superfícies úmidas, mas se o grau de contaminação é suficientemente alto, células de *C. albicans* permanecem viáveis em superfícies secas por pelo menos 24 horas (CANNON; CHAFFIN, 2001). *C. albicans* é um fungo dimórfico, que comensalmente coloniza superfícies epiteliais na forma de leveduras. Em casos de infecção, contudo, *C. albicans* é observada como hifas alongadas ou pseudohifas nas mucosas ou sangue (FIDEL JR, 2002).

Em pessoas com colonização bucal por *C. albicans*, o fungo pode ser encontrado em uma concentração média de 300 a 500 células por mililitro de saliva, o que pode permitir a transferência de fungos durante o beijo ou outro contato direto com a saliva. Assim sendo, existem muitas oportunidades para a entrada de espécies de *Candida* na boca: inoculação manual, transferência de saliva ou comida e bebidas contaminadas (CANNON; CHAFFIN, 2001). A princípio, a constatação de cepas de *Candida* em qualquer microbiota do homem não induz nenhum transtorno que possa favorecer patologia (RIBEIRO et al., 2004).

A candidose expressa a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistêmica fatal (ZAITZ; CAMPBELL; MARQUES; RUIZ; SOUZA, 1998).

Os extremos do ciclo de vida humana, infância e velhice, constituem as fases de existência do homem onde os relatos de ocorrência de candidose são mais propícios (AKPAN; MORGAN, 2002; RIBEIRO et al., 2004; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005), em decorrência do aprimoramento ou deficiência fisiológica do sistema imune (RIBEIRO et al., 2004).

As manifestações de virulência dos fungos oportunistas como *Candida* estão intimamente relacionadas com a presença de fatores conhecidos como predisponentes intrínsecos (idade avançada, gravidez, prematuridade, neoplasias, hemopatias, endocrinopatias, avitaminoses, tuberculose e AIDS) e extrínsecos (uso de antibacterianos, corticóides, agentes antineoplásicos, terapia intravenosa prolongada -ELLIS; SPIVACK, 1967-, intervenções cirúrgicas, agentes físicos e químicos - ZAITZ; CAMPBELL; MARQUES; RUIZ; SOUZA, 1998), bem como os fatores de virulência do fungo.

1.1 Candidemia e Candidose Sistêmica

O termo candidose invasiva compreende uma grande variedade de desordens graves que incluem a candidemia, candidose disseminada, endocardite, meningite, endoftalmite e envolvimento de outros órgãos profundos; ficam excluídas as doenças superficiais, como a candidose orofaríngea e esofágica (PAPPAS, 2006). A infecção da corrente sanguínea (candidemia) é a apresentação clínica mais comum da candidose invasiva e representa de 10 a 20% de todas as candidoses (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993).

A candidose geralmente compromete a cavidade oral, o trato gastrointestinal, região perianal, unhas, endocárdio, pulmões, trato urinário, pele e vagina. As infecções podem permanecer localizadas ou podem disseminar-se. Das lesões localizadas, os microrganismos podem ser disseminados por via hemática ou diretamente. A partir da infecção inicial, em geral localizada no revestimento cutâneo

da pele e na mucosa oral de um hospedeiro imunocomprometido, os fungos podem invadir vasos sanguíneos e disseminar-se por quase todas as áreas do organismo.

Estudos utilizando genotipagem de cepas de *Candida* confirmaram que a colonização endógena, ou seja, pela própria microflora do paciente, é responsável pelas candidoses mais severas. Contudo, ambas as colonizações, endógena e exógena, podem coexistir nas infecções sistêmicas. A colonização de múltiplos locais é um fator de risco independente para a infecção invasiva (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003), assim como, exposições contínuas a fatores de risco são responsáveis pelo favorecimento da invasão com possível disseminação hematógena secundária (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006). O conhecimento da relação entre a candidose e a AIDS é fundamental. Sabe-se que a suscetibilidade dos pacientes acometidos pelo HIV às infecções oportunistas depende do grau de imunossupressão do indivíduo. A combinação de drogas, incluindo agentes microbianos, corticóides e anti-inflamatórios utilizados no tratamento, pode desencadear a proliferação de várias espécies de levedura, inclusive *Candida*. Nos pacientes com HIV, as lesões por *Candida* apresentam uma maior gravidade e resistência à terapia convencional (PAPAS et al., 2006). As lesões bucais são muito mais extensas e podem disseminar-se para o esôfago.

O termo candidose invasiva é algumas vezes utilizado ao invés de candidose hematógena e pode referir-se ao fato de que o desenvolvimento da infecção sanguínea permite a colonização do hospedeiro (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Os fatores de risco reconhecidos para infecção invasiva por *Candida* são: permanência maior que 4 dias em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), antibioticoterapia de amplo espectro, cirurgia abdominal, cateterização venosa central, nutrição parenteral total, imunodepressão, ventilação mecânica por mais que 48 horas, neutropenia e quimioterapia citotóxica (ANVISA, 2004; PAPPAS, 2006). O quadro clínico é de febre persistente, a qual no paciente imunodeprimido é indicativa de hemocultura para fungos (PAPPAS, 2006). Na presença de rash cutâneo papulopustuloso, a biópsia e o cultivo da lesão poderão definir o diagnóstico. A taxa de mortalidade da candidose sistêmica é de 71 a 79% (AKPAN; MORGAN, 2002).

Durante a candidose sanguínea, um alvo das células hospedeiras são as células endoteliais. Uma vez que o fungo entra na circulação sanguínea, ele pode aderir e penetrar nas células endoteliais para sair dos vasos sanguíneos e invadir os

tecidos. Dessa forma, as células endoteliais são as primeiras células hospedeiras que o fungo encontra durante a disseminação (FILLER et al., 1995; IBRAHIM et al., 1998; PHAN; BELANGER; FILLER, 2000; CHIANG et al., 2007). A importância da interação *C. albicans*-célula endotelial é suportada por estudos que relatam que cepas de *C. albicans* com reduzida capacidade para invadir e destruir células endoteliais tem virulência atenuada *in vitro* (CHIANG et al., 2007).

Candidemia representa uma importante infecção nosocomial (FIDEL JR, 2002; KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006) e pode ser definida como a ocorrência de duas ou mais culturas positivas para a mesma espécie de *Candida*, provenientes de amostras diferentes, coletadas após 72 horas da admissão do paciente no hospital. A infecção invasiva por *Candida* pode ser também considerada quando há isolamento de *Candida* a partir de sítio, normalmente estéril, associado a um outro ou mais sinais de infecção (ANVISA 2004). A sensibilidade de hemocultura para *Candida* é baixa; aproximadamente, 50% dos pacientes com infecção invasiva por *Candida* podem ter culturas negativas (REBOLI et al., 1993; EINSELE et al., 1997; MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005; PAPAS et al., 2006; PITARCH et al., 2006; ALAM; MUSTAFA; KHAN, 2007; DOJNOV et al., 2007). Além disso, a ocorrência de infecção bacteriana concomitante pode diminuir a chance do isolamento de *Candida* (ANVISA, 2004).

Muitos autores sugerem que a colonização de mais de dois lugares do corpo pode ser suficiente para predizer candidemia e requer o início da terapia antifúngica (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). Porém, com o reduzido número de drogas para o tratamento destas enfermidades, a realização de testes de sensibilidade se faz necessária, o que torna a escolha da terapêutica, baseada na droga, cada vez mais adequada e eficiente.

Apesar de parte dos episódios de candidemia apresentarem característica transitória e autolimitada, particularmente em hospedeiros não neutropênicos, não há dados clínicos ou laboratoriais que permitam ao clínico diferenciar episódios transitórios de quadros de candidose hematogênica com invasão tecidual em vísceras. Nestes casos, após semanas ou meses de episódio de candidemia, alguns pacientes retornam com quadros de retinite, meningite ou osteomielite por *Candida spp.*

Candidemia é associada com alta morbidade, alta mortalidade e significativo uso de recursos financeiros (BECK-SAGUÉ; JARVIS, 1993; PAPPAS, 2006). A

prevenção da candidemia poderá melhorar a saúde do paciente e resultar em uma significativa melhora dos doentes críticos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003).

1.2 Estomatite por dentadura

A candidose orofaríngea é uma infecção local mucosa e oportunista, comum especialmente em indivíduos idosos e/ou usuários de prótese total ou parcial removível, e sua incidência tem aumentado nos últimos anos (CUMMING et al., 1990; IACOPINO; WATHEN, 1992).

A estomatite por dentadura (ED), considerada uma das formas de candidose orofaríngea, é definida como um processo inflamatório na mucosa subjacente a uma prótese total ou parcial removível (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; RAMAGE et al., 2004; SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; COCO et al., 2008; BARAN; NALÇACI, 2008), geralmente associada a presença do fungo *C. albicans* (ARENDORF; WALKER, 1987; IACOPINO; WATHEN, 1992; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; PIRES et al., 2002; BARBEAU et al., 2003; RAMAGE et al., 2004; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006; EMAMI et al., 2007; FIGUEIRAL et al., 2007; COCO et al., 2008). O fungo *C. albicans* é encontrado na cavidade bucal de 25 a 50% dos indivíduos saudáveis, incluindo adultos e crianças (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; PIRES et al., 2002; EMAMI et al., 2007) e foi associado ao desenvolvimento da ED pela primeira vez, em 1936, por Cahn (ARENDORF; WALKER, 1987; RAMAGE et al., 2004).

Clinicamente, a ED apresenta-se como uma doença recorrente, que afeta o palato de 11 a 67% dos usuários de prótese removível superior. É mais comum em mulheres e indivíduos imunodeficientes, e sua prevalência aumenta com a idade (ARENDORF; WALKER, 1987; IACOPINO; WATHEN, 1992; NAGAI; TAKESHITA; SAKU, 1992; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; PIRES et al., 2002; RAMAGE et al., 2004; FIGUEIRAL et al., 2007).

A ED frequentemente é assintomática e afeta, na maioria dos casos, o palato duro. Pode apresentar-se associada com leucoplasia, glossite romboidal mediana, queilite angular, candidose pseudomembranosa aguda e candidose hiperplásica

crônica (ARENDORF; WALKER, 1987; NAGAI; TAKESHITA; SAKU, 1992; WEBB et al., 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007). Quando presentes, os sinais e sintomas são vermelhidão na mucosa, inchaço, ardor, sensação dolorosa, halitose, sabor desagradável e secura na boca (ARENDORF; WALKER, 1987; WEBB et al., 1998; RAMAGE et al., 2004; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006).

A ED é uma doença bucal debilitante que pode reduzir drasticamente a qualidade de vida de alguns indivíduos. Muitos usuários de próteses removíveis desconhecem que têm candidose bucal e isto pode levar a um risco potencial de complicações a longo período, principalmente se seu estado imunológico se alterar (COCO et al., 2008).

A classificação clínica da ED é baseada na aparência clínica da mucosa inflamada sob a prótese, como por exemplo, a de Newton (1962), que divide a doença em três tipos: I, II e III. O tipo I refere-se ao estágio inicial de pontos hiperêmicos localizados; o tipo II é o mais comum, apresentando eritema difuso e edema nas áreas da mucosa palatal; e o tipo III caracteriza-se por uma reação hiperplásica resultando em uma lesão nodular no centro do palato, às vezes associada a áreas atróficas, sendo denominada hiperplasia papilar (ARENDORF; WALKER, 1987; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006; EMAMI et al., 2007).

Embora estudos correntes indiquem que a ED esteja geralmente associada com a presença do fungo *C. albicans* na saliva, na mucosa bucal e/ou na superfície interna da prótese removível (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; CUMMING et al., 1990; IACOPINO; WATHEN, 1992; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; PIRES et al., 2002; BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; RAMAGE et al., 2004; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006; EMAMI et al., 2007; FIGUEIRAL et al., 2007; CAMPOS et al., 2008), outros fatores também podem predispor seu desenvolvimento como os relacionados ao uso da prótese, à microbiota e às condições sistêmicas do hospedeiro. Os fatores relacionados à prótese incluem trauma geralmente decorrente de próteses antigas, limpeza inadequada, uso noturno, presença de asperezas e microporos na superfície acrílica da mesma, além de alterações no pH do biofilme microbiano aderido à prótese. A ausência de higiene bucal e da prótese promove um ambiente favorável à

proliferação de microrganismos, principalmente entre a mucosa de suporte e a própria superfície da prótese (FIGUEIRAL et al., 2007). Outros microrganismos como, por exemplo, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondi* também podem colaborar para a patogênese da doença, entretanto o fungo *C. albicans* é o mais frequentemente associado (ARENDORF; WALKER, 1987; IACOPINO; WATHEN, 1992; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; PIRES et al., 2002; BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; RAMAGE et al., 2004; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006; EMAMI et al., 2007; FIGUEIRAL et al., 2007; FREITAS et al., 2008). A emergência de outras espécies de *Candida* tem sido associada à sua resistência aos antifúngicos usados comumente (COCO et al., 2008).

Os fatores de risco para a instalação da ED relacionados a condições sistêmicas do hospedeiro incluem xerostomia, hipersensibilidade ao material protético, diabetes (DOROCKA-BOBKOWSKA; BUDTZ-JÖRGENSEN; WLOCH, 1996) e outras desordens endócrinas (hipoadrenalismo, hipotireoidismo e hipoparatiroidismo), alterações imunológicas, uso prolongado de esteróides, quimioterapia e radioterapia (GONÇALVES; WRIGHTSON; HENRY, 2008) ou uso de drogas psicotrópicas e hipossalivatórias, assim como deficiência nutricional de vitamina B12, ácido fólico e ferro (ARENDORF; WALKER, 1987; IACOPINO; WATHEN, 1992; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; PIRES et al., 2002; BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; RAMAGE et al., 2004; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006; EMAMI et al., 2007; FIGUEIRAL et al., 2007; FREITAS et al., 2008).

A hiperglicemia decorrente do diabetes pode ser um fator predisponente para ED, pois pode proporcionar suporte nutricional ao fungo *Candida*, além de causar uma redução da efetividade da resposta imune, desordens de secreção salivar e diminuição local da resistência epitelial (VITKOV et al., 1999; GUGGENHEIMER et al., 2000).

A xerostomia afeta 9 a 57% dos idosos. A saliva lubrifica a cavidade bucal e protege contra infecções fúngicas e bacterianas. Além da idade, certas doenças e medicamentos aumentam o risco de xerostomia, como os inibidores da enzima conversora da angiotensina, os bloqueadores alfa e beta, os analgésicos, os anticolinérgicos, os antidepressivos, os antihistamínicos, os antipsicóticos, os

ansiolíticos, os bloqueadores do canal de cálcio, os diuréticos, os relaxantes musculares e os sedativos. Os pacientes com xerostomia devem ser estimulados a beber água e evitar bebidas alcoólicas, comidas e bebidas que podem causar xerostomia, cafeinados e açúcar (GONÇALVES; WRIGHTSON; HENRY, 2008).

A mucosa bucal também é protegida pela imunoglobulina A (IgA) salivar; este anticorpo pode ser uma defesa contra candidose inibindo a aderência fúngica às células epiteliais. A presença de xerostomia ou disfunção salivar compromete e pode reduzir este efeito, contribuindo assim para a invasão epitelial. A diminuição da lubrificação salivar durante a mastigação também aumenta o trauma mecânico que pode ocasionar a perda de integridade da barreira epitelial e, assim, favorecer a invasão por *C. albicans* (IACOPINO; WATHEN, 1992). Desordens das glândulas salivares como a Síndrome de Sjogren também promovem marcantes alterações na microflora bucal e xerostomia (OKSALA, 1990).

A terapia antibiótica de amplo espectro e a corticoterapia podem levar a alterações da microbiota bucal e, assim, predispor o aparecimento de infecções bucais fúngicas (OKSALA, 1990).

Radioterapia na região de cabeça e pescoço pode predispor a infecções bucais fúngicas; estudos realizados em animais observaram que a irradiação das glândulas salivares levou ao aparecimento de distúrbios de excreção de imunoglobulinas na saliva, o que pode diminuir a eficiência da defesa imunológica humoral contra infecções na cavidade bucal (OKSALA, 1990).

Baixos níveis sorológicos de vitamina B12 contribuem para a colonização e podem facilitar a invasão epitelial por hifas de *C. albicans* em paciente suscetíveis. Tem sido relatado que a vitamina B12 concede maior resistência à infecção por *Candida*, e a deficiência de vitamina B12 e ácido fólico podem subsequentemente levar a atrofia da mucosa (DAR-ODEH; SHEHABI, 2003). Já a hipovitaminose A pode representar um papel na candidose mucocutânea através de uma possível alteração do processo de queratinização. Existem evidências de que a vitamina A é necessária para a manutenção da integridade dos tecidos epiteliais, bem como influencia a resposta imune, sendo requerida para o funcionamento do sistema imune, e tem efeito anti-inflamatório (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005).

Doenças malignas e fármacos quimioterápicos causam defeitos nos mecanismos de defesa do hospedeiro, uma vez que acarretam desordens numéricas e funcionais dos neutrófilos polimorfonucleares (OKSALA, 1990).

1.3 Adesão, penetração e virulência de *C. albicans*

Uma vez na boca, *C. albicans* encontra diversos locais de adesão como as células epiteliais da mucosa, da língua, ou as superfícies dos dentes, das próteses fixas e/ou removíveis e de outros microrganismos que já colonizam estas superfícies, promovendo ancoragem para hifas e permitindo seu crescimento através do tecido epitelial (VITKOV et al., 2002).

A adesão do fungo *C. albicans* à superfície de células epiteliais mucosas ou superfícies inertes é um evento primário necessário para a sua colonização e desenvolvimento da patogênese (BURFORD-MASON; WEBER; WILLOUGHBY, 1988; NIKAWA et al., 1991). Receptores microbianos presentes nas células de determinados grupos sanguíneos representam diferenças fenotípicas que podem aumentar à suscetibilidade para a colonização fúngica (BURFORD-MASON; WEBER; WILLOUGHBY, 1988;). Os antígenos dos grupos sanguíneos não estão confinados aos eritrócitos apenas, estão presentes em muitas células, incluindo células epiteliais mucosas; além disso, estão solúveis na saliva e em outros fluidos corpóreos.

Durante a candidose orofaríngea, o principal alvo é a célula epitelial do hospedeiro. Para iniciar a doença, *C. albicans* deve aderir a células epiteliais da mucosa bucal; subseqüentemente, o fungo invade e destrói estas células. De fato, em lesões de candidose orofaríngea, a invasão do epitélio bucal superficial é uma característica marcante, acompanhada pela destruição e perda destas células (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000).

A adesão envolve interações entre as células fúngicas e as superfícies do hospedeiro (CANNON; CHAFFIN, 2001), sendo promovida por certos componentes da parede celular do fungo como manose, receptores C3d, manoproteínas, sacarinas e adesinas. O grau de hidrofobicidade e a habilidade de se ligar à fibronectina do hospedeiro também têm sido relatados como importantes mecanismos utilizados nos estágios iniciais da infecção (AKPAN; MORGAN, 2002).

A capacidade de transformação de uma forma em outra em diversos nichos, e de responder a muitos desafios do hospedeiro faz de *C. albicans* um patógeno versátil e bem adaptado. O dimorfismo representa a habilidade do fungo crescer em diferentes formas morfológicas: leveduras e filamentosas (hifas ou pseudohifas). As

células epiteliais não podem ser penetradas por leveduras, apenas pelas hifas (HOWLETT; SQUIER, 1980; VITKOV et al., 2002). Assim, as hifas são mais virulentas e invasivas devido a sua capacidade de aderir ao tecido epitelial e penetrar nas células do hospedeiro. A flexibilidade fenotípica, provavelmente, é resultado de condições locais sob a prótese, como a baixa pressão de oxigênio, o baixo pH, a composição do biofilme da prótese, e o acúmulo de células epiteliais descamativas (EMAMI et al., 2007). Isto confere a *C. albicans* a capacidade de expressar vários fatores de virulência ou alterar seu perfil antigênico, capacitando à colonização e à adaptação fúngicas em diferentes micronichos, durante a infecção (KUMAMOTO; VINCES, 2005a; KUMAMOTO; VINCES, 2005b; EMAMI et al., 2007; JAMS et al., 2007).

Durante a penetração da epiderme humana pelas hifas de *C. albicans*, ocorre uma deformação dos queratinócitos do hospedeiro (VITKOV et al., 2002), sugerindo que a hifa produz uma força mecânica que auxilia a penetração da epiderme. Para atravessar a barreira endotelial, *C. albicans* induz sua endocitose via célula endotelial; as hifas também são importantes para escapar da internalização, destruindo a célula do hospedeiro (KUMAMOTO; VINCES, 2005a).

A forma filamentosa também é considerada um importante fator de virulência, pois os genes que controlam a morfologia das hifas são corregulados por genes que codificam outros fatores de virulência como as proteases e adesinas (KUMAMOTO; VINCES, 2005a; KUMAMOTO; VINCES, 2005b; PHAN; BELANGER; FILLER, 2005).

A proteína da parede da hifa 1 (Hwp1) de *C. albicans*, com similaridades a pequenas proteínas ricas em prolina de mamíferos, é um substrato para transglutaminases de mamíferos, com as quais liga-se covalentemente e funciona como uma importante adesina para a patogênese da candidose (STAAB; SUNDSTROM, 1998; STAAB et al., 1999; ROMEO; RACCO; CRISEO, 2006; PONNIAH et al., 2007). Estudos *in vitro* demonstraram a presença de grande quantidade de Hwp1 na parede de hifas, e quantidades pequenas ou imperceptíveis nas leveduras (NAGLIK et al., 2006). Cepas de *C. albicans* sem Hwp1 são incapazes de formar adesões estáveis com células epiteliais bucais e tem reduzida capacidade de causar candidose sistêmica em ratos (STAAB et al., 1999). O complexo hifa e células epiteliais bucais em espécimes de candidose pseudombranosa bucal *in vivo* não foi dissociado pelo tratamento com calor ou detergentes (superior a 30 minutos),

indicando que adesões estáveis predominam na candidose bucal (STAAB et al., 1999).

Um outro fator que contribui para o processo de virulência dos fungos patogênicos é a produção de enzimas hidrolíticas (OGRYDZIAK, 1993; IBRAHIM et al., 1998). As enzimas hidrolíticas mais importantes produzidas por *C. albicans* são aspartil proteinase (SAP), enzimas fosfolipase B e lípases. Dessas, a proteína Sap, codificada pela família de 10 genes SAP, tem sido amplamente estudada como chave para a virulência de *C. albicans* (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

A secreção de SAPs por *C. albicans* contribui para a colonização e a infecção de diferentes nichos do hospedeiro através da degradação de barreiras teciduais, destruição de moléculas de defesa e digestão de proteínas para obtenção de nutrientes (DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; LERMANN; MORSCHHÄUSER, 2008). As SAPs também contribuem para a adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003).

As SAP 1 e SAP 10 são responsáveis por toda a atividade proteolítica extracelular de *C. albicans*; elas distinguem-se por diferentes valores de pH ótimo, o que mostra o sucesso deste fungo como um patógeno oportunista, sobrevivendo e causando infecção em diferentes tecidos como superfícies mucosas, pele e órgãos internos.

1.4 Mecanismos de defesa do hospedeiro na candidose

Os mecanismos de defesa do hospedeiro que governam a proteção contra infecção por *C. albicans* são distintos para diferentes tecidos e mucosas, bem como para a circulação periférica. Entretanto, pouco se sabe a respeito da resposta imunológica sistêmica de pacientes que se apresentam com lesões bucais localizadas (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLU, 2008). Oliveira et al. demonstraram que a candidose bucal é capaz de induzir uma resposta imunológica sistêmica caracterizada pela produção de TNF- α e IFN- γ . Estas citocinas são importantes para a defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, mas também estão implicadas na patogênese da candidose (OLIVEIRA et al., 2007).

A imunidade inata por leucócitos polimorfonucleares (PMN) e macrófagos determina a proteção contra a candidemia, enquanto a imunidade por células T e citocinas protege a mucosa desta infecção (IACOPINO; WATHEN, 1992; STEELE et al., 2000; FIDEL JR, 2002).

A candidose orofaríngea é extremamente comum em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LEIGH et al., 2002; VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008), especialmente, quando a quantidade de células CD4⁺ é menor que 200 células por microlitro de sangue, e é associada com um perfil de citocinas salivares Th2 (FIDEL JR, 2002; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005). Contudo, Leigh et al. relataram que indivíduos HIV negativos, usuários de prótese com ou sem ED, demonstraram um perfil misto de citocinas Th1 e Th2 na saliva, sugerindo que a expressão local destas citocinas não é associada com a presença de ED em indivíduos imunocompetentes.

Em contraste, a candidose vulvovaginal e a candidemia são mais raras durante a AIDS, o que evidência a diversidade e compartimentalização da resposta do hospedeiro a *Candida* (FIDEL JR, 2002; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008).

A resposta imunológica localizada é fundamental no controle da ED, prevenindo a disseminação de *C. albicans*. A ativação dos mecanismos protetores da imunidade inata e das células efectoras não imunes depende de um adequado reconhecimento do patógeno. O rápido reconhecimento dos patógenos é mediado pela expressão de receptores de reconhecimento padrão (RRPs) nas células do hospedeiro que reconhecem padrões moleculares associados ao patógeno (PMAPs) (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008).

A parede celular de *C. albicans* contém uma variedade de padrões moleculares associados aos PMAPs como glucano, manana, manoproteínas, glicoproteínas e outras proteínas, sendo que manana e β (1-3) glucano são altamente imunogênicas (SENDIDI et al., 2004; KONDORI; EDEBO; MATTSBY-BALTZER, 2004; VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008). Esta multiplicidade de antígenos da parede celular do fungo pode ativar diferentes componentes celulares da resposta imune (REISS; STONE; HASENCLEEVER, 1974). Por isso que o reconhecimento de *C. albicans* é um processo complexo que envolve a participação de múltiplos RRP's (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008).

A ativação de diferentes RRP's em resposta a *C. albicans* promove um amplo número de possibilidades para respostas inflamatórias efetivas. Contudo, a contribuição relativa dos PMAP's específicos de *C. albicans* e seus respectivos receptores na ativação de células efectoras, geração de citocinas e modulação da resposta imune, permanecem desconhecidos na candidose bucal (VILLAR; DONGARI-BAGTZOGLOU, 2008). Ainda, a liberação, a distribuição sistêmica e a degradação dos antígenos e dos ácidos nucleicos relacionados à *C. albicans*, nos casos de candidose local, não são totalmente esclarecidos (SENDID et al., 2004).

Nos casos de candidose sistêmica, o fungo tem a capacidade de circular no sangue (KONDORI; EDEBO; MATTSBY-BALTZER, 2004). Por outro lado, a mera presença de candidemia não implica necessariamente em doença disseminada ou invasiva, porque um número significativo de casos de fungemia pode representar apenas uma contaminação transitória do sangue, originária de focos de infecção tecidual (ELLIS; SPIVACK, 1967; REBOLI, 1993), o que talvez possa ocorrer nos casos de ED, visto que Oliveira et al. 2007 demonstraram que pacientes portadores de candidose bucal localizada apresentam uma resposta imune sistêmica com produção de citocinas inflamatórias por células sanguíneas. Entretanto, tal contaminação sorológica, nos casos de doença fúngica localizada, é hipotética e permanece desconhecida.

A detecção de proteínas fúngicas no sangue tem sido realizada em culturas de sangue por meio de métodos envolvendo ELISA e Western Blotting, em pacientes com candidemia. Entretanto, técnicas utilizando culturas de sangue apresentam baixa sensibilidade nos primeiros estágios da infecção (REBOLI et al., 1993; EINSELE et al., 1997; MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005; PITARCH et al., 2006; ALAM; MUSTAFA; KHAN, 2007; DOJNOV et al., 2007). Assim sendo, outros testes têm sido desenvolvidos, detectando proteínas, metabólitos, DNA e polissacarídeos da parede celular, como manana e β (1-3) glucano do fungo *C. albicans* (EINSELE et al., 1997; SENDID et al., 1999; KONDORI; EDEBO; MATTSBY-BALTZER, 2004). Uma alternativa estratégica para o diagnóstico sorológico de candidose sistêmica é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que recentemente tem encontrado resultados promissores. Este método é baseado na amplificação de porções específicas de sequências de DNA de espécies de *Candida* (MORACE et al., 1997; SENDID et al., 2004). Uma outra forma de diagnóstico é a pesquisa de antígenos no

soro como, por exemplo, a manana, já utilizada para diagnóstico nos casos de candidose sistêmica (SENDID et al., 2004).

Existem poucos estudos a respeito da presença de constituintes fúngicos na circulação sanguínea de indivíduos com ED (AHMAD et al., 2002), uma forma localizada de candidose. Assim, torna-se necessário investigar o fungo *C. albicans* está presente no soro de indivíduos com candidose localizada, o que poderia caracterizar o poder de invasão sistêmica do fungo nesta condição local, bem como um prévio reconhecimento de antígenos fúngicos por células presentes na circulação sanguínea do hospedeiro, o que poderia explicar aspectos específicos da resposta imune localizada e sistêmica.

A elucidação da colonização e da distribuição de *C. albicans* nas lesões, nas superfícies internas das próteses totais superiores e pela circulação sanguínea do hospedeiro com ED é necessária para o desenvolvimento de estratégias imunologicamente baseadas de prevenção e de tratamento das infecções por *C. albicans*.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a presença do fungo *Candida albicans* no palato, na superfície interna das próteses totais superiores e no sangue de pacientes com estomatite por dentadura, em dois momentos distintos (com intervalo de 7 dias).

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos grupos de estudo

Os indivíduos foram avaliados e selecionados nas clínicas de graduação e pós-graduação da Disciplina de Prótese do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB – USP). A avaliação clínica dos indivíduos teve a supervisão direta do Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, do Departamento de Prótese (FOB – USP). Inicialmente, os pacientes e voluntários que participaram da pesquisa responderam a uma anamnese direcionada, na qual foram registrados dados sobre as condições gerais de saúde, bem como tempo de uso e uso durante a noite da(s) prótese(s), quando for usuário, e dados clínicos sobre a cavidade bucal e seus tecidos e, na presença de estomatite por dentadura, sua aparência clínica detalhada e sintomatologia (ANEXO 1).

Os pacientes e voluntários foram ainda informados detalhadamente sobre a pesquisa e seus objetivos, enfatizando que seria necessário realizar coleta de material biológico do palato, e das amostras de sangue, bem como seriam coletados dados sobre sua história médica e dados relacionados com a prótese total superior, quando for usuário. As coletas de material biológico e de dados foram realizadas após a concordância do paciente, que foi documentada com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2), conforme prevê a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Este projeto de pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa, em 27 de agosto de 2008 (ANEXO 3).

Para a realização deste projeto de pesquisa foram excluídos os indivíduos: 1 - portadores de doença infecciosa sistêmica, de qualquer natureza, aguda ou crônica, com ou sem manifestação bucal; 2 - sofrendo de neoplasias malignas, de natureza bucal ou não; 3 - sob qualquer tipo de tratamento quimioterápico ou radioterápico; 4 - sob tratamento prolongado com antibioticoterapia de amplo espectro ou antifúngico; 5 - portadores de doenças hematológicas de qualquer natureza; 6 - sob tratamento com antipsicóticos, metais pesados, anticonvulsivantes e cardiotônicos e 7 - portadores de doenças que envolvam o sistema imunológico, com ou sem manifestação bucal.

Os indivíduos selecionados foram divididos em três grupos, cada um deles totalizando 14 indivíduos:

- 1 - Usuários de prótese total superior, apresentando estomatite por dentadura;
- 2 - Usuários de prótese total superior, sem qualquer lesão bucal induzida por micro-organismo;
- 3 - Não usuários de próteses removíveis e sem qualquer lesão induzida por micro-organismo.

As lesões de estomatite por dentadura foram diagnosticadas clinicamente, de acordo com Newton (1962), e por meio de confirmação microbiológica (COCO et al., 2008; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; EMAMI et al., 2007; MOSCA et al., 2005). Os pacientes com ED, obrigatoriamente, não apresentaram outra lesão bucal induzida por micro-organismo ou de característica auto-imune.

3.2 Isolamento de *Candida* da lesão e da prótese total superior, e diagnóstico microbiológico

Nos pacientes com diagnóstico clínico de ED, objetivando, além do isolamento de *Candida*, a confirmação da presença local de *Candida albicans* (diagnóstico microbiológico), foi coletado material biológico da lesão utilizando-se cotonete de algodão estéril, que foi passado sobre o palato e depois transferido para tubos de ensaio contendo caldo Sabouraud (Difco, ref. 210950, lot 6094287, Becton Dickinson, Le Point de Claix, França) acrescido de 1% de cloranfenicol, 50 mg/L. Nos pacientes usuários de prótese total superior, com ou sem a doença, esta mesma coleta foi realizada na superfície interna das próteses. Esta mesma coleta foi realizada ainda na mucosa do palato dos pacientes dos grupos 2 e 3.

Os tubos contendo material eram mantidos a 24°C por 7 dias e, em seguida, foi realizada a semeadura por esgotamento em Ágar Sabouraud por 48 horas a 37°C. Posteriormente, estes isolados foram semeados em placas de CHROMagar (CHROMagar *Candida* ref 212961 lot 5346755, Becton Dickinson, Le Point de Claix, França), preparadas segundo instruções do fabricante, para a identificação das seguintes espécies de *Candida*: *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul) e *C. krusei* (cor-de-rosa). Considerando-se a semelhança fenotípica entre as espécies *C.*

albicans e *C. dubliniensis*, o que faz com que ambas apresentem cor verde no CHROMAgar Candida, as colônias verdes foram analisadas ainda por PCR, através de método modificado de Shin et al., para a confirmação microbiológica das espécies de *Candida albicans*.

3.2.1 Confirmação microbiológica das espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis* através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.2.1.1 Extração de DNA

Após a realização do teste microbiológico, as colônias verdes foram mantidas em PBS (tampão fosfato-salino), a temperatura ambiente até a extração do DNA. A extração foi realizada através de três lavagens dos fungos a 10.000 x *g*, durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 100µL de água estéril e 100µL de InstaGene (InstaGene Matrix, cat #732-6030, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA) e incubada a 56°C por 30 minutos. Após isto, as amostras foram fervidas, durante 10 minutos, e centrifugadas a 10.000 x *g*, durante 5 minutos a 4°C (SAKAI et al., 2007). Uma amostra de 170µL do sobrenadante foi armazenada para posterior amplificação através da PCR.

3.2.1.2 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os produtos da extração do DNA foram utilizados como moldes para a amplificação por PCR. Todas as reações foram realizadas num volume total de 25µL, em tubos de microcentrífuga de 0,5mL, com os seguintes reagentes: 5µL de DNA, 0,2mM de cada um dos desoxirribonucleotídeos, 0,4µM de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polymerase (Promega, WI, EUA) e 1,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂). O processo de ciclagem térmica consistiu em uma desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 5 minutos, anelamento a

50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 10 minutos, seguida por uma extensão final a 72°C por 10 minutos em um termociclador (Progene – Techne Cambridge Reino Unido).

A sequência dos primers utilizados para a PCR foi 5'-GTTTTTGCAACTTCTCTTTGTA-3' e 5'-ACAGTTGTATCATGTTTCAGT-3', cujo tamanho antecipado dos produtos de amplificação contém 1180 pares de base (pb) para *C. albicans* e 930pb para *C. dubliniensis*. Este par de primer codifica o DNA da proteína da parede da hifa 1 (Hwp1), requerida para a virulência na candidose sistêmica (ROMEO et al., 2006).

Para cada PCR, foi realizada uma reação para o par de primers utilizados, substituindo-se o molde de DNA extraído previamente pela mesma quantidade de água estéril, com a finalidade de se checar possíveis contaminações dos primers (controle negativo). O controle positivo foi obtido a partir de um isolamento de *C. albicans* ATCC 10231 submetido aos mesmos processos de extração de DNA e da PCR.

3.2.1.3 Detecção dos produtos amplificados

Os produtos da PCR foram analisados por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%. Para o preparo do gel, foram utilizados 50mL de solução tamponada composta por Trisma base, ácido bórico e EDTA (TBE 1x), 1,0g de agarose e brometo de etídio (0.5 µg/mL). Montou-se, então, o sistema de eletroforese horizontal (Loccus biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil), no qual se despejou a mistura e adicionaram-se os pentes. Após a geleificação (aproximadamente 30 minutos), os pentes foram retirados e o gel foi coberto com tampão para eletroforese (TBE 1x).

Em seguida, iniciou-se o carregamento com gel com uma alíquota de 10µL de cada amostra submetida à PCR. O peso molecular dos produtos da PCR foi determinado pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Ladder Invitrogen 100pb), colocado na extremidade esquerda do gel. A eletroforese foi realizada com a aplicação de corrente de 110 volts, durante 45 minutos.

Após a eletroforese, o gel de agarose foi colocado sobre um transluminador ultravioleta (T 2202, Sigma Chemical Company, ST. Louis, MO, USA), realizando-se a fotodocumentação para registro da presença de produtos amplificados de tamanhos antecipados.

3.3 Avaliação sanguínea

Inicialmente, foram obtidos 8mL de sangue venoso dos pacientes, com o auxílio de tubos a vácuo (4,0mL) ou seringa descartável estéril. A coleta foi realizada por profissional habilitado, em dois períodos diferentes, com intervalo de aproximadamente 7 dias, e o sangue dos doadores foi obtido das veias braquiais. O sangue coletado foi também avaliado quanto à sorotipagem e níveis glicêmicos em jejum e glicosilado, fatores estes relacionados com a predisposição a ED.

As amostras foram coletadas em tubos a vácuo contendo diferentes anticoagulantes. As amostras destinadas a avaliação por meio da PCR e aquelas destinadas a sorotipagem foram coletadas em tubos contendo K2 EDTA 7,2mg (BD Vacutainer- BD Franklin Lakes NJ, EUA), segundo orientações do fabricante (Fresenius HemoCare Brasil Ltda). Para as amostras destinadas à quantificação da hemoglobina glicosilada, utilizou-se o kit comercial HEMOGLOBINA A1c, seguindo orientações do fabricante (Labtest Diagnostica S.A.).

As amostras destinadas à determinação do nível glicêmico em jejum foram coletadas em tubos contendo NaF 6,0mg e Na₂EDTA 12,0mg (BD Vacutainer- BD Franklin Lakes NJ, EUA), segundo orientações do fabricante do kit comercial GLICOSE PAP Liquiform (Labtest Diagnostica S.A.).

3.3.1 Presença de *C. albicans*

Para a detecção de ácido desoxirribonucléico específico de *C. albicans*, foi utilizada a técnica da PCR para a amplificação do gene Hwp1 que codifica a proteína específica da parede da hifa de *C. albicans*.

3.3.1.1 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras de sangue foi realizada através de um método de ruptura mecânica descrito por Shin et al., adaptado às condições de trabalho e ao material disponível. Para isso, 300µL de sangue de cada paciente foi adicionado a 800µL da solução tampão TXTE (10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH 8.0], 1% Triton X-100), em um tubo de 1,5mL estéril. Em seguida, a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a lise, os fragmentos celulares foram separados dos fragmentos de *Candida* por centrifugação a 10.000 x g por 8 minutos. Na sequência, foram efetuadas três lavagens, por centrifugação, com 1mL de TXTE. O precipitado contendo fragmentos de *Candida* foi ressuspensão em 200µL de InstaGene (InstaGene Matrix, cat #732-6030, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA) e incubado a 56 °C por 30 minutos. Após isto, as amostras foram fervidas durante 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, durante 3 minutos a 4°C, e 170µL do sobrenadante foi armazenado a -80°C para amplificação por PCR.

Os produtos da extração de DNA serviram como moldes para a amplificação por PCR. A metodologia e material empregado foram os mesmos descritos previamente (itens 3.2.1.2 & 3.2.1.3), para a PCR de material genômico extraído de culturas microbiológicas e detecção dos produtos amplificados.

Foi realizada uma reação de PCR para o par de primers utilizados, substituindo-se o molde de DNA extraído previamente pela mesma quantidade de água estéril, com a finalidade de se checar possíveis contaminações dos primers (controle negativo). Para obtenção de um controle positivo, preparou-se um isolamento de *C. albicans* ATCC 10231 que foi adicionado a sangue coletado de indivíduo saudável, submetido aos mesmos processos de extração de DNA e da PCR.

3.3.2 Tipagem sanguínea

Uma vez que foi realizada a coleta de sangue dos indivíduos, este material foi ainda submetido à avaliação de tipagem sanguínea e nível glicêmico, mesmo não constituindo um dos objetivos do presente trabalho.

Os grupos sanguíneos ABO foram definidos pelo método de hemaglutinação direta utilizando-se os anticorpos monoclonais murinos (Soroclone[®]- Fresenius HemoCare Brasil Ltda) Anti-A, Anti-B, Anti-AB e Anti-D (anti-Rh). O Soro de Coombs BSA[®] (Anti-gama globulina humana - Fresenius HemoCare Brasil Ltda) foi utilizado para a confirmação da ausência de antígenos Rh, quando necessário, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3.3 Glicemia em jejum

As amostras de sangue foram obtidas após jejum de, no mínimo, 8 horas. Como as amostras eram tratadas com antiglicolítico fluoretado e, assim, a concentração de glicose permanecia estável por até 8 horas, os testes foram realizados neste intervalo de tempo após a coleta, utilizando-se o kit comercial GLICOSE PAP Liquiform (Labtest Diagnostica S.A.) e o aparelho LabMax-240 (Labtest Diagnostica S.A), alocado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC). Todos os testes foram realizados em duplicata e de acordo com as instruções do fabricante, sendo que o nível glicêmico foi expresso em mg/dl.

3.3.4 Glicemia Glicosilada

Uma pequena quantidade da amostra de sangue coletada com EDTA foi congelada a -80°C para posterior quantificação da hemoglobina glicosilada. Este procedimento foi realizado com o kit comercial HEMOGLOBINA A1c (Labtest

Diagnostica S.A.), utilizando-se o aparelho LabMax-240 – (Labtest Diagnostica S.A). As amostras de sangue e os controles foram preparados e analisados em duplicata de acordo com as instruções do fabricante, e os valores esperados para indivíduos não diabéticos foram de 4 a 6%.

Os testes de nível glicêmico foram realizados pelo biólogo e técnico em enfermagem Narcizo Almeida Vieira, do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais.

3.4 Análise estatística

Para análise dos dados, a presença de *Candida* no sangue dos indivíduos seria considerada positiva se o fungo estivesse presente em pelo menos uma das amostras submetidas à PCR em duplicata. Realizou-se, então, uma análise descritiva de todos os dados obtidos e os resultados foram avaliados pelo teste do qui-quadrado (χ^2), com o intuito de se verificar possíveis associações entre a presença do fungo no sangue e a patologia estudada. As demais variáveis nominais (gênero, espécies de *Candida* na lesão e na superfície interna das próteses totais superiores, tipo de sangue, diabetes, vício de fumar e classificação clínica da lesão) também foram analisadas através do teste do qui-quadrado (χ^2), para a determinação de diferenças entre os grupos. Se a probabilidade do teste anterior fosse menor que 0,05%, o teste de Tukey seria aplicado.

As variáveis numéricas dos diferentes grupos foram avaliadas através de Análise de Variância (Anova). A significância estatística foi estabelecida em 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos demográficos e clínicos da amostragem

Os resultados mostram que a maioria dos pacientes do grupo 1 pertenciam ao gênero feminino (85,71%), com idade média de 64,5 anos (45 a 83 anos). Não foi possível constatar alguma relação positiva entre o vício de fumar e a ED, pois apenas 21,43% dos pacientes (3 em 14) deste grupo relataram ser fumantes. A idade média da prótese total superior (PTS) foi de 20,2 anos, sendo que a maioria delas estava em uso há mais de 10 anos (9 em 14 pacientes). De acordo com a classificação de Newton (1962), a maioria dos pacientes deste grupo (50%) apresentou ED tipo II, seguida do tipo I (35,71%) e do tipo III (14,29%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características demográficas, tipo sanguíneo, níveis de glicemia, tempo de uso da prótese total superior e classificação clínica (Newton 1962) da lesão dos indivíduos usuários de prótese total superior com estomatite por dentadura (grupo 1)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Tipo de sangue	Glicemia em jejum	Hemoglobina glicada	Vício de fumar	Idade da prótese	Classificação clínica (Tipo)
1	F	83	A-	100	7,9	—	30 anos	II
2	F	78	A+	120	6,3	—	18 meses	I
3	F	74	A+	109	6,8	—	15 anos	I
4	F	61	O+	91	5,7	—	28 anos	I
5	F	68	O+	93	5,9	—	3 anos	I
6	F	64	O+	91	6,2	—	3 anos	II
7	F	57	O+	97	6,1	Sim	4 meses	II
8	F	76	O+	101	6,7	—	54 anos	II
9	M	64	A+	80	6,0	—	26 anos	III
10	F	54	AB-	109	6,6	Sim	30 anos	II
11	F	66	O+	116	6,1	—	4 anos	II
12	F	45	AB+	99	6,0	—	18 anos	I
13	F	52	O+	79	6,0	—	33 anos	II
14	M	61	O+	—	12,4	Sim	37 anos	III

No grupo 2 (pacientes usuários de PTS sem estomatite por dentadura), 64,29% dos pacientes pertenciam ao gênero feminino, com idade média de 61,7 anos (47 a 76 anos). Apenas 28,57% dos pacientes deste grupo relataram vício de fumar. A idade média da PTS foi de 19,62 anos; a maioria dos pacientes usavam suas próteses há mais de 10 anos (10 em 14 pacientes); sendo que destes, 7 faziam uso da mesma prótese há mais de 20 anos (Tabela 2).

Tabela 2 - Características demográficas, tipo sanguíneo, níveis de glicemia e tempo de uso da prótese total superior dos indivíduos usuários de prótese total superior sem estomatite por dentadura (grupo 2)

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Tipo de sangue	Glicemia em jejum	Hemoglobina glicada	Vício de fumar	Idade da prótese
2	M	52	A+	110	6,1	-	15 anos
2	F	51	AB+	76	5,8	-	35 anos
3	F	67	B+	96	5,7	-	30 anos
4	M	69	O+	93	6,1	-	26 anos
5	F	50	A+	104	6,7	Sim	30 anos
6	F	70	O+	108	5,6	-	9 meses
7	F	76	A+	92	6,3	-	28 anos
8	M	69	O+	84	5,8	-	19 anos
9	F	66	A+	89	5,6	-	18 anos
10	F	47	O+	106	6,3	-	25 anos
11	F	67	O+	95	5,9	-	3 anos
12	M	65	O+	79	5,6	Sim	35 anos
13	F	50	B+	100	6,7	Sim	5 anos
14	M	65	O+	96	6,1	Sim	5 anos

Com relação aos pacientes do grupo 3 (pacientes não usuários de PTS), 71,43% pertenciam ao gênero feminino, com idade média de 32,8 anos (19 a 56 anos). Apenas um indivíduo relatou ser fumante (Tabela 3).

Tabela 3 - Características demográficas, tipo sanguíneo e níveis de glicemia dos indivíduos não usuários de prótese total superior (grupo 3).

Paciente	Gênero	Idade (anos)	Tipo de sangue	Glicemia em jejum	Hemoglobina glicada	Vício de fumar
1	F	22	A+	85	5,4	-
2	F	24	O+	98	5,5	-
3	F	34	O+	97	5,2	-
4	F	47	A+	294	10,0	-
5	F	30	O+	94	5,4	-
6	M	26	O+	89	5,1	-
7	F	19	B+	97	5,5	-
8	M	25	A+	96	5,5	-
9	F	37	A+	90	6,0	-
10	M	51	O+	125	5,5	-
11	F	37	A+	103	5,6	Sim
12	F	56	O+	99	5,6	-
13	F	26	AB+	90	5,3	-
14	M	26	O+	98	5,7	-

4.2 Análise microbiológica das espécies de *Candida* através de CHROMagar *Candida* (isolamento de *Candida*)

C. albicans foi a espécie mais comumente isolada da superfície interna da PTS dos pacientes do grupo 1 (42,86%), sendo que duas destas culturas foram mistas com *C. krusei*. Neste grupo, 35,71% dos pacientes apresentaram *C. tropicalis* nas próteses, sendo que em um dos casos esta espécie estava associada a *C. krusei*. Isoladamente, *C. krusei* estava presente nas próteses de 21,43% dos pacientes do grupo 1. Na lesão, *C. albicans* também foi a espécie mais comumente identificada nos pacientes deste grupo (50%), sendo que três destas culturas estavam associadas a *C. krusei*. As espécies *tropicalis* e *krusei* também foram

isoladas da lesão de 35,71% e 14,29%, respectivamente, dos pacientes do grupo 1 (Quadro 1).

Quadro 1 - Número de indivíduos, dos diferentes grupos de estudo (usuários de prótese total superior com ED – grupo 1 - e sem ED – grupo 2 - e não usuários de prótese total superior – grupo 3), apresentando as diferentes espécies de *Candida*, de forma isolada ou mista, a partir de material biológico obtido da superfície interna da prótese total superior e da mucosa palatal, semeado em CHROMagar Candida

Espécie(s) de <i>Candida</i>	Prótese total superior		Palato		
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<i>albicans</i>	4	5	4	5	4
<i>tropicalis</i>	4	3	5	2	-
<i>krusei</i>	3	1	2	2	-
<i>albicans</i> + <i>krusei</i>	2	-	3	-	-
<i>tropicalis</i> + <i>krusei</i>	1	1	-	-	-
Ausência de crescimento	-	4	-	5	10
	Total=14	Total=14	Total=14	Total=14	Total=14

No grupo 2, a espécie mais frequentemente encontrada na superfície interna das PTS destes pacientes foi *C. albicans* (35,71%), seguida de *C. tropicalis* (28,57%), sendo que uma das culturas foi mista com *C. krusei*. Apenas um paciente deste grupo apresentou *C. krusei*, de forma isolada, em sua prótese. Neste grupo, alguns pacientes (28,57%) não apresentaram nenhuma espécie de *Candida* na superfície interna de suas próteses. Já no palato destes pacientes, a espécie mais frequentemente encontrada também foi *C. albicans* (35,71%), seguida de *C. tropicalis* (14,29%) e *C. krusei* (14,29%), não sendo observada associação de espécies. Em 35,71% dos pacientes, não se encontrou nenhuma espécie de *Candida* na mucosa palatal (Quadro 1); vale ressaltar que foi notada a presença de *C. krusei* na prótese de um destes pacientes.

No grupo 3, quatro pacientes (28,57%) apresentaram *C. albicans* no palato; os demais pacientes tiveram culturas negativas para fungos (Quadro 1). Todas as colônias verdes foram confirmadas, posteriormente, como *C. albicans* através da PCR.

Por meio do teste do qui-quadrado, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os diferentes grupos quanto a detecção da espécie *C. albicans*, tanto na PTS quanto no palato. A presença do fungo *Candida* foi mais

frequente ($p \leq 0,05$) no grupo 1 quando comparado com os outros grupos, indicando a forte relação entre este fungo e a ED.

A análise microbiológica das espécies de *Candida*, semeadas em CHROMagar Candida, da superfície interna das PTS e da mucosa palatal, dos indivíduos dos diferentes grupos, também está representada nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 - Número percentual de indivíduos, usuários de prótese total superior com (grupo 1) e sem estomatite por dentadura (grupo 2), apresentando as diferentes espécies de *Candida*, de forma isolada ou mista, ou ausência de crescimento fúngico, a partir de material biológico obtido da superfície interna das próteses totais superiores, semeado em CHROMagar Candida

Gráfico 2 - Número percentual de indivíduos, dos diferentes grupos de estudo (usuários de prótese total superior com – grupo 1 - e sem estomatite por dentadura – grupo 2 - e não usuários de prótese total superior - grupo 3), apresentando as diferentes espécies de *Candida*, de forma isolada ou mista, ou ausência de crescimento fúngico, a partir de material biológico obtido da mucosa palatal, semeado em CHROMagar Candida

4.2.1 Análise genotípica das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* a partir das colônias verdes cultivadas em CHROMagar Candida

Todas as culturas verdes dos pacientes foram identificadas como *C. albicans* através da PCR (inclusive as culturas de *C. albicans* associada à outra espécie). Apenas uma paciente do grupo 1 apresentou concomitantemente as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, tanto nas colônias fúngicas obtidas a partir da mucosa palatal quanto da superfície interna da PTS (Figura 1 e Quadros 2, 3 e 4).

Figura 1 - Gel de agarose corado com brometo de etídio dos produtos da PCR para detecção de *C. albicans* a partir das colônias verdes cultivadas em CHROMagar Candida, obtidas das superfícies internas das próteses totais superiores e da lesão em palato de 4 indivíduos com estomatite por dentadura. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100pb; colunas 2-8, presença de *Candida albicans* (1180pb); colunas 4 e 5, presença de *Candida dubliniensis* (930pb); coluna 9, controle negativo da reação (água); coluna 10, controle positivo da reação (isolamento de *Candida albicans* ATCC 10231)

Quadro 2 - Espécies de *Candida* (C.), isoladas ou mistas, crescidas em CHROMagar Candida, a partir de material biológico obtido da superfície interna da prótese total superior e da mucosa palatal dos indivíduos com estomatite por dentadura (grupo 1). O quadro apresenta também a análise genotípica das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* a partir das colônias verdes crescidas em CHROMagar Candida

Paciente	Espécie(s) de <i>Candida</i>		Avaliação genotípica (PCR)			
			Prótese total superior		Palato	
	Prótese total superior	Palato	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
1	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
2	<i>albicans</i> + <i>krusei</i>	<i>albicans</i> + <i>krusei</i>	+	+	+	+
3	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
4	<i>krusei</i>	<i>albicans</i> + <i>krusei</i>	-	-	+	-
5	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
6	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
7	<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	-	-	-	-
8	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
9	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
10	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
11	<i>tropicalis</i> + <i>krusei</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
12	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
13	<i>albicans</i> + <i>krusei</i>	<i>albicans</i> + <i>krusei</i>	+	-	+	-
14	<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	-	-	-	-

+ presença da espécie de fungo
- ausência da espécie de fungo

Quadro 3 - Espécies de *Candida* (C.), isoladas ou mistas, crescidas em CHROMagar Candida, a partir de material biológico obtido da superfície interna da prótese total superior e da mucosa palatal dos indivíduos usuários de próteses totais superiores, porém sem estomatite por dentadura (grupo 2). O quadro apresenta também a análise genotípica das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* a partir das colônias verdes crescidas em CHROMagar Candida

Paciente	Espécie(s) de <i>Candida</i>		Avaliação genotípica (PCR)			
			Prótese total superior		Palato	
	Prótese total superior	Palato	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
1	-	-	-	-	-	-
2	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
3	<i>krusei</i>	<i>krusei</i>	-	-	-	-
4	-	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
5	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
6	-	-	-	-	-	-
7	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
8	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
9	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>	-	-	-	-
10	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
11	<i>albicans</i>	<i>albicans</i>	+	-	+	-
12	<i>krusei</i>	<i>tropicalis</i> + <i>krusei</i>	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-

+ presença da espécie de fungo
- ausência da espécie de fungo

Quadro 4 - Espécies de *Candida* (C.), isoladas ou mistas, crescidas em CHROMagar Candida, a partir de material biológico obtido da mucosa palatal dos indivíduos não usuários de prótese total superior (grupo 3). O quadro apresenta também a análise genotípica das espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* a partir das colônias verdes crescidas em CHROMagar Candida

Paciente	Espécie(s) de <i>Candida</i>	Avaliação genotípica (PCR)	
		Palato	
	Palato	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	<i>albicans</i>	+	-
10	<i>albicans</i>	+	-
11	-	-	-
12	<i>albicans</i>	+	-
13	<i>albicans</i>	+	-
14	-	-	-

+ presença da espécie de fungo
 - ausência da espécie de fungo

4.3 Avaliação sanguínea

4.3.1 Presença da proteína Hwp1

Baseando-se nesta metodologia molecular, nossos resultados demonstraram que nem os usuários de PTS, independentemente da presença de ED, nem os voluntários não usuários apresentaram *C. albicans* no sangue, em nenhuma das coletas da amostra (Figura 2).

Figura 2 - Gel de agarose corado com brometo de etídio dos produtos da PCR para detecção de *C. albicans* no sangue periférico, obtido de 7 indivíduos com estomatite por dentadura. Coluna 1, marcador de peso molecular de 100pb; colunas 2-8, ausência de *Candida albicans* (1180pb); coluna 9, controle positivo da reação (isolamento de *Candida albicans* ATCC 10231 adicionado a sangue coletado de indivíduo saudável); coluna 10, controle negativo da reação (água)

4.3.2 Tipagem sanguínea e nível glicêmico

O tipo sanguíneo mais frequentemente encontrado nos pacientes do grupo 1 foi O+ (57,15%), seguido de A+ (21,43%), A- (7,14%), AB+ (7,14%) e AB- (7,14%). No grupo 2, o tipo O+ (50%) e o tipo A+ (28,57%) também foram os mais frequentes, seguido de B+ (14,29%) e AB+ (7,14%). No grupo 3, o tipo O+ (50%) foi o mais prevalente, seguido de A+ (35,72%), B+ (7,14%) e AB+ (7,14%). Nenhuma correlação positiva foi encontrada entre o tipo sanguíneo e a presença de ED.

Apenas 2 pacientes do grupo 1 apresentaram nível glicêmico em jejum maior que 110, sendo que 9 pacientes (64,28%) eram diabéticos apresentando uma quantidade de glicemia glicosilada maior que 6%. Já no grupo 2, nenhum paciente apresentou nível de glicemia em jejum maior que 110. Contudo, 50% destes pacientes apresentaram uma quantidade de glicemia glicosilada maior que 6%, sendo portando identificados como diabéticos. O grupo 3 apresentou 14,28% dos pacientes com nível glicêmico em jejum maior que 110. Apenas 1 paciente era diabético, apresentando uma quantidade de glicemia glicosilada maior que 6%.

Estes dados também estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

A análise estatística apresentou diferença significativa ($p \leq 0,005$) entre os grupos 1 e 3 em relação a ocorrência do diabetes, visto que um número maior de pacientes do grupo 1 apresentaram diabetes em comparação àqueles do grupo 3. Portanto, nossos resultados revelaram uma relação positiva entre a presença de ED e a ocorrência do diabetes.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A estomatite por dentadura é um processo inflamatório localizado, que acomete a mucosa subjacente a uma prótese total ou parcial removível, (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; RAMAGE et al., 2004; SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; COCO et al., 2008; BARAN; NALÇACI, 2008), e geralmente está associada a presença do fungo *C. albicans* no epitélio da mucosa palatina (CUMMING et al., 1990; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007; CAMPOS et al., 2008; COCO et al., 2008), bem como no material resinoso das próteses (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; RAMAGE et al., 2004; EMAMI et al., 2007; FIGUEIRAL et al., 2007; CAMPOS et al., 2008; COCO et al., 2008).

Uma característica interessante das infecções fúngicas com invasão tecidual é que algumas progridem para a infecção sistêmica enquanto outras permanecem localizadas. A princípio, a progressão é uma função decorrente do grau de imunocomprometimento do hospedeiro e dos fatores de virulência produzidos pelo fungo. Embora se tenha o conhecimento das respostas imunológicas do hospedeiro frente às primeiras etapas da infecção por *Candida* (DONGARI-BAGTZOGLU; FIDEL, 2005), pouco se sabe a respeito das alterações imunológicas sistêmicas frente às infecções localizadas (OLIVEIRA et al., 2007), bem como da quantidade de componentes fúngicos de *Candida* no sangue de pacientes com ED, levando ou significando a disseminação da doença.

Existem evidências de que bactérias ou parte delas podem circular no sangue de indivíduos sadios (GRANFORS et al., 1998; NIKKARI et al., 2001). De fato, sabe-se que culturas positivas para bacteremia ocorrem após a escovação dos dentes nos casos de doença periodontal (BERGER et al., 1974). A presença de DNA bacteriano na circulação sanguínea tem importantes implicações para a vigilância e desenvolvimento do sistema imunológico, e para um possível papel, ainda não caracterizado, da bactéria na doença sistêmica idiopática (NIKKARI et al., 2001). Embora os estudos de Nikkari et al. tenham sugerido que o sangue periférico de pessoas sadias contém DNA bacteriano, os autores não puderam concluir se este

DNA provinha da pele, do sangue ou de ambos, evidenciando assim a necessidade de se determinar a composição de DNA bacteriano no sangue de indivíduos saudáveis.

Alterações sistêmicas, nos casos de infecções fúngicas localizadas, têm sido relatadas, sugerindo que estes microrganismos conseguem atravessar as barreiras epiteliais e imunológicas locais ativando mecanismos diversos de defesa (MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005). Nestes casos, seria possível detectar tais microrganismos no sangue destes pacientes, visto que por meio de técnicas de PCR fungos foram observados no sangue periférico de pacientes com candidemia e com suspeita de candidose invasiva (EINSELE et al., 1997; AHMAD et al., 2002; ALAM; MUSTAFA; KHAN, 2007).

Assim sendo, interessou-nos especular se este fungo também não estaria presente no sangue de pacientes com ED, logicamente em quantidades inferiores àquelas demonstradas em pacientes com candidemia, as quais mesmo não tendo valor prognóstico, poderiam evidenciar a presença ou invasão de fungos no sangue de pacientes com doença localizada e explicar aspectos específicos da resposta imunológica nestes pacientes.

Desta forma, este estudo procurou, através da PCR, avaliar a presença do fungo *C. albicans* no sangue de pacientes com ED e sua relação com a apresentação clínica da doença. Além disso, a fim de se verificar uma possível contaminação sanguínea transitória, os pacientes foram reavaliados após um período médio de 7 dias.

A técnica da PCR tem sido utilizada para o diagnóstico de casos de candidemia, em substituição às técnicas que utilizam culturas de sangue, as quais apresentam baixa sensibilidade (REBOLI, 1993; EINSELE et al., 1997; MOREIRA-OLIVEIRA et al., 2005; PITARCH et al., 2006; ALAM; MUSTAFA; KHAN, 2007; DOJNOV et al., 2007). A PCR é uma técnica relativamente simples, tem a capacidade de detectar infecções causadas por mais de um tipo de fungo e de identificar as espécies fúngicas presentes (EINSELE et al., 1997; AHMAD et al., 2002). Múltiplas cópias do gene alvo aumentam a sensibilidade da detecção da infecção fúngica (NIKKARI et al. 2001). Assim sendo, a PCR pode ser utilizada para detectar e caracterizar patógenos microbianos e organismos comensais no sangue de indivíduos saudáveis ou não. Sua limitação está na utilização de uma quantidade muito pequena de sangue do paciente, que poderia não incluir o material genético

caso este esteja em baixa concentração. Assim, em nosso trabalho todas as reações da PCR foram realizadas em duplicatas, e os indivíduos seriam considerados positivos para fungemia se o material genético estivesse presente em pelo menos uma das duas coletas analisadas.

Baseando-se nesta metodologia, nenhum dos pacientes analisados em nosso estudo apresentou o fragmento de DNA responsável pela codificação da proteína Hwp1 de *C. albicans* no sangue, em nenhuma das coletas.

A não detecção de DNA de *C. albicans* no sangue dos pacientes com ED permite-nos prever a eficácia de mecanismos imunológicos locais e sistêmicos capazes de impedir a distribuição sistêmica ou de eliminar estes antígenos. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade que a penetração destes fungos na corrente sanguínea não resulta em quantidade suficiente para sua evidência através da técnica de PCR. Embora tendo avaliado apenas um total de 10 pacientes, Ahmad et al. também obtiveram resultados negativos quanto à presença de DNA fúngico em pacientes com candidose vaginal e candidose bucal, sugerindo a ausência de quantidades detectáveis de DNA fúngico nestes pacientes.

Talvez, a combinação de outras técnicas para detecção de *Candida* como aquelas para pesquisa de metabólitos, de proteínas como manana, de polissacarídeos como $\beta(1-3)$ glucano, a partir do sangue periférico de pacientes com ED aumente a possibilidade de detecção nos casos de candidemia. Um exemplo é a detecção de $\beta(1-3)$ glucano, um marcador fungo-específico, encontrado em quantidades $\geq 60\text{pg/mL}$ em pacientes com infecção fúngica invasiva (ALAM; MUSTAFA; KHAN, 2007). Até mesmo a utilização da técnica da PCR em tempo real, como utilizado por Nikkari et al. para a identificação de DNA de bactérias no sangue de indivíduos saudáveis, pode apresentar maior capacidade para a identificação de menores quantidades de DNA fúngico no sangue periférico de pacientes com ED.

Embora revelando a provável ausência de disseminação do fungo *C. albicans* nos indivíduos usuários de PTS, com ou sem ED, nosso estudo demonstrou que este fungo foi a espécie mais comumente isolada da superfície interna da PTS e do palato destes indivíduos. A associação entre a ocorrência de ED e a presença de *C. albicans* na prótese e/ou na mucosa palatal destes indivíduos tem sido bem documentada (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; CUMMING et al., 1990; IACOPINO; WATHEN, 1992; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; BARBEAU et al.,

2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; RAMAGE et al., 2004; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006; EMAMI et al., 2007; FIGUEIRAL et al., 2007; CAMPOS et al., 2008).

Nossos resultados também apresentaram correlação significativa entre os pacientes com ED e a presença de fungo do gênero *Candida*, tanto na superfície interna da prótese total superior como na mucosa palatal, corroborando Figueiral et al. Considerando os usuários de PTS com ED, a espécie *C. albicans* pôde ser observada em associação com a espécie *C. krusei*, tanto na prótese quanto no palato. De forma concordante, Pereira-Cenci et al. relataram que mais de uma espécie de *Candida* pode simultaneamente colonizar a mucosa palatal de indivíduos acometidos ou não por infecção fúngica. A importância da interação entre espécies de *Candida* na formação do biofilme já foi demonstrada *in vitro* (THEIN; SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 2007); contudo, novos estudos são necessários para o entendimento do papel de espécies não *albicans* tanto na ED quanto na microflora bucal em condições fisiológicas.

A observação das espécies de *Candida* em nosso estudo corrobora outros, nos quais as espécies não *albicans* mais comumente encontradas são *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (MOSCA et al., 2005). Existem trabalhos que sugerem que as infecções mistas podem estar associadas a sintomas mais severos ou ser mais difíceis de tratar (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL JR, 2005). Baseando-se no fato de que as espécies de *Candida* variam em seu perfil de suscetibilidade antifúngica (AHMAD et al., 2002; ALAM; MUSTAFA; KHAN, 2007; COCO et al., 2008), *C. krusei* é problemática pela sua resistência quase universal aos derivados azólicos, podendo também ter reduzida sensibilidade a outras alternativas terapêuticas. Da mesma forma, *C. tropicalis* comumente resiste ao cetoconazol (RIBEIRO et al., 2004). Assim, a detecção de culturas mistas, sobre a superfície interna das PTS ou sobre a lesão de ED, pode ser útil para a determinação da terapia antifúngica adequada, quando necessário.

A detecção de colônias mistas, em nosso trabalho, foi possível graças a utilização de CHROMagar *Candida*, meio seletivo que permite a rápida identificação de espécies de *Candida* em amostras clínicas, através da cor e da morfologia das colônias (ODDS; BERNAERTS, 1994; PFALLER; HOUSTON; COFFMANN S, 1996; SIVAKUMAR et al., 2009). Porém, considerando os aspectos fenotípicos similares entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* (SULLIVAN; COLEMAN, 1998; EGGIMANN;

GARBINO; PITTET, 2003; RIBEIRO et al., 2004; MOSCA et al., 2005; CHAVASCO et al., 2006), métodos mais específicos são necessários para a diferenciação genotípica destas espécies, como a PCR (SULLIVAN; COLEMAN, 1998; MOSCA et al., 2005; CHAVASCO et al., 2006; MARCOS-ARIAS et al., 2009). Embora, o CHROMagar Candida seja um meio diferencial, esta diferenciação não é verificada entre as espécies anteriormente citadas, pois ambas exibem colônias verdes. Por isso, este estudo utilizou a técnica descrita por Romeo et al., adaptada às condições de trabalho e aos materiais disponíveis para este estudo, baseada na amplificação do gene que codifica a proteína Hwp1, cujo tamanho antecipado do produto de amplificação contém 1180pb para *C. albicans* e 930pb para *C. dubliniensis*. No presente trabalho, todas as colônias verdes demonstraram a presença de *C. albicans*, por meio desta metodologia, confirmando o diagnóstico clínico de ED, segundo Coco et al., Dar-Odeh et al., Emami et al. e Mosca et al., bem como o isolamento da espécie fúngica. Apenas uma paciente apresentou *C. albicans* e *C. dubliniensis* simultaneamente, tanto na mucosa palatal quanto na superfície interna da prótese. Vale ressaltar que esta paciente era diabética, de acordo com nossa avaliação sanguínea do nível glicêmico.

Alguns autores relataram que *C. dubliniensis* pode ser isolada da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (GUTIÉRREZ et al., 2002; MOSCA et al. 2005), de indivíduos com ED (COLEMAN; SULLIVAN; MOSSMAN, 1997) e de diabéticos, sendo que neste último caso, verificaram-se níveis elevados de *C. dubliniensis* (WILLIS et al., 2001). Contudo, *C. dubliniensis* também esteve implicada em casos de candidose superficial e disseminada em pacientes com e sem HIV (GUTIÉRREZ et al., 2002; CHAVASCO et al., 2006). A importância clínica de *C. dubliniensis* requer investigações futuras a respeito de sua epidemiologia e fatores de virulência (MOSCA et al. 2005). Tais estudos deverão facilitar o desenvolvimento de novas técnicas para sua identificação.

No presente trabalho, a avaliação dos nossos pacientes usuários de prótese total superior permitiu ainda verificar que embora a maioria fossem do gênero feminino, com idade média de 61,7 anos, e usavam suas próteses há mais de 10 anos, não se observou correlação estatisticamente significativa ($p \leq 0,005$) entre estas variáveis e a ocorrência da ED, de forma semelhante a outros estudos com relação à idade (CUMMING et al., 1990), ao gênero (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005) e aos anos de uso da PT (BARBEAU et al., 2003). Por

outro lado, os resultados deste estudo contrariam aqueles que verificaram uma associação entre a ocorrência da doença e o gênero feminino (ARENDORF; WALKER, 1987; WILSON, 1998; PIRES et al., 2002), considerando possíveis alterações hormonais ou deficiência de ferro, frequentemente encontrada nas mulheres (FIGUEIRAL et al., 2007). Com relação ao fumo, os relatos também são divergentes, demonstrando (CUMMING et al., 1990; BARBEAU et al., 2003) ou não (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; EMAMI et al., 2007) associação com a ED. Embora o tabaco contenha fatores prejudiciais a *Candida*, sabe-se que o fumo causa alterações na mucosa que facilitam a colonização e subsequente infecção fúngica (OLIVER; SHILLITOE, 1984; CUMMING et al., 1990).

De acordo com a classificação de Newton, a maioria dos pacientes apresentou ED tipo II (50%), embora alguns trabalhos (PIRES et al., 2002; FIGUEIRAL et al., 2007) relatem maior ocorrência do tipo I. Esta variabilidade entre diferentes investigadores pode ser parcialmente explicada pela subjetividade da classificação, sendo necessária a padronização de uma nova classificação com índices mais objetivos, para a realização e a comparação com futuros estudos.

Um fator de risco que pode afetar a colonização por *Candida* é o diabetes (BARBEAU et al., 2003). Nosso trabalho permitiu verificar uma correlação positiva entre esta doença e a ED, corroborando Shulman et al. que afirmaram que indivíduos com glicemia glicosilada maior que 9% tiveram alta prevalência de ED. Alterações na mucosa bucal, causadas pelo diabetes, como a inflamação dos tecidos e a maior reabsorção óssea sob a base da dentadura (SHIRAI et al., 1998; MARUO et al., 1999), facilitam a colonização e a infecção fúngicas. As células epiteliais do palato de usuários de PTS com diabetes insulino-independente abrigaram mais células fúngicas do que as células de não diabéticos (DOROCKA-BOBKOWSKA; BUDTZ-JÖRGENSEN; WLOCH, 1996). O diabetes causa aberrações no sistema imunológico, como a diminuição da opsonização e da atividade quimiotática de neutrófilos e monócitos, contribuindo para o aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas (GUGGENHEIMER et al., 2000; SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2005). A diminuição da fagocitose, da morte intracelular, da atividade bactericida e da quimiotaxia tem sido associada ao pobre controle do diabetes. Esses neutrófilos deficientes estão aumentados em pacientes com diabetes e candidose bucal. A hiperglicemia também pode contribuir para o risco de candidose bucal pelo elevado nível de glicose salivar, que favorece o

crescimento de *Candida* (GUGGENHEIMER et al., 2000; SOYSA; SAMARANAYAKE; ELLEPOLA, 2005) e também pode inativar imunoglobulinas antifúngicas na saliva. Contudo, o diabetes não parece ser um risco substancial para a disseminação da infecção (GUGGENHEIMER et al., 2000). Correlações entre os grupos sanguíneos e a vulnerabilidade a infecções micóticas, incluindo a infecção bucal por *C. albicans*, tem sido documentadas. Estudos sugerem que, em sujeitos saudáveis, o grupo sanguíneo O é de alto risco para a infecção e o transporte de *C. albicans* (BURFORD-MASON; WEBER; WILLOUGHBY, 1988; NIKAWA et al., 1991). Porém, a verificação de que a maioria dos nossos pacientes, de todos os grupos, pertence ao grupo sanguíneo O+ não permitiu esta correlação, já que a maioria da população brasileira apresenta este tipo sanguíneo (NOVARETTI; DORLHIAC-LLACER; CHAMONE, 2000).

Em resumo, nosso trabalho demonstrou uma forte relação entre a ocorrência da ED e a presença de fungos do gênero *Candida*, em especial da espécie *albicans*, na superfície interna da prótese total superior e na lesão destes pacientes. Além disso, constatou-se que os pacientes com diagnóstico clínico e microbiológico de ED não apresentaram distribuição sanguínea de *C. albicans*.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e no que foi exposto e discutido nos capítulos anteriores deste trabalho, pôde-se concluir que:

- ◆ Os pacientes com diagnóstico clínico e microbiológico de estomatite por dentadura não apresentaram distribuição sanguínea de *Candida albicans*;
- ◆ Os indivíduos não portadores de estomatite por dentadura, embora com *Candida albicans* na superfície interna das próteses totais superiores e na mucosa palatal, também não apresentaram distribuição sanguínea de *Candida albicans*;
- ◆ A estomatite por dentadura tem forte relação com a presença de fungos do gênero *Candida*, principalmente da espécie *albicans*, na lesão e na superfície interna das próteses totais superiores.

7 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. [acesso 2007 out 20]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia.asp>.

AHMAD S, KHAN Z, MUSTAFA AS, KHAN ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2483-89.

AKPAN A, MORGAN R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78:455-9.

ALAM FF, MUSTAFA AS, KHAN ZU. Comparative evaluation of (1, 3)- β -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC Infect Dis. 2007;7:103.

ARENDORF TM, WALKER DM. Denture stomatitis: a review. J Oral Rehabil. 1987;14:217-27.

BARAN I, NALÇACI R. Self-reported denture hygiene habits and oral tissue conditions of complete denture wearers. Arch Gerontol Geriatr. 2008.

BARBEAU J, SÉGUIN J, GOULET JP, 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;95:51-9.

BECK-SAGUÉ CM, JARVIS WR. Secular trends in the epidemiology nosocomial infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis. 1993;167:1247-51.

BERGER SA, WEITZMAN S, EDBERG SC, CASEY JI. Bacteremia after the use of an oral irrigation device. A controlled study in subjects with normal-appearing gingiva: comparison with use of toothbrush. Ann Intern Med. 1974;80:510-11.

BURFORD-MASON AP, WEBER JCP, WILLOUGHBY. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy subjects. J Med Vet Mycol. 1988;26:49-56.

CAMPOS MS, MARCHINI L, BERNARDES LA, PAULINO LC, NOBREGA FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(5):419-24.

CANNON RD, CHAFFIN WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. J Dent Educ. 2001;65:785-7.

CHAVASCO JK, PAULA CR, HIRATA MH, ALEVA NA, MELO CE, GAMBALE W, RUIZ LDA S, FRANCO MC. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated

from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2006;48(1):21-6.

CHIANG LY, SHEPPARD DC, BRUNO VM, MITCHELL AP, EDWARDS JE, FILLER SG. *Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*. 2007;9:233-45.

COCO BJ, BAGG J, CROSS LJ, JOSE A, CROSS J, RAMAGE G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:377-83.

COLEMAN DC, SULLIVAN DJ, MOSSMAN JM. *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 1997;35(11):3011-12.

CUMMING CG, WIGHT C, BLACKWELL CL, WRAY D. Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5:82-5.

DAR-ODEH NS, SHEHABI AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*. 2003;46:187-91.

DOJNOV B, BOZIC N, BULAJIC N, VUJCIC Z. Preparation of combined extract of cell wall and cytosol antigens of *Candida albicans* for immunoblot analysis. *J Clin Lab Anal*. 2007;21:406-12.

DONGARI-BAGTZOGLOU A, FIDEL JR PL. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res*. 2005;84(11):966-77.

DOROCKA-BOBKOWSKA B, BUDTZ-JÖRGENSEN E, WLOCH S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(8):411-15.

EGGIMANN P, GARBINO J, PITTET D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:685-702.

EINSELE H, HEBART H, ROLLER G, LÖFFLER J, ROTHENHÖFER I, MÜLLER CA, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1353-60.

ELLIS CA, SPIVACK ML. The significance of candidemia. *Ann Intern Med*. 1967;67(3):511-22.

EMAMI E, SÉGUIN J, ROMPRÉ PH, KONINCK L, 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;20(5):514-20.

FARAH CS, ASHMAN RB, CHALLACOMBE SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*. 2000;18:553-62.

FIDEL JR PL. Immunity to *Candida*. *Oral Dis*. 2002;8(suppl. 2):69-75.

FIGUEIRAL MH, AZUL A, PINTO E, FONSECA PA, BRANCO FM, SCULLY C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors – a large cohort. J Oral Rehabil. 2007;34:448-55.

FILLER SG, SWERDLOFF JN, HOBBS C, LUCKETT PM. Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*. Infect Immun. 1995;63:976-83.

FREITAS JB, GOMEZ RS, DE ABREU MHNG, FERREIRA E FERREIRA E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. J Oral Rehabil. 2008;35:370-74.

GONÇALVES W, WRIGHTSON AS, HENRY RG. Common oral conditions in older persons. Am Fam Physician. 2008;78: 845-51.

GRANFORS K, MERILAHTI PR, LUUKKAINEN R, MÖTTÖNEN T, LAHESMAA R, PROBST P, et al. Persistence of *Yersinia* antigens in peripheral blood cells from patients with *Yersinia enterocolitica* O: 3 infection with or without reactive arthritis. Arthritis Rheum. 1998; 41:855–62.

GUGGENHEIMER J, MOORE PA, ROSSIE K, MYERS D, MONGELLUZZO MB, BLOCK HM, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;89:570-76.

GUTIÉRREZ J, MORALES P, GONZÁLEZ MA, QUINDÓS G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. J Basic Microbiol. 2002;42(3):207-27.

HOWLETT JA, SQUIER A. *Candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. Infect Immun. 1980;29:252–60.

IACOPINO AM, WATHEN WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. J Am Dent Assoc. 1992;123:46-51.

IBRAHIM AS, FILLER SG, SANGLARD D, EDWARDS JE JR, HUBE B. Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. Infect Immun. 1998 Jun;66:3003-5.

JAMS J, SAMARANAYAKE LP, LU Q, JIN LJ. IL-1 α , IL-1 β and IL-8 are differentially induced by *Candida* in experimental oral candidiasis. Oral Dis. 2007;13:426-33.

KONDORI N, EDEBO L, MATTSBY-BALTZER I. Circulating β (1-3) glucan and immunoglobulin G subclass antibodies to *Candida albicans* cell wall antigens in patients with systemic candidiasis. Clin Diagn Lab Immunol. 2004;11(2):344-50.

KOZIOL-MONTEWKA M, MAGRYS A, PALUCH-OLEŚ J, BOGUT A, BUCZYŃSKI K, JABLONKA S. MPO and Cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. Immunol Invest. 2006;35:167-79.

KULAK Y, ARIKAN A, KAZAZOĞLU E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. J Oral Rehabil. 1997;24(10):788-90.

KUMAMOTO CA, VINCES MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. Annu Rev Microbiol. 2005a;59:113-33.

KUMAMOTO CA, VINCES MD. Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. Cell Microbiol. 2005b;7(11):1546-54.

LACAZ CS, PORTO E, MARTINS JEC. Micologia médica: fungos actinomicetos e algas de interesse médico. 7ª ed. São Paulo: Servier; 1984.

LEIGH JE, STEELE C, WORMLEY F, FIDEL PL JR. Salivary cytokine profiles in the immunocompetent individual with *Candida*-associated denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(5):311-4.

LERMANN U, MORSCHHÄUSER J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. Microbiology. 2008;154:3281-95.

MARCOS-ARIAS C, VICENTE JL, SAHAND IH, EGUIA A, DE-JUAN A, MADARIAGA L, AGUIRRE JM, ERASO E, QUINDÓS G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. Archives of Oral Biology. 2009;54:127 – 31.

MARUO Y, SATO T, HARA T, SHIRAI H. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base bearing masticatory pressure. J Oral Rehabil. 1999;26:345-55.

MORACE G, SANGUINETTI M, POSTERARO B, CASCIO G, FADDA G. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR – restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1997;35(3):667-72.

MOREIRA-OLIVEIRA MS, MIKAMI Y, MIYAJI M, IMAI T, SCHREIBER AZ, MORETTI ML. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24:721–26.

MOSCA CO, MORAGUES MD, BRENA S, ROSA AC, PONTÓN J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10(1):28-31.

NAGAI Y, TAKESHITA N, SAKU T. Histopathologic and ultrastructural studies of oral mucosa with *Candida* infection. J Oral Pathol Med. 1992;21:171-5.

NAGLIK JR, CHALLACOMBE SJ, HUBE B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003;67:400–28.

NAGLIK JR, FOSTIRA F, RUPRAI J, STAAB JF, CHALLACOMBE SJ, SUNDSTROM P. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. J Med Microbiol. 2006;55:1323-7.

NIKAWA H, KOTANI H, SADAMORI S, HAMADA T. Denture stomatitis and ABO blood types. J Prosthet Dent. 1991;66:391-4.

NIKKARI S, MCLAUGHLIN IJ, BI W, DODGE DE, RELMAN DE. Does Blood of Healthy Subjects Contain Bacterial Ribosomal DNA? J Clin Microbiol. 2001;39:1956-59.

NOVARETTI MCZ, DORLHIAC-LLACER PE, CHAMONE DAF. Estudo de grupos sanguíneos em doadores de sangue caucasóides e negróides na cidade de São Paulo. Rev Bras Hematol Hemoter. 2000;22(1):23-32.

ODDS F, BERNAERTS R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clin Microbiol. 1994;32:1923-29.

OGRYDZIAK DM. Yeast extracellular proteases. Crit. Rev. Biotechnol. 1993; 13:1-55.

OKSALA E. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990;48:71-4.

OLIVEIRA MA, CARVALHO LP, GOMES MS, BACELLAR O, BARROS TF, CARVALHO EM. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. Microbiol Immunol. 2007;51(8):713-19.

OLIVER DE, SHILLITOE EJ. Effect of smoking on the prevalence and intraoral distribution on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. J Oral Pathol. 1984; 13:265-70.

PAPPAS PG. Invasive candidiasis. Infect Dis Clin N Am. 2006;20:485-506.

PEREIRA-CENCI T, DEL BEL CURY AA, CRIELAARD W, TEN CATE JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. J Appl Oral Sci. 2008;16:86 94.

PFALLER MA, HOUSTON A, COFFMANN S. Application of CHROMagar Candida for Rapid Screening of Clinical Specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. J Clin Microbiol. 1996;34:58-61.

PHAN QT, BELANGER PH, FILLER SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. Infect Immun. 2000;68:3485-90.

PIRES FR, SANTOS EBD, BONAN PRF, ALMEIDA OP, LOPES MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* Brazilian edentulous patients. J Oral Rehabil. 2002;29:1115-19.

PITARCH A, JIMÉNEZ J, NOMBELA C, GIL C. Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. Mol Cell Proteomics. 2006;5(1):79-96.

PONNIAH G, ROLLENHAGEN G, BAHN Y, STAAB JF, SUNDSTROM P. State of differentiation defines buccal epithelial cell affinity for cross-linking to *Candida albicans* Hwp1. J Oral Pathol Med. 2007;36:456–67.

RAMAGE G, TOMSETT K, WICKES BL, LÓPES-RIBOT JL, REDDING SW. Denture stomatitis: A role for *Candida* biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;98:53-9.

REBOLI AC. Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for *Candida* antigen detection. J Clin Microbiol. 1993;31(3):518-23.

REISS E, STONE SH, HASENCLEEVER HF. Serological and cellular immune activity of peptidoglucomannan fractions of *Candida albicans* cell walls. Infect Immun. 1974;9(5):881-90.

RIBEIRO EL, GUIMARÃES RI, INÁCIO MCC, FERREIRA WM, CARDOSO CG, DIAS SMS, et al. Aspecto das leveduras de *Candida* vinculadas as infecções nosocomiais. News Lab. 2004;64: 106-26.

ROMEO O, RACCO C, CRISEO G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol. 2006;44(7):2590-92.

SAKAI VT, CAMPOS MR, MACHADO MAAM, LAURIS JRP, GREENE AS, SANTOS CF. Prevalence of four putative periodontopathic bacteria in saliva of a group of Brazilian children with mixed dentition: 1-year longitudinal study. Int J Paediatr Dent. 2007; 17:1992-99.

SENDIDI B, JOUAULT T, COUDRIAU R, CAMUS D, ODDS F, TABOURET M, et al. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of α - and β -linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. J Clin Microbiol. 2004;42(1):164-71.

SHIN JH, NOLTE FS, HOLLOWAY BP, MORRISON CJ. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 59 exonuclease assay using fluorescent DNA probes. J Clin Microbiol. 1997;37(1):165-70.

SHIRAI H, SATO T, HARA T, MINAGI S. The effect of diabetes mellitus on histopathological changes in the tissues under denture base and without mechanical pressure. J Oral Rehabil. 1998;25:715-20.

SHULMAN JD, RIVERA-HIDALGO F, BEACH MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. J Oral Pathol Med. 2005;34:340-6.

SINDRIM JJC, ROCHA MFG. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;2004.

SIVAKUMAR VG, SHANKAR P, NALIMA K, MENON T. Use of CHROMagar in the Differentiation of Common Species of *Candida*. Mycopathologia. 2009;167:47-9.

SOYSA NS, SAMARANAYAKE LP, ELLEPOLA ANB. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. *Diabet Med*. 2005;23:455-9.

STAAB JF, SUNDSTROM P. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. *Yeast*. 1998;14(7):681-6.

STAAB JF, BRADWAY SD, FIDEL PL, SUNDSTROM P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science*. 1999;283(5407):1535-8.

STEELE C, LEIGH J, SWOBODA R, FIDEL JR PL. Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis*. 2000;182:1479-85.

SULLIVAN D, COLEMAN D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):329-34.

THEIN ZM, SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol*. 2007;52(8):761-67.

VILLAR CC, DONGARI-BAGTZOGLOU A. Immune defence mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:e29.

VITKOV L, WEITGASSER R, LUGSTEIN A, NOACK MJ, FUCHS K, KRAUTGARTNER WD. Glycaemic disorders in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:406-9.

VITKOV L, KRAUTGARTNER WD, HANNIG M, WEITGASSER R, STOIBER W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17:60-4.

WEBB BC, THOMAS CJ, WILLCOX MDP, HARTY DWS, KNOX KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J*. 1998;43(3):160-6.

WILLIS AM, COULTER WA, FULTON CR, HAYES JR, BELL PM, LAMEY PJ. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(3):317-21.

WILSON J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998; 185(8):380-84.

ZAITS C, CAMPBELL I, MARQUES AS, RUIZ LRB, SOUZA VM. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Médica e Científica LTDA - MEDSI; 1998.

ZISSIS A, YANNIKAKIS S, HARRISON A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *Int J Prosthodont*. 2006;19(6):621-25.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901
 PABX: (0XX14) 3235-8000 / FAX: (0XX14) 3223-4679

ANAMNESE

Nome:

Data de Nascimento:

Idade:

Gênero:

Naturalidade:

Estado:

Nacionalidade:

Ocupação:

Estado civil:

Endereço residencial:

Bairro:

Cidade:

Estado:

Tel:

Tel recado:

Falar com/

Endereço Profissional:

Tel:

Bairro:

Cidade:

Estado:

1. Utiliza dentadura?
2. Há quantos anos utiliza dentadura?
3. Faz uso de alguma medicação?
4. Há quanto tempo usa esta medicação?
5. Terminou algum tratamento recentemente? O que você tinha?
6. Visita o médico com frequência? Por quê?
7. Está com alguma doença? Qual?
8. Tem diabetes?
9. Já fez alguma cirurgia? De que natureza?
10. Sangrou muito?
11. A ferida da cirurgia demorou para cicatrizar?
12. O (a) Sr. (a) se sente muito cansado com frequência, mesmo sem ter se esforçado fisicamente?
13. Sente dores no corpo?
14. O (a) Sr. (a) sente náuseas e / ou vomita com frequência?
15. Tem sentido redução ou perda de apetite? Com que frequência?
16. Houve perda de peso ultimamente?
17. Notou o aparecimento de algum inchaço no corpo? Onde? Por quê?
18. Faz uso de bebida alcoólica?
19. O (a) Sr. (a) fuma? Quanto? Há quanto tempo?
20. Apresenta algum sangramento espontâneo?
21. Teve diarreia recentemente? Por quê?

Exame clínico oral:

Descrição clínica da lesão:

ANEXO 2

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901
PABX: (0XX14) 3235-8000 / FAX: (0XX14) 3223-4679

CARTA DE INFORMAÇÃO

A nossa pesquisa tem o objetivo de avaliar a presença de constituintes genéticos e protéicos específicos do fungo *Candida albicans* no sangue de pacientes com estomatite por dentadura. Assim, necessitaremos de amostras de sangue de voluntários usuários de dentadura ou não, sofrendo de estomatite ou não. Os riscos e o desconforto da coleta de sangue são mínimos e de total responsabilidade da pesquisadora responsável pelo projeto. A coleta de sangue é a mesma que se realiza em laboratório de análise, sendo muito segura, e será feita em uma sessão. Esta pesquisa pretende esclarecer aspectos microbiológicos e patológicos da estomatite por dentadura, para aprimorar o diagnóstico e o tratamento dessa doença, proporcionando saúde bucal para todos.

Informamos ainda que a partir da amostra de sangue obtida serão realizados exames de glicemia para descartar a possibilidade de diabetes. Os resultados serão disponibilizados para o seu conhecimento.

Qualquer dúvida é só procurar a aluna Carine Ervolino de Oliveira, no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB-Universidade de São Paulo, ou pelo telefone (14) 3235-8251. Caso mude de idéia e não queira mais participar da pesquisa, esclareço que o tratamento odontológico oferecido pela FOB ocorrerá da mesma maneira, sem qualquer prejuízo.

“Caso o sujeito da pesquisa queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, localizado no endereço Al. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da biblioteca, FOB-USP) ou pelo telefone (14) 3235-8356”.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da **CARTA DE INFORMAÇÃO AO SUJEITO DA PESQUISA**, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO 3

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 079/2008

Bauru, 10 de setembro de 2008.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado "**Avaliação da presença de constituintes de Candida albicans no sangue de indivíduos com estomatite por dentadura**", de autoria de Carine Ervolino de Oliveira, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 27 de agosto de 2008 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Vanessa Soares Lara
Docente do Departamento de Estomatologia