

KAREN REGINA CARIM DA COSTA

**Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a  
antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes  
portadores de lesão bucal**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Celia Candido.

Ribeirão Preto  
2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Karen Regina Carim da.

Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal. Ribeirão Preto, 2006.

113 f.: il.; 30cm

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Candido, Regina Celia.

1. Candida. 2. candidíase bucal. 3. exoenzimas. 4. sensibilidade à antifúngicos.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Karen Regina Carim da Costa

Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Celia Candido

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIAS**

A minha mãe, Regina Carim (*in memoriam*) pelo amor incondicional que transcende o tempo;

Ao meu pai, Sérgio Costa, pelo amor, princípios e por ter me mostrado o caminho da pesquisa;

A minha irmã, Kelly, por sua amizade;

Ao Igor, amado, amigo e companheiro, pelo apoio em todos os momentos de nossa caminhada.

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Regina Celia Candido, pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento científico e intelectual.

A Profa. Dra. Marilena Chinali Komesu, pela colaboração para a execução deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP pela oportunidade de aprendizado.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP pela autorização para o desenvolvimento do estudo.

A Joseane Cristina Ferreira, técnica do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP, pela amizade e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Solange Aparecida Bocado, funcionária do Laboratório de Micologia Clínica da FCFRP-USP pela amizade e auxílio laboratorial.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Rosana Florêncio, Ana Lúcia Turatti, Eleni Passos e Carlos Armando pela atenção em todos os momentos.

Aos pacientes da FORP, alunos de graduação, pós-graduação, funcionários e docentes que gentilmente aceitaram colaborar com o estudo.

À família Taveira (Tia Irecê, Andréa e Adriana) pelo amor e carinho.

A todos os amigos que fiz em Ribeirão Preto, pela amizade, apoio e incentivo durante a pós-graduação.

A CAPES pelo suporte financeiro.

*“E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”*

*I Coríntios, 13: 2*

## RESUMO

COSTA, K. R. C. **Isolamento, quantificação, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras da saliva de pacientes imunocompetentes portadores de lesão bucal.** 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A candidíase é a mais freqüente infecção fúngica oportunista, causada por leveduras do gênero *Candida*, de ocorrência comum na cavidade bucal. O aumento da incidência está relacionado, em grande parte, ao surgimento das terapias e patologias imunossupressoras, embora ela possa ocorrer em indivíduos considerados saudáveis. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a microbiota leveduriforme de pacientes com lesão bucal suspeita de candidíase e compará-la com a de indivíduos saudáveis através da quantificação, produção de enzimas fosfolipase, proteinase e determinação da CIM dos antifúngicos: anfotericina B, itraconazol e fluconazol pelo método de microdiluição em caldo. As leveduras foram isoladas a partir de amostras de saliva não estimulada no meio CHROMagar® *Candida*, que permitiu a observação de colonização mista e uma identificação presuntiva. Posteriormente os isolados foram identificados pela metodologia clássica, através das provas: formação de tubo germinativo em soro humano, estudo da micromorfologia, crescimento a 37°C e 42°C, provas de assimilação e fermentação de carboidratos. Das 100 amostras de saliva dos pacientes com lesão, 70 apresentaram crescimento de leveduras e foram identificadas 63 *C. albicans* e 16 *C. tropicalis*. Entre as 50 amostras de salivas do grupo controle, 16 apresentaram crescimento e foram identificadas 14 *C. albicans* e 3 *C. tropicalis*. Quanto à capacidade de síntese das exoenzimas observou-se que

100% das *C. albicans* de ambos os grupos avaliados produziram as enzimas fosfolipase e proteinase em diferentes níveis de atividade. Os isolados de *C. tropicalis* não apresentaram produção da fosfolipase, com relação à proteinase 43,8% dos isolados de pacientes com lesão bucal foram positivos. Em relação aos testes de sensibilidade, a faixa da CIM para anfotericina B foi de 0,125 – 4µg/mL para os isolados de *C. albicans* e de 2 – 4 µg/mL para os de *C. tropicalis*, com o itraconazol o intervalo da CIM foi de 0,03 – 16µg/mL para as duas espécies e para o fluconazol a faixa da CIM foi de 0,125 - ≥64µg/mL para os isolados de *C. albicans* e de 0,25 - ≥64µg/mL para os de *C. tropicalis*. Com base nos resultados obtidos conclui-se que: a análise de saliva é sensível para detecção de leveduras tanto em pacientes com sinais clínicos de candidíase quanto em indivíduos saudáveis portadores da levedura; *C. albicans* foi à espécie mais isolada em ambos os grupos; todas os isolados de *C. albicans* foram produtores das enzimas fosfolipase e proteinase; nenhum isolado de *C. tropicalis* apresentou atividade da enzima fosfolipase. A maioria dos isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* foram sensíveis *in vitro* aos antifúngicos testados.

Palavras chaves: *Candida*, candidíase bucal, exoenzimas, sensibilidade a antifúngicos.



## ABSTRACT

COSTA, K. R. C. **Isolation, quantification, enzymatic activity and antifungal susceptibility of yeasts from whole saliva of non-compromised patients with clinical signs of candidiasis.** 2006. 113 p. Dissertation (Master's Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Candidiasis is the most frequent opportunistic fungal infection. It is caused by *Candida* yeasts, commonly seen in the oral cavity. Newer therapies and immunosuppressive pathologies are related to the increase of oral candidiasis incidence, although it may occur in healthy subjects. Therefore, the aim of this work was to evaluate yeasts frequency in the oral cavity from patients with clinical signs of oral candidiasis and compare it with frequency observed in healthy subjects through quantification, phospholipase and proteinase activity tests and antifungal susceptibility (amphotericin B, itraconazole, fluconazole) by broth microdilution test. The yeasts were isolated from unstimulated whole saliva samples in CHROMagar® *Candida* medium, which allowed association between two or more species observation and presumptive identification. Latter, strains identification were confirmed by classical methodology. Of 100 candidiasis patients samples, yeast growth was observed in 70 samples and 63 *C. albicans* and 16 *C. tropicalis* strains were identified. Of 50 healthy subjects samples, yeast growth was observed in 16 samples and 14 *C. albicans* e 3 *C. tropicalis* strains were identified. Differential activity of phospholipase and proteinase enzymes was detected in 100% *C. albicans* strains in both groups. Phospholipase activity was not detected in *C. tropicalis* strains, and proteinase activity was detected in 43,8% strains from oral candidiasis group. Susceptibility tests showed amphotericin B MIC range from 0,125 – 4 µg/mL for *C. albicans*

strains and 2 – 4 µg/mL for *C. tropicalis* strains; itraconazole MIC range from 0,03 – 16 µg/mL for both species; fluconazole MIC range from 0,125 - ≥ 64 µg/mL for *C. albicans* strains and 0,25 - ≥ 64 µg/mL for *C. tropicalis* strains. In conclusion, our study demonstrates that saliva analysis is sensitive to detect yeasts from patients with clinical signs of oral candidiasis and from yeasts carriers; *C. albicans* was prevalent in both groups; all *C. albicans* strains showed phospholipase and proteinase activity; None *C. tropicalis* strains showed phospholipase activity. The majority of *C. albicans* and *C. tropicalis* strains were inhibited *in vitro* by antifungals evaluated.

Keywords: *Candida*, oral candidiasis, exoenzymes, antifungal susceptibility.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Categoria I da candidíase oral (adaptado de FARAH et al, 2000)... 19	19
Quadro 2. Técnicas de coleta na cavidade oral para o isolamento de <i>Candida</i> (adaptado de WILLIAMS e LEWIS, 2000). ..... 20	20
Quadro 3. Diretrizes para a interpretação dos testes de sensibilidade <i>in vitro</i> para as espécies de <i>Candida</i> . *S-DD: sensibilidade dose-dependente. .... 40	40

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Determinantes na susceptibilidade do hospedeiro a candidíase oral (adaptado de SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1990). .....	18
Figura 2. Fluxograma da metodologia: isolamento e quantificação.....	32
Figura 3. Fluxograma microdiluição: distribuição das drogas nas microplacas.	38
Figura 4. Fluxograma microdiluição: preparação do inóculo. ....	39
Figura 5. <i>C. albicans</i> (A) e <i>C. tropicalis</i> (B) em CHROMagar® Candida.....	44
Figura 6. Distribuição dos tipos de lesões entre os 100 pacientes com sinais clínicos de candidíase bucal.....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das contagens de leveduras em relação ao tipo de lesão e ao grupo controle. ....	43
Tabela 2. Distribuição das espécies de leveduras de acordo com o grupo estudado.....	45
Tabela 3. Resultado da pesquisa de leveduras nas amostras de saliva entre os tipos de lesões. ....	47
Tabela 4. Distribuição das espécies de leveduras segundo os tipos de lesões bucais.....	47
Tabela 5. Atividade da enzima fosfolipase das leveduras isoladas do grupo com lesões bucais e do grupo controle.....	48
Tabela 6. Atividade da enzima proteinase das leveduras isoladas do grupo com lesões bucais e do grupo controle.....	49
Tabela 7. Concentrações inibitórias mínimas das cepas padrão. ....	50
Tabela 8. Distribuição dos isolados de acordo com a CIM de anfotericina B. ...	51
Tabela 9. Distribuição dos isolados de acordo com a CIM de itraconazol. ....	52
Tabela 10. Distribuição dos isolados de acordo com a CIM de fluconazol.....	53

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1	<i>Candida</i> e microbiota oral	16
1.2	Candidíase bucal	17
1.4	Isolamento, quantificação e identificação	19
1.5	Produção de exoenzimas	22
1.6	Sensibilidade aos antifúngicos	26
2	OBJETIVOS	30
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	31
3.1	Casuística	31
3.2	Coleta do material	31
3.3	Isolamento e quantificação	31
3.4	Identificação	33
3.5	Pesquisa de fosfolipase	36
3.6	Pesquisa de proteinase	36
3.7	Determinação da sensibilidade aos antifúngicos	37
3.8	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Casuística	42
4.2	Quantificação de leveduras	42
4.3	Identificação das espécies	44
4.4	Distribuição das espécies entre os grupos	45
4.5	Aspectos clínicos da candidíase bucal e espécies envolvidas	46
4.6	Produção de exoenzimas	48
4.7	Teste de sensibilidade aos antifúngicos	50
4.7.1	Controle de qualidade	50
4.7.2	Anfotericina B	51

4.7.3	Itraconazol	52
4.7.4	Fluconazol	53
5	DISCUSSÃO	54
5.1	Quantificação de leveduras	54
5.2	Identificação de leveduras	55
5.3	Distribuição das espécies entre os grupos	56
5.4	Aspectos clínicos da candidíase bucal e espécies envolvidas	59
5.5	Produção de exoenzimas	64
5.6	Sensibilidade aos antifúngicos	68
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	ANEXOS	89
	APÊNDICES	90

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Candida* e microbiota oral

A colonização das superfícies externa e interna dos seres humanos inicia-se ao nascimento pela exposição a uma variedade de microrganismos presentes no ambiente e nos outros seres humanos. No entanto, cada superfície possui propriedades físicas e biológicas próprias, levando a aquisição e desenvolvimento natural de uma microflora diversificada e ao mesmo tempo característica de cada sítio anatômico, que normalmente convive em harmonia com o hospedeiro (MARSH e MARTIN, 1992). Entre os sítios anatômicos, a cavidade bucal é um dos mais populosos, e com o uso de métodos moleculares mais de 500 espécies de microrganismos já foram identificadas colonizando a superfície oral (TAKAHASHI, 2005). Os fungos constituem uma pequena parte desta microbiota, da qual a maior proporção é formada por leveduras do gênero *Candida* (MARSH e MARTIN, 1992; SIQUEIRA e BILGE, 2004).

A superfície oral colonizada por *Candida* é revestida pela saliva que participa da manutenção da saúde bucal através de suas propriedades umidificantes, lubrificantes, tamponantes e antimicrobianas (LEUNG et al, 2000), além de exercer um papel importante na regulação da aderência e na multiplicação das espécies de *Candida* na cavidade bucal (UETA et al, 2000). O dorso da língua é o reservatório primário do fungo, a partir do qual o restante da mucosa oral, gengivas, dentina, raiz, bolsas periodontais, placa bacteriana e saliva tornam-se colonizadas secundariamente (ARENDORF e WALKER,

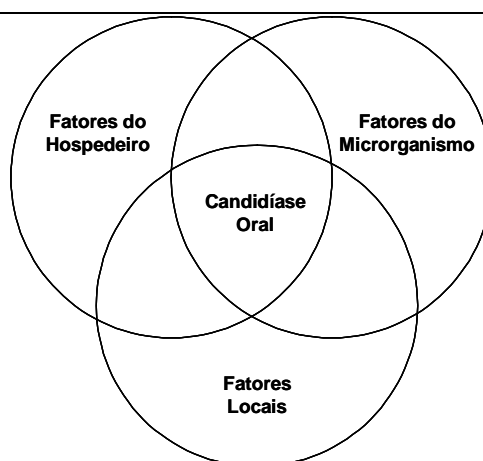


1980). Cerca de 27 espécies de *Candida* já foram isoladas da boca (MARSH e MARTIN, 1992). A prevalência de *Candida* como comensal na cavidade bucal de indivíduos saudáveis varia 20 a 75% (AKPAN e MORGAN, 2002; LYNCH, 1994). Contudo, podem tornar-se patógenos quando condições locais desfavoráveis associam-se a fatores predisponentes como: imunossupressão, xerostomia, uso de próteses, aparelhos ortodônticos, alterações endócrinas, discrasias sanguíneas, fatores mecânicos e iatrogênicos (CANNON et al, 1995; JORGE et al, 1997).

## 1.2 Candidíase bucal

A candidíase bucal é reconhecida como uma entidade clínica desde os tempos de Hipócrates no século IV a.C. (LYNCH, 1994). É uma infecção fúngica oportunista freqüente, causada por uma proliferação ou infecção da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*, observada principalmente na primeira infância, senescência e em pacientes imunocomprometidos (AKPAN e MORGAN, 2002; LYNCH, 1994). Acredita-se que a candidíase bucal inicia-se de leveduras comensais endógenas que habitam a cavidade oral (HOSSAIN et al, 2003). *C. albicans* é a espécie mais associada à lesão bucal, embora outras espécies como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* também possam ser encontradas (STENDERUP, 1990). Mais de 80% dos isolados de infecções clínicas são representados por *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (ODDS, 1988). Em indivíduos portadores do vírus HIV, a candidíase bucal tem sido relacionada com *C. dubliniensis* (FARAH et al, 2000), espécie recentemente descoberta e de potencial de virulência similar ao de *C. albicans* devido a semelhanças no genoma (SULLIVAN et al, 1995).

A manifestação da doença está relacionada a um conjunto de fatores locais, pelas condições de saúde do hospedeiro (FARAH et al, 2000) e características fenotípicas e genotípicas do microrganismo (SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2001) conforme esquematizado na figura 1. Os fatores locais relacionam-se aos estímulos mecânicos, térmicos e químicos sofridos pela cavidade bucal em decorrência dos atos fisiológicos a ela inerentes, de forma que a mesma está propensa a apresentar alterações decorrentes de modificações sistêmicas, sejam elas de fundo carencial, metabólico ou de outra natureza que poderão favorecer o desequilíbrio entre a população microbiana e o hospedeiro (LACAZ, 1980). Com relação ao hospedeiro, destaca-se a imunidade celular, de fundamental importância na defesa contra infecções por *Candida*. Fato observado com certa frequência nos casos de candidíase orofaríngea recorrente em pacientes HIV positivos com baixas contagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (FARAH et al, 2000). Os fatores do microrganismo estão relacionados a sua capacidade de adesão às células do hospedeiro, formação de hifas, plasticidade fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas, fosfolipases e proteases (HAYNES, 2001).



**Figura 1. Determinantes na susceptibilidade do hospedeiro a candidíase oral (adaptado de SAMARANAYAKE e MacFARLANE, 1990).**

A classificação da candidíase oral é difícil devido ao seu polimorfismo clínico. Atualmente tem sido disposta em duas categorias com base na distribuição das lesões: Categoria I ou candidíase oral primária que inclui infecções por *Candida* confinada aos tecidos orais (Quadro 1). Categoria II ou candidíase oral secundária que agrega desordens onde a candidíase oral é uma manifestação da infecção por *Candida* na forma mucocutânea, sistêmica ou generalizada (FARAH et al, 2000). Existem ainda, algumas lesões orais que estão claramente associadas à infecção por *Candida* sp, como a estomatite protética, queilite angular e glossite rombóide (REICHART et al, 2000), no entanto, outros microrganismos podem ser agentes etiológicos destas lesões (KULAK et al, 1997; PENHA et al, 2000).

Classificação	Tipo	Característica
Categoria I	Aguda	Pseudomembranosa Eritematosa
	Crônica	Pseudomembranosa Eritematosa Hiperplásica

**Quadro 1. Categoria I da candidíase oral (adaptado de FARAH et al, 2000).**

#### **1.4 Isolamento, quantificação e identificação**

O isolamento de *Candida* da cavidade bucal pode ser realizado através de esfregaço, *swab*, bochecho, cultura por *imprint*, coleta da saliva total e biópsia da mucosa, todavia a escolha da técnica deve ser direcionada pelo tipo de lesão a ser investigado, pois cada técnica apresenta vantagens e desvantagens (WILLIAMS e LEWIS, 2000) demonstradas no quadro 2.

<i>Método</i>	<i>Quantitativo</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>
<i>Imprint</i>	Sim	Indica o local de infecção e diferencia carreador de infecção	Uso difícil quando não há lesões bem definidas
Bochecho	Sim	Quantifica outros microrganismos	Não indica o local da infecção
<i>Swab</i>	Não	Prático	Pode remover a superfície epitelial
Saliva total	Sim	Sensível para detectar carreadores	O tempo necessário para a coleta pode ser demorado
Biópsia	Não	Permite o diagnóstico da forma hiperplásica	Invasiva
Esfregaço	Não	Amplamente utilizada, demonstra a presença de hifas	Menos sensível que as outras técnicas

**Quadro 2. Técnicas de coleta na cavidade oral para o isolamento de *Candida* (adaptado de WILLIAMS e LEWIS, 2000).**

A quantificação de leveduras pode ser um marcador útil do estado de infecção. Epstein et al (1980) mostrou diferenças significativas entre a contagem de colônias na saliva de carreadores e de pacientes com candidíase crônica ou aguda, indicando que estes podem ser distinguidos com um limite de confiança de 95% baseado na quantificação de cultura de *Candida*. Dados recentes indicam que portadores da levedura geralmente apresentam contagem de colônias inferiores a 1.000 UFC/mL, enquanto indivíduos com a infecção tendem a manifestar os sinais clínicos da candidíase oral e apresentar contagens superiores a 4.000 UFC/mL (FARAH et al, 2000).

O gênero *Candida* pertence à família *Deuteromycetes*, engloba cerca de 200 espécies, que se reproduzem assexuadamente por brotamento,

apresentam capacidades assimilatórias, oxidativas e fermentativas que permitem a utilização de várias substâncias orgânicas (KURTZMAN e FELL, 1998; SIDRIM e ROCHA, 2004). Constituem microbiota da cavidade oral, trato gastrintestinal, ânus, virilha, canal vaginal e vulva de pessoas saudáveis (LACAZ, 1980). Sete espécies são reconhecidamente agentes de processos patológicos: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*. (CANNON et al, 1995; McCULLOUGH et al, 1996). Tradicionalmente são identificadas através de características morfológicas e fisiológicas, através das provas bioquímicas e de exigências nutricionais (LACAZ et al, 1991).

A necessidade de identificação rápida de patógenos estimulou o desenvolvimento de meios diferenciais e de painéis manuais, automatizados de identificação. Os meios diferenciais contêm substâncias indicadoras para identificação presuntiva destas leveduras, uma vez que, o ágar Sabouraud dextrose, meio mais empregado no isolamento primário, dificulta a detecção de diferentes espécies de leveduras quando presentes em uma única amostra (ODDS e BERNAERTS, 1994). Entre os meios diferenciais estão disponíveis o Biggy ágar que contém sulfito de bismuto, o Pagano Levin com 2,3,5 cloreto de trifeniltetrazólico, os meios de fluorogênicos como o Fluoroplate Candida (Merck, Alemanha) e SDCA-MUAG ágar (Biolife, Itália) cujo produto é revelado com luz ultravioleta, e meios cromogênicos como Albicans ID<sup>®</sup> (bioMérieux, França), Candiselect<sup>®</sup> (Sanofi Diagnostics Pasteur, França) e o CHROMagar<sup>®</sup> Candida (Paris, França) que são baseados na formação de colônias coloridas resultantes da quebra do substrato cromogênico pela enzima espécie-

específica (FREYDIÈRE e GUINET, 1997). Dentre os meios cromogênicos disponíveis o CHROMagar® Candida é um meio fácil e confiável na identificação presuntiva das espécies de *Candida* mais comuns (YÜCESOY e MAROL, 2003). A identificação de leveduras utilizando painéis manuais e automatizados é realizada através da capacidade assimilativa em substratos bioquímicos e enzimáticos. Esses métodos são de fácil realização e interpretação, oferecendo resultado em curto período de tempo, como o API 20C AUX (bioMérieux, França), Fongiscreen (Sanofi Diagnostics Pasteur, França), RapID yeast plus system (Inovative Diagnostic Systems, EUA) entre outros (FREYDIÈRE e GUINET, 1997).

### **1.5 Produção de exoenzimas**

O amplo espectro da candidíase e sua importância clínica estimularam o interesse pela compreensão dos mecanismos de patogenicidade e identificação dos seus fatores de virulência. Entre os poucos fatores diretamente relacionados à virulência de leveduras do gênero *Candida* está a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, fosfolipase e proteinase (DE BERNARDIS et al, 2001; NAGLIK et al, 2003). A produção das enzimas hidrolíticas faz parte do metabolismo fúngico (KUROGAWA, 1998), entretanto alguns microrganismos, como *C. albicans*, adaptaram esta propriedade bioquímica para realizar funções especializadas durante o processo de infecção em humanos, animais e plantas (NAGLIK et al, 2004).

A produção das exoenzimas no laboratório geralmente é avaliada através de uma unidade denominada de PZ (zona de precipitação) que é a razão entre o diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja,  $PZ = dc/dcp$ . A amostra produtora da enzima forma um halo ao redor do inóculo. De acordo com esse sistema a atividade enzimática é considerada alta quando PZ é  $\leq 0,63$ , moderada no intervalo  $0,64 \leq PZ \leq 0,99$  e quando PZ é igual 1 a amostra não apresentou atividade da enzima pesquisada (PRICE et al, 1982).

O termo fosfolipases refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas que dividem a habilidade de hidrolisar um ou mais éster ligado a glicerofosfolipídios. Embora o substrato de todas as fosfolipases sejam os fosfolipídios, cada enzima tem a capacidade de quebrar uma ligação éster específico. Desta maneira, a classificação por letras A, B, C e D são utilizadas para diferenciar as fosfolipases e indicar a ligação éster alvo na molécula de fosfolipídio. Muitos estudos têm considerado as fosfolipases como um importante fator de virulência em protozoários, bactérias e fungos (GHANNOUM, 2000). A produção de fosfolipases em grandes quantidades está relacionada a um alto grau de patogenicidade, aumento da aderência às células do hospedeiro e elevado percentual de mortalidade em modelos animais (IVANOVSKA, 2003).

A produção de fosfolipase no gênero *Candida* parece estar restrita a *C. albicans* (IBRAHIM et al, 1995), que nesta espécie está localizada na superfície da levedura, na extremidade do tubo germinativo (OLIVEIRA et al, 1998). A triagem de 41 isolados de *Candida* para a produção de fosfolipase

utilizando o ensaio em placa com ágar gema de ovo, demonstrou que 79% dos isolados de *C. albicans* apresentavam atividade enzimática, enquanto que nenhum dos isolados de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* mostraram atividade da enzima fosfolipase (SAMARANAYAKE et al, 1984). Recentemente, a pesquisa da fosfolipase foi realizada em 87 isolados clínicos de *C. dubliniensis*, por Fotedar e Al-Hedaithy (2005), após 7 dias de incubação no meio ágar fosfolipase, e os pesquisadores verificaram ausência do halo opaco ao redor das colônias, que caracteriza  $Pz = 1$ , ou seja, negativo para a atividade da enzima.

Em amostras de *C. albicans* isoladas a partir do biofilme de próteses dentais, Candido (2000) observou que em 77% delas a enzima fosfolipase foi produzida em diferentes níveis de atividade. KURNATOWSKA (1998) verificou que todos os isolados de *C. albicans* de pacientes com estomatite protética apresentaram alta atividade ( $PZ \leq 0,63$ ) da enzima fosfolipase. Essa atividade elevada também foi observada por Ibrahim et al (1995), quando compararam o nível de atividade da fosfolipase entre isolados de *C. albicans* da corrente sanguínea com os de isolados comensais. A atividade desta enzima foi maior entre as amostras de *C. albicans* isoladas da boca de pacientes com AIDS do que daquelas isoladas de pacientes clinicamente saudáveis (SILVA, 1999). Todos os 239 isolados de *C. albicans* da cavidade oral e vaginal de mulheres HIV positivo e negativo foram produtores da fosfolipase, no entanto o nível da atividade nos isolados das mulheres HIV positivo foi maior que nos isolados das mulheres HIV negativo (RIBEIRO et al, 2004).



As proteinases são classificadas com base em seu mecanismo catalítico em quatro classes: serinas, cisteínas, aspárticas e metalo proteinases (MONOD et al, 2002; NAGLIK et al, 2004). As proteinases aspárticas são isoladas de várias espécies fúngicas. No gênero *Candida* a proteinase é secretada predominantemente por *C. albicans* embora genes homólogos tenham sido identificados em outras espécies de *Candida* (HAYNES, 2001). Além de *C. albicans* e *C. tropicalis*, alguns isolados de *C. parapsilosis*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae* e *C. lipolytica* produzem proteases em condições de cultura, contudo, sua secreção *in vivo* é questionável (HOEGL et al, 1996). As proteinases produzidas por diferentes espécies de *Candida* são capazes de degradar vários substratos, tais como: queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular (OLIVEIRA et al, 1998; PICHOVÁ et al, 2001). A produção de proteases está associada à habilidade para aderir e colonizar tecidos do hospedeiro e parece estar envolvida na invasão e destruição tecidual (MCMULLAN-VOGEL et al, 1999). Foi demonstrado que isolados de *C. albicans* de pacientes com candidíase vulvovaginal são significativamente mais proteolíticos que os de portadoras saudáveis (CASSONE et al, 1987). Com relação a candidíase oral, o papel das proteinases no processo da doença permanece pouco conhecido (KURIYAMA et al, 2003).

Silva (1999) analisando amostras de leveduras isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS e de um grupo de indivíduos clinicamente saudáveis, observou que todas as amostras estudadas, independentemente do grupo, apresentavam forte atividade proteolítica, com PZ variando de 0,11 a 0,60, sem

diferença estatística entre os grupos. A alta atividade da enzima proteinase (PZ  $\leq$  0,63) também foi observada por Penha et al (2000) em isolados orais de *C. albicans* de pacientes totalmente desdentados, com estomatite protética.

## 1.6 Sensibilidade aos antifúngicos

O aumento da candidíase e sua incidência em associação a pacientes imunocomprometidos, a indiscriminação no uso de antibacterianos de amplo espectro, a habilidade em manter por mais tempo pacientes da unidade de terapia intensiva, bem como, a resistência às drogas antifúngicas por alguns isolados de *Candida*, aumentaram a necessidade e ressaltaram a importância do uso de testes de sensibilidade a antifúngicos, objetivando prognosticar a resposta clínica, ou pelo menos, prevenir o fracasso da terapêutica (HOSPENTHAL et al, 2004; WROBLEWSKA et al, 2002).

Nos últimos anos, as metodologias para a realização de testes de sensibilidade aos antifúngicos vêm sendo desenvolvidas gradativamente, estimuladas pelo surgimento dos fármacos azólicos e o aparecimento de fungos resistentes *in vivo* e *in vitro*, frente aos principais antifúngicos disponíveis no mercado (HOFFMAN e PFALLER, 2001). O documento M27-A2 (NCCLS, 2002) descreve a metodologia e a interpretação dos testes de sensibilidade aos antifúngicos para *Candida* sp. A padronização do teste *in vitro* foi realizada em relação às variáveis: tamanho do inóculo, composição do meio, temperatura, tempo de incubação e determinação do ponto final da concentração inibitória mínima (CIM). Este documento preconiza o método de

macrodiluição em caldo como padrão, bem como recomenda o método da microdiluição em caldo como igualmente eficiente (NCCLS, 2002; HOFFMAN e PFALLER, 2001).

A anfotericina B é um antifúngico da classe dos polienos, considerada padrão ouro para o tratamento de infecções fúngicas disseminadas (UZUN, 2000, CANTÓN et al, 2003), sua atividade fungicida já foi verificada *in vitro* e *in vivo* contra leveduras, fungos filamentosos e dimórficos (WHITE et al, 1998). Este antifúngico interage com os esteróis da membrana plasmática, em particular o ergosterol, ocasionando o desenvolvimento de poros ou canais, que levam a perda de potássio e outros constituintes citoplasmáticos, culminando com a morte celular (ROGERS, 2002). A resistência a anfotericina B é rara (ESPINEL-INGROFF, 2000), contudo tem crescido paralelamente com o aumento no número de infecções invasivas causadas por fungos emergentes (CANUTO e RODERO, 2002).

Os azóis, fluconazol e itraconazol, também atuam na biossíntese do ergosterol através da inibição do citocromo P-450 dependente da enzima 14  $\alpha$ - demetilase do lanosterol (ROGERS, 2002). São amplamente utilizados no tratamento de micoses localizadas e sistêmicas, por oferecer administração via oral ou intravenosa e menor toxicidade em relação aos antifúngicos polienos (WROBLESKA et al, 2002). A resistência clínica da candidíase oral ao fluconazol foi definida como a persistência de lesões orofaríngeas depois de pelo menos 7 dias de tratamento com fluconazol, em dose mínima de 100 mg/dia e o isolamento de numerosas UFC/mL de *Candida* sp. Logo que o

fluconazol começou a ser utilizado na prática clínica todas as cepas apresentavam CIM menor que 1µg/mL (HOELPMAN e DUPONT, 1996).

Pelo teste de microdiluição em caldo, Waltimo et al (2000) testaram 70 isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com periodontite apical e marginal que não responderam ao tratamento e verificaram que todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B e a 5-fluorocitosina e para os azóis, o intervalo da CIM foi variado, 14% das amostras foram resistentes ao fluconazol e destas 2 apresentaram resistência cruzada ao miconazol e ao clotrimazol. Utilizando a mesma metodologia, Uzun et al (2000) observaram que os isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* foram mais resistentes ao itraconazol, voriconazol e fluconazol que os isolados de outras espécies em um estudo de sensibilidade com 242 isolados clínicos de *Candida* provenientes de diversos sítios anatômicos de pacientes hospitalizados.

Blignault et al (2002) avaliaram 466 amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV positivos e de indivíduos saudáveis quanto à sensibilidade aos antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo. Observaram que todos os isolados foram sensíveis ao fluconazol. Haberland-Carrodegas et al (2002) obtiveram resultados semelhantes na avaliação da prevalência de *C. albicans* resistentes ao fluconazol em pacientes imunocompetentes com sinais clínicos de candidíase oral utilizando a mesma metodologia.

Magaldi et al (2004) realizaram estudo com 158 isolados clínicos de *Candida* sp de sítios anatômicos variados com o objetivo de verificar a concordância entre os valores de CIM obtidas pelo método de difusão e microdiluição em caldo frente a diversos antifúngicos. Foram identificadas 108 *C. albicans*, 30 *C. glabrata*, 7 *C. tropicalis* e 4 *C. krusei* entre os isolados utilizados no trabalho. As CIM obtidas pelo método de microdiluição em caldo demonstraram que 15% dos isolados de *C. albicans*, 20% *C. glabrata*, 86% *C. tropicalis* e 100% *C. krusei* foram resistentes ao fluconazol. Com o itraconazol a resistência foi verificada em 21% de *C. albicans*, 37% *C. glabrata*, 86% *C. tropicalis* e 100% de *C. krusei*. Todos os isolados de *C. tropicalis* e *C. krusei* foram sensíveis à anfotericina B. Dois isolados de *C. albicans* e um de *C. glabrata* foram resistentes in vitro à este antifúngico.

Kuriyama et al (2005) verificaram a sensibilidade aos antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo de 618 isolados clínicos de *Candida*, obtidos de 553 pacientes com doenças orais variadas. A maioria das amostras foi sensível aos antifúngicos testados, no entanto foi observada resistência a anfotericina B, itraconazol e fluconazol entre as cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* em diferentes taxas.

Diante do exposto, observa-se que a literatura brasileira não possui muitos registros acerca da epidemiologia, microbiologia e perfil de sensibilidade dos isolados de candidíase oral em pacientes imunocompetentes. A partir dos fatos apresentados surgiram os objetivos dessa investigação.

## 2 OBJETIVOS

1. Comparar a quantificação de UFC/mL em amostras de saliva de pacientes com e sem lesão bucal.
2. Avaliar a prevalência do isolamento de espécies de *Candida* da cavidade bucal de pacientes com e sem lesão bucal.
3. Avaliar a prevalência dos diferentes tipos de lesão em pacientes com sinais clínicos de candidíase bucal, bem como a relação da espécie de levedura com os tipos de lesões bucais.
4. Verificar a produção das enzimas fosfolipase e proteinase das leveduras isoladas de pacientes com e sem lesão bucal.
5. Analisar a concentração inibitória mínima para os antifúngicos: anfotericina B, itraconazol e fluconazol frente às leveduras isoladas de pacientes com e sem lesão bucal.

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP – USP (Anexo 1). Foram avaliados 100 indivíduos adultos, de ambos os sexos, com lesão bucal suspeita de candidíase, independente do nível cultural, social ou econômico entre os pacientes atendidos na FORP – USP, e 50 voluntários sem lesão no momento da coleta, representados por universitários, funcionários da saúde e pessoas diretamente ligadas a eles, maiores de 18 anos, de ambos os sexos, que constituíram o grupo controle.

#### **3.2 Coleta do material**

Foi coletado aproximadamente 2,0 mL de saliva não estimulada em tubo de ensaio 25 x 150 mm esterilizado, contendo pérolas de vidro, que foi imediatamente transportado ao Laboratório de Micologia Clínica – FCFRP-USP.

#### **3.3 Isolamento e quantificação**

As amostras foram submetidas à agitação até a obtenção de uma suspensão uniforme sem a presença de espuma. Em seguida foram efetuadas diluições decimais seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) em solução fisiológica (NaCl 0,85%) estéril. Alíquotas de 100  $\mu$ L da saliva pura e da diluição  $10^{-3}$  foram depositadas

no centro de placas de petri 90 x 90 mm contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e 100  $\mu$ L das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  foram depositadas em placa de petri contendo CHROMagar<sup>®</sup> Candida (Paris, França) seguidas de semeadura com auxílio de bastão de vidro, em forma de L esterilizado e posteriormente incubadas a 37°C durante 7 dias, com observações diárias, conforme esquematizado na figura 2. As colônias com morfologia características em ambos os meios foram contadas e o resultado expresso em unidades formadoras de colônia por mililitro de saliva (UFC/mL).

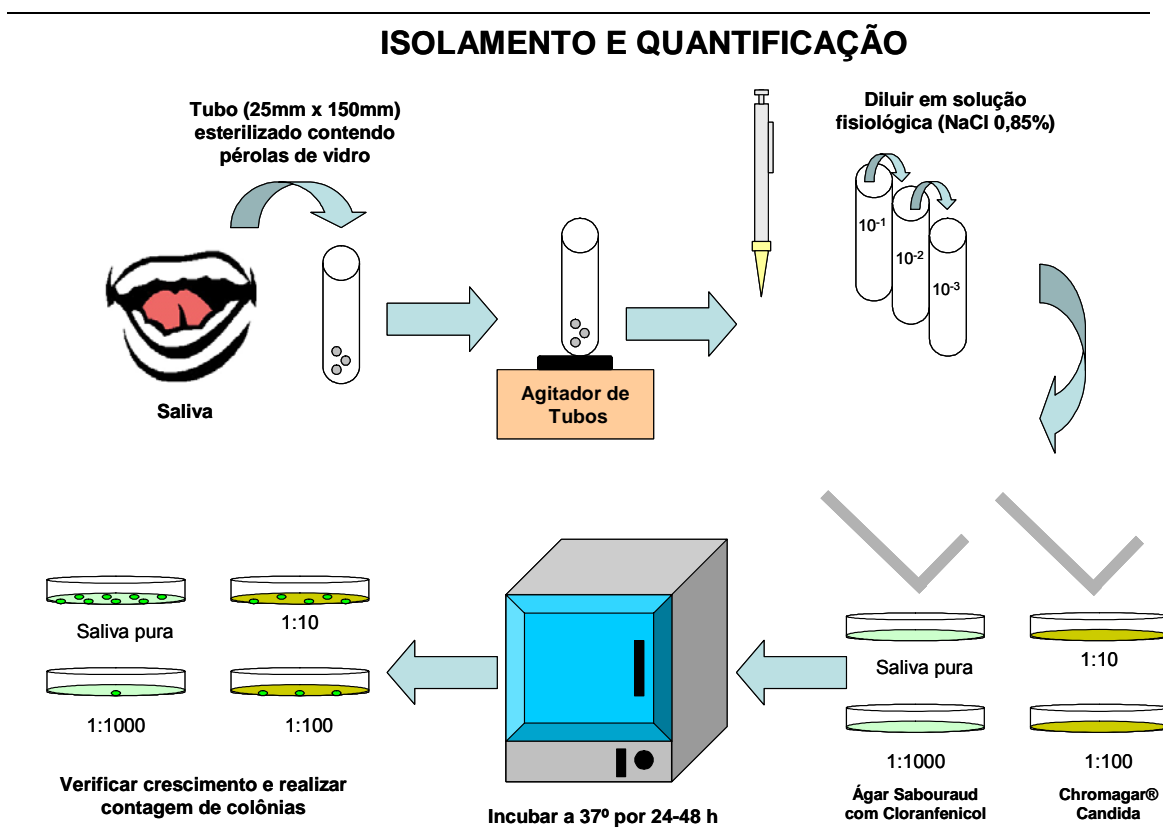


Figura 2. Fluxograma da metodologia: isolamento e quantificação.



### 3.4 Identificação

Depois de confirmada a pureza da colônia realizou-se a identificação de acordo com a metodologia clássica (SIDRIM e ROCHA, 2004), empregando-se as seguintes provas: formação do tubo germinativo em soro humano, estudo da micromorfologia em ágar fubá acrescido de *tween-80*, assimilação de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, fermentação de carboidratos e crescimento a 37°C e 42°C.

#### *Formação do tubo germinativo em soro humano:*

Inóculos de leveduras foram suspensos em 500 µL de soro humano, procedente do Laboratório de Análises Clínicas da FCFRP-USP, e incubados a 37°C em banho-maria durante 3 horas. Em seguida uma gota da suspensão foi colocada em lâmina e recoberta com lamínula para pesquisa de tubo germinativo característico de *C. albicans*.

#### *Estudo da micromorfologia:*

O meio de ágar fubá acrescido de *tween-80* foi fundido e resfriado à aproximadamente 50°C e cerca de 3 mL do meio foi depositado sobre lâmina contida em uma placa de microcultivo até obtenção de uma camada espessa. Após a solidificação, foram feitas três estrias retas na superfície do meio, em seguida o inóculo foi coberto com lamínula esterilizada e incubado em câmara úmida a 30°C durante 72-96 horas. Após esse período a lâmina foi examinada ao microscópio óptico em objetiva de 40X, com o intuito de se observar as seguintes estruturas: células leveduriformes, pseudomicélio, micélio, clamidósporos.

*Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma):*

Foram preparados 5 mL de suspensão de leveduras (cultura de 24 horas) em tubo de ensaio com água destilada estéril e 50 µL de extrato de levedura a 10%, com turvação correspondente ao padrão 2 da escala de McFarland. A seguir, aproximadamente 1,5 mL da suspensão foi transferido para cada tubo de ensaio contendo 18 mL de meio isento de fontes de carbono (meio C), previamente fundido e mantido a aproximadamente 50°C. Em seguida, após homogeneização, o meio foi vertido em placa de petri esterilizada e após solidificação, alíquotas com aproximadamente 20 mg de diferentes carboidratos foram depositadas em pontos eqüidistantes da referência previamente marcada na parte externa da base das placas. Foram utilizados os seguintes carboidratos: glicose, maltose, sacarose, lactose, celobiose, rafinose, ramnose, trealose, melibiose.

Para assimilação de fontes de nitrogênio, 1 mL da suspensão foi transferido para tubo de ensaio contendo 18 mL do meio N (isento de fontes de nitrogênio), previamente fundido e esfriado à aproximadamente 50°C. Após distribuição e solidificação, alíquotas de cerca de 20 mg das substâncias nitrogenadas (peptona e nitrato de potássio) foram depositadas em pontos eqüidistantes da referência previamente marcada na parte externa da base da placa.

As provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio foram consideradas positivas quando houve formação de um halo de crescimento ao

redor do ponto de aplicação do carboidrato ou da fonte de nitrogênio, e negativa na ausência desse halo após 48-72 horas de incubação a 30°C.

*Fermentação de carboidratos (zimograma):*

Foram avaliadas a fermentação da glicose, maltose, sacarose e lactose. As leveduras foram semeadas em tubos de ensaio contendo o respectivo carboidrato e tubo de Durhan em posição invertida para a captação de gás. Os tubos foram incubados a 37°C durante 30 dias, com observações diárias. O resultado foi considerado positivo quando houve a formação de bolhas de gás retidas no tubo de Durhan.

*Hidrólise da uréia:*

Foram semeadas estrias sobre a superfície do ágar uréia de Christensen. Posteriormente os tubos foram incubados a 37°C, com observação diária durante 48-72 horas. A produção de urease foi constatada pela viragem da cor do indicador vermelho de fenol de amarelo para vermelho, devido à alcalinização do meio de cultura.

*Crescimento a 37°C e 42°C:*

Alíquotas de 5 µL de suspensão da levedura em solução fisiológica 0,85% com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland, foram depositadas em placas de ágar Sabouraud dextrose. Cada placa contendo 10 inóculos de diferentes cultivos foi incubada a 37°C e 42°C por 48 horas.

### 3.5 **Pesquisa de fosfolipase** (PRICE et al, 1982)

Alíquotas de 5 µL de suspensão da levedura em solução fisiológica 0,85% com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland, foram depositadas em pontos eqüidistantes no meio ágar fosfolipase (Apêndice C). As placas, contendo cinco inóculos de diferentes cultivos, foram incubadas durante 4 dias a 37°C. O teste foi realizado em duplicata. As amostras produtoras de fosfolipase formam uma zona opaca ao redor do inóculo. A atividade da fosfolipase (PZ), foi avaliada de acordo com a técnica de Price et al (1982), onde PZ é a razão entre o diâmetro da colônia (dc) pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja,  $PZ = dc/dcp$ . De acordo com esse sistema, quanto menor o PZ maior a atividade enzimática da amostra. Assim, quando  $PZ \leq 0,63$  a atividade enzimática é considerada alta, no intervalo de  $0,64 \leq PZ \leq 0,99$  moderada e quando  $PZ = 1$  a amostra não apresentou atividade enzimática.

### 3.6 **Pesquisa de proteinase** (RÜCHEL et al, 1982)

Alíquotas de 5 µL de suspensão da levedura em solução fisiológica 0,85% com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland, foram depositados em pontos eqüidistantes no meio ágar proteinase (Apêndice C). Em cada placa foram depositadas suspensões de 5 inóculos diferentes. O teste foi realizado em duplicata e as placas incubadas a 37°C durante 7 dias. A presença da enzima foi observada pela formação de um halo de hidrólise translúcido ao redor da colônia de levedura e a atividade enzimática medida pelo valor de PZ conforme descrito para o ensaio da enzima fosfolipase.

### **3.7 Determinação da sensibilidade aos antifúngicos**

As leveduras isoladas e as cepas padrão foram avaliadas quanto à sensibilidade aos antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo, realizada de acordo com a padronização publicada no documento M27-A2 pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002), atualmente denominado de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

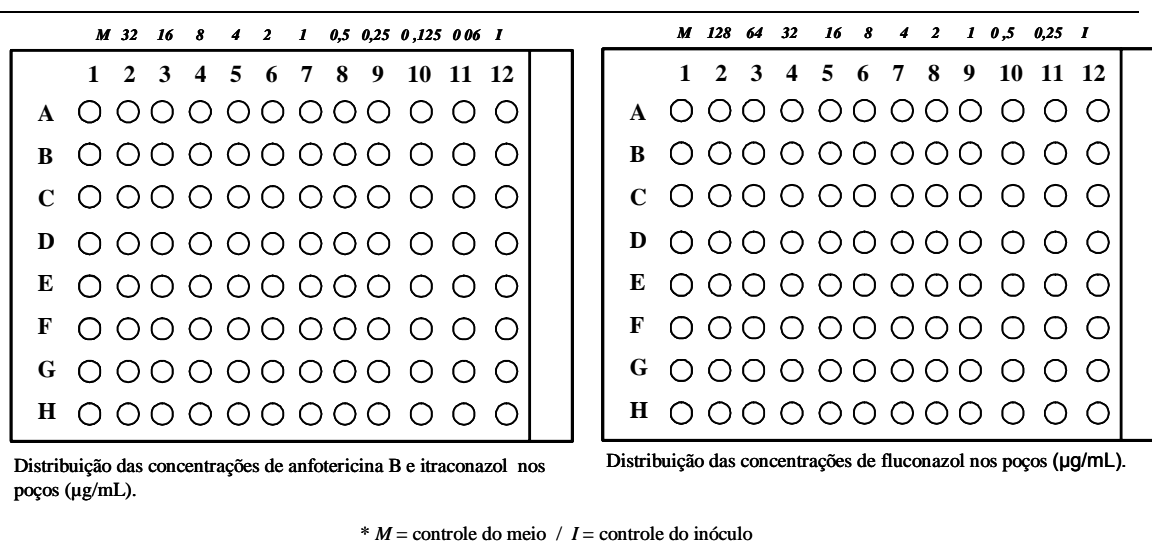
#### *Antifúngicos*

Foram utilizados os antifúngicos: anfotericina B (Fungizon, Bristol Myers Squibb do Brasil), fluconazol (Pfizer, Sandwich, Reino Unido) e itraconazol (Janssen, Beerse, Bélgica). As soluções-estoque foram preparadas a partir de suas respectivas formas em pó diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, RJ, Brasil) na concentração de 1.600 µg/mL para o itraconazol e anfotericina B, e em água destilada na concentração de 1.280 µg/mL para o fluconazol. Estas soluções-estoque foram mantidas em tubos tipo *ependorff* em volumes de 2 mL, à temperatura de -20°C por até 30 dias, para posterior diluição.

#### *Diluições dos antifúngicos*

A partir da solução estoque de cada droga foram preparadas as soluções-teste diluídas em RPMI-1640 a fim de se obter duas vezes a concentração final desejada: anfotericina B, 32 a 0,06 µg/mL; fluconazol, 128 a 0,25 µg/mL e itraconazol, 32 a 0,06 µg/mL (Apêndice A e B). Em seguida volumes de 100 µL de cada diluição foram dispensados em seqüência em placas de 96 poços, de fundo chato, estéreis, com auxílio de pipeta multicanal, permitindo que os poços identificados de número 02 a 11 apresentassem as

dez diferentes concentrações de forma decrescente (Figura 3). As placas foram estocadas à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  por até 30 dias.



**Figura 3. Fluxograma microdiluição: distribuição das drogas nas microplacas.**

#### *Meio de cultivo*

O meio de cultivo utilizado foi o meio líquido RPMI-1640 GIBCO BRL<sup>®</sup> (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado com 20 g/L de glicose e tamponado com MOPS 0,165 mol/L a pH 7,0.

#### *Inóculo*

A suspensão inicial do inóculo foi preparada em água deionizada esterilizada, equivalente à escala 0,5 de McFarland, utilizando-se colônias de 24 horas. A seguir foi ajustada através de contagem de células em câmara de Neubauer (Brand, Alemanha), para obtenção de um inóculo de concentração igual  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL. A viabilidade e a pureza do inóculo foram controladas por cultivos de alíquotas da suspensão em placas de ágar Sabouraud dextrose,

incubadas a 37°C durante 48 horas (Figura 4). As cepas padrão utilizadas foram *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258.

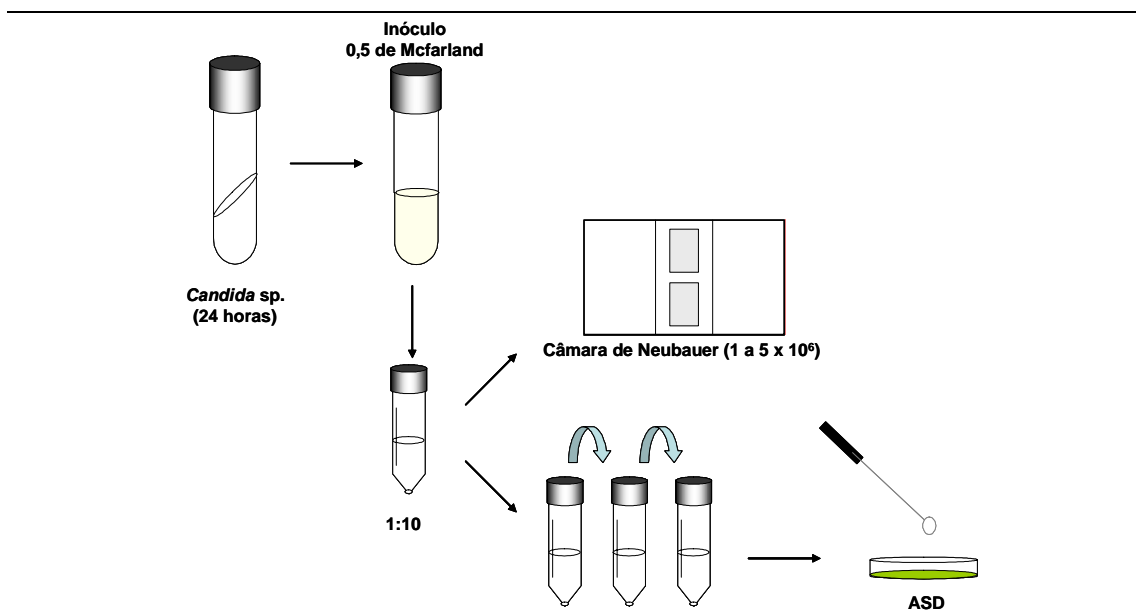


Figura 4. Fluxograma microdiluição: preparação do inóculo.

#### *Diluição em caldo em placa de microdiluição:*

No dia do experimento, as placas contendo os antifúngicos foram retiradas do freezer e mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente. A suspensão inicial de cada microrganismo foi diluída 1:1000 em RPMI-1640 para obtenção de uma suspensão-trabalho com o dobro da concentração final desejada. Alíquotas de 100 µL da suspensão-trabalho foram depositadas nos poços das colunas de 2 a 11 e 200 µL nos poços pertencentes a coluna 12 que foi utilizada como controle do inóculo ou positivo. Os poços da coluna 1 foram utilizados como controle do meio ou negativo, sendo neles depositados 200 µL do meio RPMI-1640. As cepas controle receberam tratamento idêntico e foram utilizadas para cada lote de diluição de antifúngicos. As microplacas foram incubadas a 35°C, durante 48 horas. A leitura foi realizada visualmente,

comparando-se o crescimento no poço número 12 (controle do inóculo) com os demais poços referentes as diferentes concentrações da droga.

*Interpretação dos Resultados:*

Para os ensaios com azólicos, a menor concentração capaz de induzir inibição em torno de 50% do crescimento verificado no microrganismo avaliado, em relação ao poço controle, foi identificada como concentração inibitória mínima – CIM da droga para este microrganismo. Para a anfotericina B a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir qualquer crescimento visivelmente detectável. Os pontos de corte adotados para fluconazol e itraconazol foram os sugeridos pelo NCCLS. Quanto a anfotericina B os valores ainda não estão definidos, desta forma foram adotados na presente pesquisa os valores sugeridos por Ellis (2002), conforme quadro 4.

Antifúngico	Sensível ( $\mu\text{g/mL}$ )	S-DD* ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resistente ( $\mu\text{g/mL}$ )
Fluconazol	$\leq 8$	16-32	$\geq 64$
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	$\geq 1$
Anfotericina B	$\leq 2$	-	$\geq 4$

**Quadro 3. Diretrizes para a interpretação dos testes de sensibilidade *in vitro* para as espécies de *Candida*. \*S-DD: sensibilidade dose-dependente.**



### **3.8 Análise estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 3.0. Os resultados obtidos no grupo com lesões e no grupo controle foram comparados através do teste paramétrico *t* de Student para quantificação e pesquisa de exoenzimas e do teste não paramétrico de Mann-Whitney para a sensibilidade aos antifúngicos, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Para verificar se havia diferença na quantificação entre os tipos de lesões observados foi aplicado o teste ANOVA.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Casuística

#### **Grupo Controle**

Constituíram o grupo controle 50 indivíduos voluntários, sem apresentar nenhum tipo de lesão clínica na cavidade bucal, sendo 20 do sexo masculino e 30 do feminino com idade entre 20 – 45 anos.

#### **Grupo com lesão**

Foram avaliados 100 pacientes voluntários atendidos na FORP – USP apresentando sinais clínicos de candidíase oral. Destes, 29 foram do sexo masculino e 71 do feminino com idade entre 30 – 75 anos. As lesões clínicas observadas foram: pseudomembranosa, hiperplásica, estomatite protética, eritematosa e queilite angular.

### 4.2 Quantificação de leveduras

Das 100 amostras de saliva do grupo com lesão, 70 (70%) apresentaram crescimento de leveduras, destas 39 (55,7%) mostraram contagens superiores a 4.000 UFC/mL e 31 (44,3%) exibiram contagens entre 1.000 a 4.000 UFC/mL. Das 50 amostras que foram analisadas no grupo controle, 16 (32%) mostraram crescimento de leveduras. As contagens de colônias ficaram abaixo de 1.000 UFC/mL para 12 (75%) amostras e entre 1.000 a 4.000 UFC/mL para 4 (25%) amostras (Tabela 1). De acordo com o teste *t* Student, a quantificação foi estatisticamente significativa entre o grupo com lesão e o controle ( $p < 0,05$ ),

entretanto o teste ANOVA não revelou diferença estatisticamente significativa entre os tipos de lesão em relação ao número de UFC/mL.

**Tabela 1. Distribuição das contagens de leveduras em relação ao tipo de lesão e ao grupo controle.**

<i>Tipo de lesão</i>	<i>Quantificação (UFC/mL)</i>			<i>amostras positivas</i>
	<i>&lt; 1.000</i>	<i>1.000 ≤UFC≤ 4.000</i>	<i>&gt; 4.000</i>	
Estomatite protética + queilite angular	00	02	04	06
Estomatite protética	00	18	22	40
Pseudomembranosa	00	08	08	16
Queilite angular	00	02	03	05
Eritematosa	00	01	02	03
Hiperplásica	00	00	00	00
Grupo controle	12	04	00	16

### 4.3 Identificação das espécies

Foram isoladas e identificadas 77 *C. albicans* e 19 *C. tropicalis*, nos grupos estudados, incluindo as culturas mistas. Todas as leveduras foram presuntivamente identificadas no meio CHROMagar® Candida no isolamento primário (Figura 5) e posteriormente confirmadas pela metodologia clássica (Apêndice F). As colônias de coloração verde e azul metálica foram presuntivamente identificadas como *C. albicans* e *C. tropicalis* respectivamente. Não foram observadas colônias de outra coloração. Todas as amostras de *C. albicans* produziram tubo germinativo, clamidósporos globosos, terminais, de parede celular espessa e cresceram a 42°C. Os isolados de *C. tropicalis* foram identificados pelos testes de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e de fermentação dos carboidratos (Apêndice F).

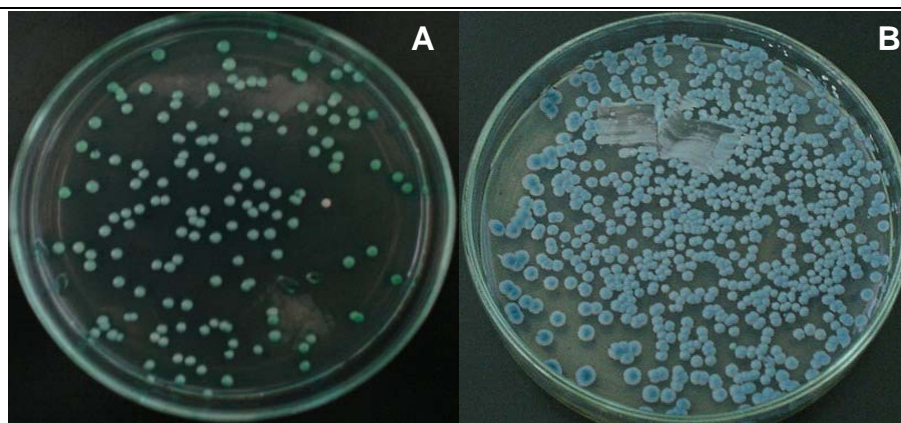


Figura 5. *C. albicans* (A) e *C. tropicalis* (B) em CHROMagar® Candida.

#### 4.4 Distribuição das espécies entre os grupos

No grupo controle 16 (32%) amostras foram positivas para a pesquisa de leveduras, com uma cultura mista perfazendo 17 isolados, identificados como *C. albicans* (14) e *C. tropicalis* (3). No grupo com lesão, foram positivas 70 (70%) amostras, em 09 (12,9%) delas ocorreram culturas mistas, totalizando 79 isolados, identificados como *C. albicans* (63) e *C. tropicalis* (16) conforme tabela 2.

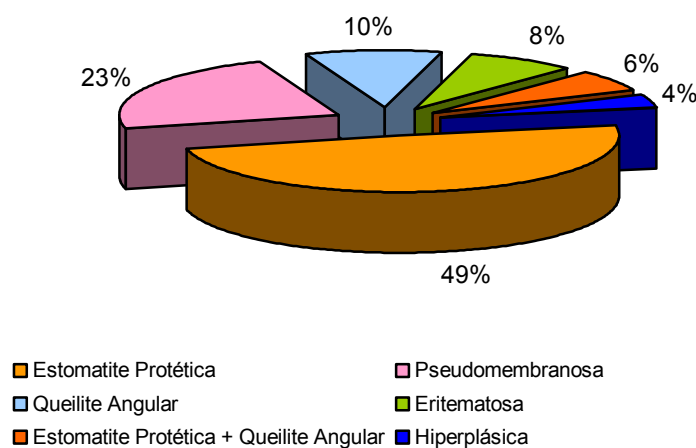
**Tabela 2. Distribuição das espécies de leveduras de acordo com o grupo estudado.**

Espécie	Grupo com lesão *		Grupo controle °	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)
<i>C. albicans</i>	54	(77,1)	13	(81,2)
<i>C. tropicalis</i>	07	(10,0)	02	(12,5)
<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>	09	(12,9)	01	(6,3)

\* *n* = 70; ° *n* = 16; % em relação ao *n*.

#### 4.5 Aspectos clínicos da candidíase bucal e espécies envolvidas

Os tipos de lesões observados entre os 100 pacientes com sinais clínicos sugestivos de candidíase bucal foram: estomatite protética (49%), pseudomembranosa (23%), queilite angular (10%), eritematosa (8%), estomatite protética associada a queilite angular (6%) e hiperplásica (4%) conforme figura 6.



**Figura 6. Distribuição dos tipos de lesões entre os 100 pacientes com sinais clínicos de candidíase bucal.**

Todas as amostras isoladas de lesão do tipo estomatite protética associada a queilite angular apresentaram cultura positiva, seguidas pelas amostras de estomatite protética, pseudomembranosa, queilite angular e eritematosa. Nenhuma amostra proveniente de lesão sugestiva de candidíase bucal do tipo hiperplásica foi positiva para a pesquisa de leveduras (Tabela 3). *C. albicans* foi à espécie prevalente entre essas amostras, seguida pela associação de *C. albicans* com *C. tropicalis* (Tabela 4).

**Tabela 3. Resultado da pesquisa de leveduras nas amostras de saliva entre os tipos de lesões.**

<i>Tipos de lesões</i>	<i>Crescimento de leveduras</i>				
	<i>Positivos</i>		<i>Negativos</i>		<i>Total</i>
	<i>n</i>	<i>(%)</i>	<i>n</i>	<i>(%)</i>	
Estomatite protética e queilite angular	06	(100)	00	(0)	06
Estomatite protética	40	(81,7)	09	(18,3)	49
Pseudomembranosa	16	(69,5)	07	(30,5)	23
Queilite angular	05	(50)	05	(50)	10
Eritematosa	03	(37,5)	05	(62,5)	08
Hiperplásica	00	(0)	04	(100)	04

**Tabela 4. Distribuição das espécies de leveduras segundo os tipos de lesões bucais.**

<i>Tipos de lesões</i>	<i>Espécies</i>		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans+C. tropicalis</i>
Estomatite protética + queilite angular	04	01	01
Estomatite protética	35	00	05
Pseudomembranosa	09	04	03
Queilite angular	03	02	00
Eritematosa	03	00	00
Total	54	07	09

## 4.6 Produção de exoenzimas

### 4.6.1 Fosfolipase

A enzima fosfolipase foi produzida por 100% dos isolados de *C. albicans*. A maioria dos isolados do grupo com lesões (73%) e do grupo controle (64%) foram fortemente produtores ( $PZ \leq 0,63$ ). Os demais isolados apresentaram atividade moderada com PZ variando de 0,64 a 0,99. Os isolados de *C. tropicalis* não produziram a enzima fosfolipase ( $PZ = 1$ ) nos grupos avaliados. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ , teste *t* Student) da atividade da enzima fosfolipase entre os isolados de *C. albicans* do grupo com lesões e do grupo controle, bem como entre os isolados de *C. tropicalis* de ambos os grupos (Tabela 5).

**Tabela 5. Atividade da enzima fosfolipase das leveduras isoladas do grupo com lesões bucais e do grupo controle.**

Grupos	*N° isolados	Espécie	PZ = 1		0,64 ≤ PZ ≤ 0,99		PZ ≤ 0,63	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
com lesões	63	<i>C. albicans</i>	00	(0)	17	(27,0)	46	(73,0)
controle	14	<i>C. albicans</i>	00	(0)	05	(35,7)	09	(64,3)
com lesões	16	<i>C. tropicalis</i>	16	(100)	00	(0)	00	(0)
controle	03	<i>C. tropicalis</i>	03	(100)	00	(0)	00	(0)

**PZ= 1: negativo para produção da enzima; 0,64 ≤ PZ ≤ 0,99: isolado produtor da enzima; PZ ≤ 0,63: isolado fortemente produtor da enzima; \* % em relação ao número de isolados.**



#### 4.6.2 Proteinase

Todas os isolados de *C. albicans* apresentaram atividade da enzima proteinase. A maioria dos isolados do grupo com lesões (65%) e do grupo controle (64,3%), foram fortemente produtores ( $PZ \leq 0,63$ ) sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , teste *t* Student). Com relação à *C. tropicalis*, 56,2% dos isolados do grupo com lesões e 66,7% do grupo controle não apresentaram atividade da enzima ( $PZ = 1$ ). A comparação destes resultados também não revelou diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ , teste *t* Student) conforme tabela 6.

**Tabela 6. Atividade da enzima proteinase das leveduras isoladas do grupo com lesões bucais e do grupo controle.**

Grupos	*N° isolados	Espécie	PZ = 1		0,64 ≤ PZ ≤ 0,99		PZ ≤ 0,63	
			n	(%)	n	(%)	n	(%)
com lesões	63	<i>C. albicans</i>	00	(0)	22	(35,0)	41	(65,0)
controle	14	<i>C. albicans</i>	00	(0)	05	(35,7)	09	(64,3)
com lesões	16	<i>C. tropicalis</i>	09	(56,2)	05	(31,2)	02	(12,6)
controle	03	<i>C. tropicalis</i>	02	(66,7)	00	(0)	01	(33,3)

**PZ= 1: negativo para produção da enzima; 0,64 ≤ PZ ≤ 0,99: isolado produtor da enzima; PZ ≤ 0,63: isolado fortemente produtor da enzima; \* % em relação ao número de isolados.**

## 4.7 Teste de sensibilidade aos antifúngicos

### 4.7.1 Controle de qualidade

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidas com as cepas padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 estão indicadas na tabela 7.

**Tabela 7. Concentrações inibitórias mínimas das cepas padrão.**

<i>Cepa</i>	<i>Antifúngico</i>	<i>CIM de referência (µg/mL)*</i>	<i>CIM obtida (µg/mL)</i>
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Anfotericina B	0,5 -4,0	2
	Itraconazol	0,125 – 0,5	0,125
	Fluconazol	1,0 – 4,0	2
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Anfotericina B	1,0 – 4,0	2
	Itraconazol	0,25 – 1,0	0,25
	Fluconazol	16 – 64	32

\* *Valores de referência segundo o documento M27-A2 (NCCLS, 2002).*

#### 4.7.2 Anfotericina B

A CIM da anfotericina B apresentou intervalo de 0,125 a 4 µg/mL para os isolados de *C. albicans* do grupo com lesões e de 0,5 a 2 µg/mL para os isolados do grupo controle, com CIM<sub>90</sub>= 2 µg/mL para os dois grupos. Um isolado de *C. albicans* do grupo com lesões foi resistente *in vitro* a este antifúngico com CIM= 4 µg/mL. Para os isolados de *C. tropicalis* a CIM deste antifúngico variou de 2 a 4 µg/mL com CIM<sub>90</sub>= 4 µg/mL para ambos os grupos. Sete amostras, respectivamente, 5 do grupo com lesões bucais e 2 do grupo controle foram resistentes *in vitro* a anfotericina B (Tabela 8). De acordo com o teste de Mann-Whitney não houve diferença estatisticamente significativa na atividade da anfotericina B entre o grupo com lesões bucais e o grupo controle.

**Tabela 8. Distribuição dos isolados de acordo com a CIM de anfotericina B.**

Grupos	Levedura	CIM (µg/mL)*									
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
Lesões	<i>C. albicans</i>	0	0	1	17	37	7	0	1	0	0
Controle	<i>C. albicans</i>	0	0	0	4	9	1	0	0	0	0
Lesões	<i>C. tropicalis</i>	0	0	5	11	0	0	0	0	0	0
Controle	<i>C. tropicalis</i>	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0

\* Sensível ≤ 2µg/mL; Resistente ≥ 4µg/mL (ELLIS, 2002).

### 4.7.3 Itraconazol

Para os isolados de *C. albicans* do grupo com lesões bucais a CIM do itraconazol apresentou intervalo de 0,03 a 16 µg/mL e CIM<sub>90</sub>= 0,06 µg/mL. Para os isolados do grupo controle o intervalo foi de 0,03 a 4 µg/mL com CIM<sub>90</sub> idêntica ao do grupo com lesões bucais. Respectivamente, 1 isolado do grupo com lesões bucais e outro do grupo controle foram resistentes *in vitro* (CIM ≥ 1 µg/mL) a este antifúngico. Em relação aos isolados de *C. tropicalis*, a CIM do itraconazol apresentou intervalo de 0,03 a 16 µg/mL e CIM<sub>90</sub>= 2µg/mL para os isolados do grupo com lesões bucais e de 0,06 a 0,5 µg/mL com CIM<sub>90</sub>= 0,125 µg/mL para os isolados do grupo controle, ressaltando que 3 isolados do grupo com lesões bucais foram resistentes *in vitro* (CIM ≥ 1 µg/mL) a este antifúngico (Tabela 9). De acordo com o teste de Mann-Whitney não houve diferença estatisticamente significativa na atividade do itraconazol entre o grupo com lesões bucais e o grupo controle.

**Tabela 9. Distribuição dos isolados de acordo com a CIM de itraconazol.**

Grupo	Levedura	CIM (µg/mL)*									
		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
Lesão	<i>C. albicans</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	16	45
Controle	<i>C. albicans</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	12
Lesão	<i>C. tropicalis</i>	1	1	0	1	0	4	4	1	2	2
Controle	<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0

\* Sensível: ≤ 0,125 µg/mL; Sensível dose-dependente: 0,25 – 0,5 µg/mL ; Resistente: ≥ 1 µg/mL (NCCLS, 2002).

#### 4.7.4 Fluconazol

Em relação às amostras de *C. albicans* a CIM do fluconazol apresentou intervalo de 0,125 a  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  e  $\text{CIM}_{90} = 2$   $\mu\text{g/mL}$  para os isolados do grupo com lesões bucais e de 0,25 a 1  $\mu\text{g/mL}$  com  $\text{CIM}_{90} = 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  para os do grupo controle. Cinco isolados de *C. albicans* do grupo com lesões bucais foram resistentes *in vitro* a este antifúngico com  $\text{CIM} \geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ . Para os isolados de *C. tropicalis* a CIM do fluconazol apresentou intervalo de 0,25 a  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  com  $\text{CIM}_{90} = 16$   $\mu\text{g/mL}$  no grupo com lesões bucais e de 0,5 a 32  $\mu\text{g/mL}$  e  $\text{CIM}_{90} = 32$   $\mu\text{g/mL}$  para o grupo controle. No grupo com lesões bucais 1 isolado foi resistente *in vitro* ao fluconazol ( $\text{CIM} \geq 64$   $\mu\text{g/mL}$ ), conforme tabela 10. De acordo com o teste de Mann-Whitney não houve diferença estatisticamente significativa na atividade do fluconazol entre os grupo com lesões bucais e o grupo controle.

Tabela 10. Distribuição dos isolados de acordo com a CIM de fluconazol.

Grupo	Levedura	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )*									
		$\geq 64$	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Lesão	<i>C. albicans</i>	5	0	1	0	0	3	4	8	31	11
Controle	<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	1	2	11	0
Lesão	<i>C. tropicalis</i>	1	1	2	2	3	2	1	1	3	0
Controle	<i>C. tropicalis</i>	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0

\* Sensível:  $\leq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ; Sensível dose-dependente: 16 – 32  $\mu\text{g/mL}$ ; Resistente:  $\geq 64$   $\mu\text{g/mL}$  (NCCLS, 2002).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 *Quantificação de leveduras*

O número elevado de UFC de leveduras na cavidade bucal parece ser um pré-requisito para o desenvolvimento da candidíase. No presente estudo, as contagens nas amostras do grupo com lesões foram significativamente maiores que no grupo controle ( $p < 0,05$ ), corroborando outros estudos realizados por diferentes pesquisadores (EPSTEIN et al, 1980; NÄRHI et al, 1993; TORRES et al, 2002; TORRES et al, 2003). Entre os diversos sinais clínicos da candidíase bucal, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de UFC/mL (teste ANOVA). No grupo controle 4 amostras apresentaram contagens entre 1.000 a 4.000 UFC/mL, no entanto destacamos que neste intervalo a presença de lesões é facultativa e o aparecimento das mesmas está diretamente relacionado às condições do hospedeiro. Navazesh et al (1995) pesquisando a relação entre o fluxo salivar e a contagem de *C. albicans* também encontraram indivíduos do grupo controle com contagens superiores a média esperada para carreadores saudáveis e atribuíram o ocorrido ao fato que somente o número elevado de UFC/mL não condiciona o aparecimento de sinais e sintomas relacionados a candidíase.

O diagnóstico da candidíase oral fundamenta-se nos sinais presentes ao exame clínico, bem com em dados da anamnese, os quais variam de acordo com a forma clínica. Todavia exames complementares, como a quantificação que permite a distinção do estado de carreador e de infecção,

pode ser uma ferramenta útil na avaliação e na prevenção de complicações clínicas de pacientes propensos a desenvolver candidíase bucal.

## **5.2 Identificação de leveduras**

Até a introdução dos meios cromogênicos, como o CHROMagar<sup>®</sup> Candida, era muito difícil a identificação da colonização mista (TORRES et al, 2003). A colonização mista é observada com frequência em indivíduos HIV positivos (DRONDA et al, 1996) e pacientes com câncer (PAULA et al, 1990). Com o uso deste meio no isolamento primário foi possível a identificação de colonização mista tanto no grupo com lesões (12,9%) quanto no grupo controle (6,3%). Previamente Beighton et al (1995) verificaram a associação de *C. albicans* e *C. tropicalis* diretamente de amostras de bochecho oral de pacientes com lesão bucal. Além disso, o CHROMagar<sup>®</sup> Candida foi eficaz na identificação presuntiva de *C. albicans*, visto que todas as colônias típicas de cor verde foram posteriormente confirmadas pela metodologia clássica, concordando com a literatura quanto à alta sensibilidade e especificidade do meio (ODDS e BERNAERTS, 1994; POWELL et al, 1998). De acordo com as recomendações do fabricante, *C. tropicalis* pode ser previamente identificada com base na coloração azul metálica característica. Em nosso estudo todas as colônias (n = 19) com esta coloração foram confirmadas como *C. tropicalis* pela metodologia clássica, demonstrando a sensibilidade do meio também na identificação desta espécie. Por fim, o emprego do CHROMagar<sup>®</sup> Candida para a rotina de isolamentos clínicos é altamente recomendável, pois além de identificar *C. albicans*, ajuda na identificação presuntiva de *C. tropicalis*,

*C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, leveduras comumente isoladas de materiais clínicos (BERNAL et al, 1996; CANDIDO, 2000).

### **5.3 Distribuição das espécies entre os grupos**

Embora a candidíase oral seja precedida pela colonização, indivíduos colonizados podem ser apenas portadores da levedura sem apresentar sinais clínicos da doença (SCHARDOSIM e CHERUBINI, 2004). Dados da literatura com relação à colonização da cavidade oral de indivíduos saudáveis são variados, dependem da população estudada e da sensibilidade da técnica de coleta (CANNON et al, 1995). A taxa de colonização é influenciada pela idade (LYNCH, 1994). Nas crianças varia de 45 a 65% (FARAH et al, 2000) e nos adultos de 25 a 75% (CANNON et al, 1995; MARTINS et al, 2002; PEREZOUS et al, 2005). A taxa de colonização é maior em pacientes hospitalizados do que nos ambulatoriais, com uma média de 54,7% para todas as espécies e 38,1% só para *C. albicans* (FARAH et al, 2000). No grupo controle a taxa de colonização (32%) ficou dentro dos valores estimados pela literatura. Segundo Moreira et al (2001) a incidência de *Candida* é influenciada pelos fatores nutricionais, interação com a microbiota bacteriana e a presença de anticorpos na saliva, embora as razões pelas quais pessoas saudáveis abriguem estes microrganismos ainda sejam desconhecidas.

A levedura freqüentemente relacionada com a colonização de superfícies mucosas e o desenvolvimento da candidíase é *C. albicans*, contudo espécies não – *albicans* também podem estar associadas a estas condições.



Candido (2000) verificou que alguns indivíduos apresentavam 2 ou 3 espécies de *Candida* em diferentes ocasiões no período de 1 ano, demonstrando que não só *C. albicans* vive saprofiticamente na cavidade bucal e que outras espécies incomuns podem ser isoladas.

A identificação de uma diversidade de espécies de *Candida* na cavidade bucal é comumente citada na literatura. A avaliação da microbiota oral de 68 indivíduos saudáveis com idade entre 25 a 55 anos por Martins et al (2002), revelou que 61,7% destes albergavam leveduras na cavidade bucal e 4 espécies foram identificadas: *C. albicans* (61,22%), *C. tropicalis* (20,42%), *C. glabrata* (6,12%) e *C. kefyr* (2,04%). Um número maior de espécies (n= 10) foi identificado em 1063 amostras de saliva, das quais 570 eram de indivíduos saudáveis e 493 de pacientes com fatores predisponentes ao desenvolvimento da candidíase (JORGE et al, 1997). Várias espécies também foram identificadas em estudos com crianças (MOREIRA et al, 2001), idosos (PAILLAUD et al, 2004; GRIMOUD et al, 2003), diabéticos (BELAZI et al, 2005), imunocomprometidos (RIBEIRO et al, 2004; VARGAS e JOLY, 2002), portadores de prótese dentária (DAR-ODEH e SHEHABI, 2003; PENHA et al, 2000; PIRES et al, 2002), indivíduos com xerostomia (TORRES et al, 2003) entre outros grupos. No entanto, em nosso estudo apenas 2 espécies foram identificadas: *C. albicans* e *C. tropicalis*, a diferença entre este estudo e os outros pode estar relacionada ao número e idade dos indivíduos, localização geográfica e metodologia do estudo. Segundo Odds (1988) dentre as espécies de *Candida* encontradas na cavidade bucal, *C. albicans* é prevalente, representando 45-75% dos isolados, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata*

(7% cada), *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (5% cada uma) e as demais espécies em menor proporção.

*C. albicans* foi prevalente em ambos os grupos. Esta espécie é o principal agente da candidíase oral, capaz de colonizar, invadir e induzir lesões em qualquer parte da cavidade oral em imunocompetentes e imunocomprometidos (REICHART et al, 2000). Sua prevalência está relacionada com a alta capacidade de aderência às células do epitélio bucal em relação a outras espécies de *Candida*. A aderência é o primeiro passo para a colonização e subsequente invasão dos tecidos. (CANNON et al, 1995; MONROY et al, 2005). *C. tropicalis* foi a segunda espécie isolada em nossas amostras, tal fato foi observado na microbiota oral de pacientes sem lesão (MARTINS et al 2002; JORGE et al, 1997; CANDIDO et al, 2000), desdentados usuários de prótese total (PIRES et al 2002), mulheres HIV positivo e negativo (RIBEIRO et al, 2004), e de pacientes com diferentes fatores predisponentes (JORGE et al, 1997).

Neste estudo, a colonização mista foi observada em 9 (12,9%) ocasiões no grupo com lesões bucais e apenas uma no grupo controle. Colônias mistas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, previamente foram observadas em 2,5% das amostras de saliva de 113 crianças de diferentes categorias socioeconômicas (MOREIRA et al, 2001), em 5,4% das culturas de *swab* oral de 37 pacientes desdentados com estomatite protética (PENHA et al, 2000) e 5,5% dos lavados de próteses dentárias e 11,1% das amostras de saliva de 25 usuários de prótese (CANDIDO et al, 1995).

#### **5.4 Aspectos clínicos da candidíase bucal e espécies envolvidas**

O interesse pela candidíase oral aumentou marcadamente nos últimos anos devido a sua associação à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras condições que levam a imunossupressão, como o uso de drogas citotóxicas (SOYSA et al, 2004). A transição do comensalismo para a doença está envolvida com fatores de virulência do microrganismo, fatores locais e fatores relacionados ao hospedeiro. Em nosso estudo verificamos que a maioria (49%) dos pacientes apresentou lesões do tipo estomatite protética, a variedade de infecção por *Candida* mais observada em pacientes imunocompetentes no mundo ocidental (SAMARANAYAKE, 1986).

A estomatite protética é uma lesão eritematosa da mucosa bucal, associada a um conjunto de fatores locais: traumatismos de baixa intensidade e longa duração ocasionada por próteses mal-adaptadas, higiene oral inadequada, diminuição do fluxo salivar e a presença de agentes microbianos (PENHA et al, 2000; PEREZOUS et al, 2005; PIRES et al, 2002). O uso de próteses favorece o aumento da taxa de colonização de leveduras e predispõe o desenvolvimento da estomatite protética (DARWAZEH et al, 2001). Cerca de 60 a 100% dos usuários de próteses dentárias albergam leveduras e destes 11 a 67% podem desenvolver a lesão no palato (PIRES et al, 2002). Tal fato é comumente observado devido a prótese ser um fator local importante no desenvolvimento da candidíase, pois proporciona um ambiente adequado para a proliferação de *Candida*, em particular se não apresentar uma superfície lisa e estiver associada a outros fatores locais (CANDIDO et al, 1995; ODDS, 1988; PENHA et al, 2000). Os microrganismos comumente relacionados são

leveduras do gênero *Candida*, entretanto algumas bactérias podem estar envolvidas (BUDTZ-JORGENSEN et al, 1983; KOOPMANS et al, 1988; KULAK et al, 1997; PENHA et al, 2000). Das 49 amostras provenientes de pacientes com este tipo de lesão, 81,7% foram positivas para a pesquisa de leveduras e *C. albicans* foi à espécie prevalente, resultados semelhantes aos obtidos em outros estudos (PENHA et al, 2000; DAR-ODEH e SHEHABI, 2002; KULAK et al, 1997; CANDIDO et al, 1995; DARWAZEH et al, 2001; PIRES et al, 2002). Em 5 (12,5%) amostras ocorreram colônias mistas de *C. albicans* e *C. tropicalis*. No estudo de Pires et al (2002) essa foi a associação mais comum entre espécies, observada em 15,4% dos isolados. Verificamos também maior frequência da estomatite protética em pacientes do sexo feminino (79,6%), porém correlacionando a frequência com a positividade das amostras notamos que não houve diferença em relação ao sexo masculino. Dados na literatura indicam que esta lesão é observada com maior frequência nos pacientes do sexo feminino, contudo o motivo pelo qual as mulheres são mais acometidas não está claro, todavia acredita-se que esteja relacionado a mudanças hormonais, que podem alterar a microbiota oral, e por elas usarem dentaduras com maior frequência e em períodos mais prolongados devido a razões estéticas (COELHO et al, 2004; MONROY et al, 2005; PIRES et al, 2002).

A queilite angular também é uma lesão de aspecto eritematoso, apresenta fissuras nos ângulos da boca uni ou bilateralmente (FARAH et al, 2000). Normalmente é relacionada a anemias por deficiência de ferro ou riboflavina, ao enrugamento facial nos cantos da boca decorrentes do processo de envelhecimento ou por próteses dentárias mal ajustadas, que levam a

alterações na dimensão vertical (AKPAN e MORGAN, 2002; EPSTEIN e POLSKY, 1998; FARAH et al, 2000). Na maioria dos casos a queilite angular ocorre concomitantemente com a estomatite protética (OKSALA, 1990), fato observado em 6% dos pacientes do grupo com lesões. Destes, 100% mostraram crescimento de leveduras. Nos casos de queilite, 50% das amostras foram positivas para a pesquisa de leveduras. O isolamento de leveduras de pacientes com queilite angular varia de acordo com tipo de amostra analisada. Amostras do ângulo da boca colhidas com *swab* apresentam cultura positiva em 100% dos casos quando são observadas hifas ou pseudo-hifas no exame direto, enquanto amostras colhidas da cavidade bucal são positivas em torno de 70% dos casos (ÖHMAN et al, 1986). Em ambas as situações, *C. albicans* foi a espécie prevalente, concordando com WARNAKULASURIYA et al (1991).

O desenvolvimento da candidíase eritematosa está principalmente relacionado com o uso de corticóides e de antibióticos de amplo espectro. Clinicamente é caracterizada por uma área eritematosa geralmente no dorso da língua, palato ou mucosa jugal sem apresentar placas brancas cremosas (FARAH et al 2000). Alguns autores consideram a estomatite protética e a queilite angular como formas da candidíase eritematosa (CROCKETT et al, 1992). No entanto observamos que, embora a lesão esteja presente nem sempre há o isolamento de leveduras, reforçando a teoria do envolvimento de bactérias na etiologia destas lesões (KULAK et al, 1997). Neste estudo 8 amostras foram provenientes de lesões suspeitas de candidíase eritematosa. Destas apenas 3 foram positivas para leveduras e somente *C. albicans* foi identificada, diferindo de Rindum et al (1994) que isolaram leveduras de 100%

das amostras de *swab* oral de lesão em 21 pacientes com candidíase eritematosa e identificaram 20 *C. albicans* e 1 isolado não-*albicans*, quando tentavam relacionar a biotipagem de *C. albicans* na mucosa oral normal e com lesão. Esta discrepância pode estar relacionada a diferenças na metodologia utilizada nos estudos.

A forma clássica da candidíase oral é a pseudomembranosa, muito comum em crianças, idosos, pacientes terminais, no entanto, tem sido observada em indivíduos diabéticos, leucêmicos e HIV positivos (LYNCH, 1994; FARAH et al, 2000; AKPAN e MORGAN, 2002). As lesões desenvolvem-se em placas confluentes que lembram leite coalhado e que podem ser facilmente removidas por raspagem da mucosa revelando uma base eritematosa (FARAH et al, 2000). Segundo Lacaz (1980) estas placas são constituídas de epitélio descamado, fibrina, restos necróticos, resíduos alimentares, leucócitos, bactérias e pelas hifas do fungo. Nicolatou-Galitis et al (2001) identificou *C. albicans* (84%), *C. tropicalis* (9%), *C. glabrata* (3,4%), *C. krusei* (1,2%) e *C. holmii* (1,2%) nas amostras de 31 pacientes com câncer em tratamento com radioterapia que desenvolveram candidíase pseudomembranosa. Em nosso estudo, mesmo com uma população com características clínicas diferentes, verificamos que as espécies prevalentes foram às mesmas.

A candidíase hiperplásica talvez seja a forma mais interessante da candidíase oral, pois nesta situação as hifas são freqüentemente encontradas invadindo o epitélio bucal ao invés de estarem colonizando a superfície como

ocorrem nas demais formas de candidíase (LYNCH, 1994). É uma condição de pré-malignidade e mostra vários graus de displasia (FARAH et al, 2000). Estas lesões usualmente ocorrem na mucosa bucal ou nas bordas laterais da língua e sua presença é associada ao tabagismo. Entretanto, *Candida* sp nem sempre é isolada destas lesões e por essa razão não há consenso se a levedura é o agente causal ou apenas um agravante (AKPAN e MORGAN, 2002). Spolidorio et al (2003) mostraram que há uma correlação positiva entre *Candida* sp e displasia epitelial nos seus variados graus e que a presença da levedura aumenta a severidade destas lesões. Dos 4 pacientes que apresentaram sinais clínicos sugestivos de candidíase hiperplásica, em nenhuma foram isoladas leveduras da saliva, entretanto, segundo Farah et al (2000) e Williams et al (2000) o diagnóstico definitivo deve ser realizado através de biópsia.

Diante do exposto acima, notamos que a identificação das espécies de *Candida* em pacientes imunocompetentes é mais comum nos estudos com casos de estomatite protética. Nas outras lesões, a maioria dos estudos realiza a observação de hifas no exame direto e/ou a identificação entre *C. albicans* e espécies não-*albicans*, dificultando a comparação entre as espécies envolvidas nos diferentes tipos de lesões bucais. No entanto, o papel de *C. albicans* como principal agente da candidíase bucal é evidente, porém, outras espécies têm sido relacionadas ao desenvolvimento da candidíase bucal principalmente em pacientes imunocomprometidos.

### 5.5 **Produção de exoenzimas**

A virulência de leveduras é uma propriedade dependente de vários fatores como: adesão às células do hospedeiro, formação de hifas, plasticidade fenotípica e produção de enzimas hidrolíticas, principalmente fosfolipases e proteases (FOTEDAR e AL-HEDAITHY, 2005). A liberação de enzimas pelas células leveduriformes aderidas às células do hospedeiro, facilitam o poder invasor e interferem no metabolismo celular do hospedeiro, devido a alterações no transporte de íons pela célula e / ou na permeabilidade seletiva da mesma, podendo conduzir à morte celular (ODDS, 1988; GHANNOUM e ABU-ELTEEN, 1990).

A produção da fosfolipase foi observada somente nos isolados de *C. albicans*, reforçando a idéia de que a produção da mesma estaria restrita a esta espécie, provavelmente por sua localização na extremidade do tubo germinativo (OLIVEIRA et al, 1998; NIEWRTH e KORTING, 2001). Contudo, Ghannoum (2000) relata que alguns pesquisadores mostraram a produção de fosfolipase por espécies não-*albicans* em ensaios em placa com ágar gema de ovo e ensaios colorimétricos. Este fato não foi observado nos 19 isolados de *C. tropicalis* deste estudo, concordando com as observações Candido et al (2000). Sugere-se que as discrepâncias observadas na atividade da fosfolipase por espécies não-*albicans* podem ser atribuídas à variação dos isolados ou diferenças na preparação das placas de ágar gema de ovo, usadas para detectar a atividade da enzima (GHANNOUM, 2000). Kumar et al (2006) utilizando o método da placa observou a atividade de fosfolipase somente em 4



dos 22 isolados de *C. tropicalis* em seu estudo com pacientes imunocomprometidos.

Apesar da produção de fosfolipase em grandes quantidades estar relacionada a um alto grau de patogenicidade (IVANOVSKA, 2003), não houve diferença estatisticamente significativa na atividade da fosfolipase entre os grupos avaliados. Isso pode estar relacionado à técnica empregada, pois a gema do ovo contém substratos tanto para fosfolipases quanto para lipases. O ensaio baseado na gema do ovo não é específico e seu uso deve estar limitado a triagens iniciais, não sendo apropriado para a triagem de isolados que produzam baixos níveis de fosfolipase (GHANNOUM, 2000). A confirmação da atividade de fosfolipase necessita do uso de ensaios radiométricos específicos (BANNO et al, 1985) ou colorimétricos (MIRBOD et al, 1995), além do uso de colônias em suspensão concentrada e filtrada, particularmente em isolados fracamente produtores ou mutantes geneticamente manipulados (GHANNOUM, 2000; LEIDICH et al, 1998).

Outro fator a ser considerado é a produção de diferentes fosfolipases pelas espécies de *Candida*, dentre as quais a fosfolipase B, que tem sido destacada por estar diretamente relacionada à virulência. Estudos em modelos animais evidenciaram o papel da fosfolipase B na invasão do trato gastrointestinal (MUKHERJEE et al, 2001) e disseminação pela via hematogênica (LEIDICH et al, 1996). Entretanto, é importante salientar que a deleção de genes isolados atenuou a virulência, mostrando que a patogenicidade de *Candida* é multifatorial e regulada por mais de um

determinante. Estas informações nos levam a crer que experimentos envolvendo técnicas mais específicas permitirão um esclarecimento do papel das fosfolipases na virulência dos isolados e no desenvolvimento da candidíase bucal.

A produção de proteinases é indicada como fator relevante na virulência de *Candida* nas mucosas, pela capacidade de se expressar diferencialmente de acordo com o local e estágio da infecção (HUBE e NAGLIK, 2001). A maioria dos isolados de *C. albicans* apresentou forte atividade proteolítica em ambos os grupos avaliados. A alta atividade proteolítica pode ser estimulada em pH baixo (WU e SAMARANAYAKE, 1999), encontrado em ambientes orais protegidos da ação lubrificante da saliva, como na superfície da boca em contato com a prótese (HOEGL et al, 1996), bem como na ingestão regular e prolongada de alimentos com alto teor de carboidratos que levam a diminuição do pH na placa dentária a níveis propícios para a atividade da proteinase (SAMARANAYAKE et al, 1983).

Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto à produção de proteinase pelos isolados de *C. albicans* do grupo com lesões bucais e do grupo controle, confirmando os resultados obtidos por McMullan-Vogel et al (1999), Candido et al (2000) e Hannula et al (2000). Contudo Kuriyama et al (2003) obtiveram diferenças significativas em relação à atividade de proteinase entre pacientes com lesão oral e o grupo controle. Esta discrepância relaciona-se diretamente com a metodologia empregada. Kuriyama et al (2003) utilizaram um método modificado em que o inóculo foi semeado em meio líquido

contendo albumina bovina e incubado sob agitação por 2 dias. Transcorrido este período a atividade enzimática foi medida pela determinação da densidade ótica em 280 nm. Analisando estas modificações notamos que o tempo de incubação pode ser um fator significativo na avaliação da atividade enzimática, uma vez que as proteinases podem desnaturar com o passar do tempo (CASSONE et al, 1987).

Mesmo não tendo observado diferenças na atividade enzimática entre os grupos, o papel da proteinase durante a infecção não pode ser desconsiderado. O envolvimento das proteinases na virulência de *Candida* foi demonstrado com cepas mutantes incapazes de produzir proteases, as quais foram significativamente menos virulentas em infecções animais do que as cepas selvagens (DE BERNARDIS et al, 2001). Todavia a atividade das proteinases sem a presença de outros fatores predisponentes parece não favorecer o desenvolvimento da candidíase.

Embora a maioria dos isolados de *C. tropicalis* não tenha apresentado atividade proteolítica, verificamos que esta espécie é capaz de produzir proteases *in vitro* em meio contendo albumina bovina como única fonte de nitrogênio, entretanto sua habilidade na produção de proteases é menor que a de *C. albicans* (ODDS, 1988; PICHOVÁ et al, 2001; RÜCHEL et al, 1983; ZAUGG et al, 2001).

## 5.6 Sensibilidade aos antifúngicos

O fracasso de uma terapia antifúngica pode ser resultado da resistência microbiológica (intrínseca ou desenvolvida durante a terapia) ou da resistência clínica. Esta última está associada a farmacocinética do antifúngico, estado imune do paciente, local e severidade da infecção, virulência do agente etiológico e sua interação com o hospedeiro e o fármaco (ESPINEL-INGROFF, 2000). Contudo, prever o fracasso terapêutico não é uma tarefa fácil, pois os testes de sensibilidade a antifúngicos ainda apresentam problemas na metodologia e interpretação dos resultados (REX et al, 2001). Dentre as técnicas disponíveis a microdiluição em caldo, sugerida pelo CLSI para a avaliação de leveduras do gênero *Candida*, tem gerado resultados reprodutíveis na prática interlaboratorial. Neste trabalho determinamos a CIM e a CIM<sub>90</sub> de amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas do grupo com lesões e controle frente a anfotericina B, itraconazol e fluconazol, antifúngicos comumente empregados no tratamento tópico ou sistêmico de infecções por *Candida* (BURGESS et al, 2000).

A anfotericina B é o antifúngico padrão ouro no tratamento de infecções fúngicas disseminadas, devido ao seu amplo espectro de ação e poucos relatos de resistência fúngica a este fármaco (ELLIS, 2002; ESPINEL-INGROFF, 2000). O intervalo da CIM observado em nosso estudo foi semelhante aos encontrados por Blignaut et al (2002) com isolados orais de pacientes HIV positivos e saudáveis e Uzun et al (2000) em isolados de pacientes hospitalizados. Um isolado do grupo com lesões bucais apresentou resistência *in vitro* a anfotericina B com CIM igual 4 µg/mL. É importante

ressaltar que o CLSI ainda não definiu os valores de *breakpoint* para este antifúngico, uma vez que a CIM apresenta intervalo limitado dificultando a correlação clínica (ESPINEL-INGROFF, 2000; HOSPENTHAL et al, 2004). Alguns pesquisadores sugerem que os valores de *breakpoint* para a anfotericina B poderiam ser estabelecidos como: sensível (CIM  $\leq 1$   $\mu\text{g/mL}$ ), intermediário (CIM = 2  $\mu\text{g/mL}$ ) e resistente (CIM  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ). Contudo tem-se observado que as CIMs da anfotericina B apresentam-se agrupadas em pequenos intervalos, geralmente de 0,25 – 1  $\mu\text{g/mL}$  e exibem pequenas variações de  $\pm 1$  diluição que dificultam sua determinação de maneira consistente (ELLIS, 2002). No entanto este pesquisador ressalta que a resistência a anfotericina B é rara e freqüentemente causada por uma diminuição na quantidade de ergosterol na membrana plasmática ou mudança no lipídio alvo que leva a uma diminuição na ligação do fármaco verificado em CIM  $>$  que 2  $\mu\text{g/mL}$ . Para os isolados de *C. tropicalis* a menor CIM foi de 2  $\mu\text{g/mL}$ , o mesmo intervalo de CIM deste estudo foi encontrado por Cantón et al (2003) em isolados de *C. tropicalis* obtidos de hemocultura. Estes resultados corroboram com os de Barchiesi et al (2004) que demonstraram em experimentos *in vitro* e *in vivo* que isolados clínicos de *C. tropicalis* apresentam tolerância a anfotericina B.

O itraconazol é prescrito como uma alternativa ao fluconazol para o tratamento da candidíase oral, por ser ativo contra formas mucosas de candidíase (PAPPAS et al, 2004). A maioria (98,4 e 93%) dos isolados de *C. albicans* do grupo com lesões e do grupo controle, respectivamente, foram altamente sensíveis a este antifúngico. A CIM<sub>90</sub> de 0,06 $\mu\text{g/mL}$  destes isolados

foi equivalente a de Blignaut et al (2002) e mostra que o itraconazol pode ser de grande valia no tratamento da candidíase oral. Entretanto os isolados de *C. tropicalis* em sua maioria apresentaram CIM entre 0,25 – 0,5 µg/mL corroborando com Kuriyama et al (2005) e 3 isolados do grupo com lesões mostraram resistência *in vitro* ao fármaco concordando com Magaldi et al (2004) e diferindo de Uzun et al (2000) e Blignaut et al (2002). Uma possível razão para essa discordância entre os estudos baseia-se no efeito *trailing*, termo utilizado para descrever o crescimento reduzido, mas persistente que alguns isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* exibem em concentrações acima da CIM nos testes de diluição em caldo com antifúngicos azólicos, como o itraconazol e o fluconazol (LEE et al, 2004).

O antifúngico de primeira escolha no tratamento da candidíase oral é o fluconazol. Seu uso indiscriminado é, em parte, responsável pela seleção de isolados resistentes (POSTERARO et al, 2000). No presente estudo todos os isolados do grupo controle e quase todos do grupo com lesões foram sensíveis ao fluconazol (CIM ≤ 8 µg/mL). Cinco isolados do grupo com lesões foram resistentes *in vitro* a este antifúngico, como também observado por Waltimo et al (2000) com isolados de *C. albicans* de pacientes com periodontite apical e marginal. Com relação às amostras de *C. tropicalis*, 1 isolado do grupo com lesões bucais foi resistente *in vitro* ao fluconazol enquanto todos os isolados orais de Kuriyama et al (2005) e Haberland-Carrodeguas et al (2002) foram sensíveis. No entanto Magaldi et al (2004) encontrou 6 isolados resistentes entre os 7 isolados de *C. tropicalis* testados. Os relatos de resistência ao

fluconazol na literatura são variados e as divergências estão relacionadas ao efeito *trailing* descrito anteriormente para o itraconazol. Sugere-se também que as espécies de *Candida* podem apresentar resistência cruzada entre os azólicos, tal fato foi observado em 1 isolado de *C. albicans* do grupo com lesões bucais, contudo Kuriyama et al (2005) verificou que a resistência ao itraconazol e ao cetoconazol era significativamente maior em isolados resistentes ao fluconazol do que nos isolados sensíveis. No entanto, para certificação da resistência *in vitro* a estes antifúngicos é necessário o uso de técnicas moleculares, visto que em fenótipos resistentes, múltiplos mecanismos estão envolvidos (CANUTO e RODERO, 2002).

Apesar dos isolados serem provenientes de pacientes com e sem lesão bucal, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles com relação à sensibilidade aos antifúngicos testados. Segundo Espinel-Ingroff (2000) os fatores do hospedeiro e do microrganismo podem exercer maior impacto na infecção do que a medida *in vitro* da susceptibilidade, e por causa dos muitos fatores envolvidos no fenômeno da resistência, uma CIM baixa não necessariamente prediz o sucesso clínico, entretanto a resistência *in vitro* pode identificar isolados entre uma população sensível que estão menos aptos a responder a um tratamento antifúngico.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- ✓ Os pacientes com lesão tiveram contagens de leveduras superiores ao grupo controle. A maioria (55,7%) dos isolados dos pacientes com lesão bucal apresentou contagens superiores a 4.000 UFC/mL ( $p < 0,05$ ).
- ✓ Não houve diferença estatisticamente significativa no número de UFC/mL em relação aos tipos de lesão.
- ✓ O isolamento de leveduras no grupo com lesões (70%) foi significativamente maior do que no grupo controle (32%).
- ✓ *C. albicans* foi prevalente em ambos os grupos avaliados (77,1% no grupo com lesão e 81,2% no grupo controle).
- ✓ A lesão clínica mais freqüente entre os pacientes no grupo com lesões bucais foi à estomatite protética (49%), seguida de pseudomembranosa (23%), queilite angular (10%), eritematosa (8%), estomatite protética associada a queilite (6%) e hiperplásica (4%).
- ✓ *C. albicans* foi a espécie mais isolada nos tipos de lesões bucais, seguida de sua associação com *C. tropicalis*.



- ✓ Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade da fosfolipase e da proteinase das leveduras isoladas do grupo com lesões e do grupo controle.
- ✓ A maioria dos isolados de *C. albicans* apresentou alta atividade das enzimas fosfolipase e proteinase nos grupos avaliados.
- ✓ A fosfolipase foi detectada somente em isolados de *C. albicans* e a proteinase foi detectada entre *C. albicans* e *C. tropicalis*.
- ✓ Não houve diferença estatisticamente significativa entre a sensibilidade dos isolados do grupo com lesões bucais e do grupo controle em relação a CIM de anfotericina B, itraconazol e fluconazol.
- ✓ Entre os isolados que demonstraram resistência *in vitro*, a maioria foi do grupo com lesões bucais. O maior índice de resistência *in vitro* foi observado com os isolados de *C. tropicalis* frente a anfotericina B.
- ✓ Dos antifúngicos avaliados, o itraconazol apresentou maior índice de sensibilidade frente as leveduras isoladas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad. Med. J.**, Basingstoke, v.78, p.455-9, 2002.

AL-ABEID, H. M.; ABU-ELTEEN, K. H.; ELKARMI, A. Z.; HAMAD, M. A. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants and antifungal sensitivity. **Jpn. J. Infect. Dis.**, Tokyo, v.57, p.279-84, 2004.

ANTUNES, A. G. V.; PASQUALOTTO, A. C.; DIAZ, M. C.; AZEVEDO, P. A.; SEVERO, L. C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.46, n.5, p.239-41, 2004.

ARENDORF, T. M. ; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch. Oral Biol.**, Elmsford, v.25, p.1-10, 1980.

BANNO, Y. YAMADA, T.; NOZAWA, Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*: separation of three enzymes and some biological properties. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.23, n.1, p.47-54, 1985.

BARCIESI, F.; MARACCI, M.; BALDASSARI, I.; SPREGHINI, E.; GRIANNINI, D.; SCALISE, G. Tolerance to amphotericin B in clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.50, p.179-85, 2004.

BEIGHTON, D.; LUDFORD, R.; CLARK, D. T.; BRAILSFORD, S. R.; PANKHURST, C. L.; TINSLEY, G. F.; FISKE, J.; LEWIS, D.; DALY, B.; KHALIFA, N.; MARREN, V.; LYNCH, E. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.11, p.3025-7, 1995.

BELAZI, M.; VELEGRAKI, A.; FLEVA, A.; GIDARAKOU, I.; PAPANAU, L.; BAKA, D.; DANILLIDOU, N.; KARAMITSOS, D. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. **Mycoses**, Berlin, v.48, p.192-6, 2005.

BERNAL, S.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; GARCÍA, M.; ALLER, A. I.; MARTÍNEZ, M. A.; GUTIÉRREZ, M. J. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.24, p.201-4, 1996.

BLIGNAUT, E.; MESSER, S.; HOLLIS, R. J.; PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility of south african oral yeast isolates from HIV/AIDS patients and healthy individuals. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.44, p.169-74, 2002.

BOSCO, V. L.; BIRMAN, E. G.; CURY, A. E.; PAULA, C. R. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.3, p.217-22, 2003.

BUDTZ-JORGENSEN, E.; THEILADE, E.; THEILADE, J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.91, p.2134-42, 1983.

BURGESS, D. S.; HASTINGS, R. W.; SUMMERS, K. K.; HARDIN, T. C.; RINALDI, M. G. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 36, p.13-8, 2000.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; ITO, I. I. Leveduras: prevalência na cavidade bucal de portadores e não portadores de prótese total. **Rev. Odontol. UNICID**, São Paulo, v.7, n.1, p.27-33, 1995.

CANDIDO, R. C. **Biofilme dentadura: Caracterização fenotípica de amostras de leveduras isoladas em cinco ocasiões no período de um ano.** Ribeirão Preto, 2000. 148p. Tese (Livre docência) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.39, p.437-42, 2000.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J. Dent. Res.**, Chicago, v.74, n.5, p.1152-61, 1995.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; VIUDES, A.; QUINDÓS, G.; GOBERNADO, M.; ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.45, p.203-6, 2003.

CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **Lancet Infect. Dis.**, London, v.2, p.550-63, 2002.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; MONDELLO, F.; CEDDIA, T.; AGATENSI, L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.156, n.5, p.777-83, 1987.

COELHO, C.M.P.; SOUSA, Y.T.C.S.; DARÉ, A.M.Z. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, n.31, p.135-9, 2004.

CROCKETT, D. N.; O'GRADY, J. F.; READER, P. C. *Candida* species and *Candida albicans* morphotypes in erythematous candidiasis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v.73, p.559-63, 1992.

DAR-ODEH, N. S.; SHEHABI, A. A. Oral candidosis in patients with removable dentures. **Mycoses**, Berlin, v.46, p.187-91, 2003.

DARWAZEH, A. M.; AL-REFAI, S.; AL-MOJAIWEL, S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, v.86, p.420-3, 2001.

DE BERNARDIS, F.; SULLIVAN, P. A.; CASSONE, A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity, **Med. Mycol.**, Oxford, v.39, p.303-13, 2001.

DRONDA, F.; ALONSO-SANZ, M., LAGUNA, F., CHAVES, F.; MARTINEZ-SUÁREZ, J. V., RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non-*albicans Candida* strains in HIV-infected patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v.15, p.446-52, 1996.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.49, suppl. 1, p.7-10, 2002.

EPSTEIN, J. B.; PEARSALL, N. N.; TRUELOVE, E. L. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.12, n.3, p.475-76, 1980.

EPSTEIN, J. B.; POLSKY, B. Oropharyngeal candidiasis: A review of its clinical spectrum and current therapies. **Clin. Ther.**, Princeton, v.20, n.1, p.40-56, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical relevance of fungal susceptibility testing and antifungal resistance. **Clin. Microbiol. Newsl.**, New York, v.22, n.18, p.137-40, 2000.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidosis. **Clin. Dermatol.**, Amsterdam, v.18, p.553-62, 2000.

FOTEDAR R.; AL-HEDAITHY, S. S. A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, Berlin, v.48, p.62-7, 2005.

FREYDIÈRE, A.; GUINET, R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v.14, p. 85-9, 1997.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.13, n.1, p.122-43, 2000.

GHANNOUM, M. A.; ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, Berlin, v.33, p.265-82, 1990.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I. N.; SEVERO, L. C.; BUSTAMANTE, B.; CALVO, B.; ALMEIDA, L. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from latin american hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.3, p.401-5, 2003.

GRIMOUD, A. M.; MARTY, N.; BOCQUET, H.; ANDRIEU, S.; LODTER, J. P.; CHABANON, G. Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. **J. Oral Sci.**, Tokyo, v.45, n.1, p.51-5, 2003.

HARBERLAND-CARRODEGUAS, C.; ALLEN, C. M.; BECK, F. M.; BUESCHING, W. J.; KOLETAR, S. L.; SUNDSTROM, P. Prevalence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in otherwise health outpatients. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.31, p.99-105, 2002.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species, **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.9, n.12, p.591-6, 2001.

HOEGL, L.; OLLERT, M; KORTING, H. C. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. **J. Mol. Med.**, Berlin, v.74, p.135-42, 1996.

HOEPELMAN, I. M.; DUPONT, B. Oral candidiasis: the clinical challenge of resistance and management. **Int. J. Antimicrob. Agent.**, Amsterdam, v.6, p.155-9, 1996.

HOFFMAN, H.L.; PFALLER, M.A. *In vitro* antifungal susceptibility testing. **Pharmacotherapy**, Boston, v. 21, suppl. 8, p.111-23, 2001.

HOSPENTHAL, D. R.; MURRAY, C. K.; RINALDI, M. G. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. **Diagn. Microb. Infec. Dis.**, New York, v.48, p.153-60, 2004.

HOSSAIN, H.; ANSARI, F.; SCHULZ-WEIDNER, N.; WETZEL, W-E.; CHAKRABORTY, T.; DOMANN, E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, n.18, p.302-8, 2003.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiol.**, Reading, v.147, p.1997-2005, 2001.

IBRAHIM, A.; MIRBORD, F.; FILLER, S. G.; BANNO, Y.; COLE, G. T.; KITAJIMA, Y.; EDWARDS, J. E.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*, **Infect. Immun.**, Washington, v.63, n.5, p.1993-8, 1995.

IVANOSKA, N. Phospholipases as a factor of pathogenicity in microorganisms. **J. Mol. Catal. B, Enzym.**, Amsterdam, v.22, p.357-61, 2003.

JORGE, A. O. C.; ITO-KOGA, C. Y.; GONÇALVES, C. R.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, C. S. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.11, n.4, p.279-84, 1997.

KANTARCIOGLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the source of strains. **Mycoses**, Berlin, v.45, p.160-5, 2002.

KOOPMANS, A. S. F.; KIPPUW, N.; GRAAF, J. Bacteria in denture-induced stomatitis. **J. Dent. Res.**, Washington, v.67, p.1246-50, 1988.

KULAK, Y.; ARIKAN, A.; KAZAZOGLU, E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v.24, p.788-90, 1997.

KUMAR, C. P. G.; KUMAR, S. S. J.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathologia**, Den Haag, v.161, p.213-8, 2006.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. O. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.18, p.405-7, 2003.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D. W.; BAGG, J.; COULTER, W. A.; READY, D.; LEWIS, M. A. O. *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal isolates. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.20, p.349-53, 2005.

KURNATOWSKA, A. J. Activity of hydrolytic enzymes of *Candida albicans* strains isolated from patients with periodontal and membrane mucosae of oral cavity diseases. **Mycopathologia**, Den Haag, v.141, p.105-9, 1998.

KUROGAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.40, n.3, p.125-35, 1998.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. **The yeasts – a taxonomic Study**. 4<sup>a</sup>ed., Amsterdam: Elsevier, 1998.

LACAZ, C. S. **Candidíases**. São Paulo: EPU, 1980.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8<sup>a</sup> ed., São Paulo: Sarvier, 1991.

LEE, M.; WILLIAMS, L. E.; WARNOCK, D. W.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v.53, p. 217-24, 2004.

LEIDICH, S. D.; IBRAHIM, A. S.; FU, Y.; KAOU, A.; JESSUP, C.; VITULLO, J.; FONZI, W.; MIRBORD, F.; NAKASHIMA, S.; NOZAWA, Y.; GHANNOUM, M. A. Cloning and disruption of CALLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.273, n.40, p.2678-86, 1998.



LEUNG, W. K.; DASSANAYAKE, R. S.; YAU, J. Y. Y.; JIN, L. J.; YAM, W. C.; SAMARANAYAKE, L. P. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.6, p.2219-26, 2000.

LORD, T.H. **Determinative bacteriology laboratory manual**. 2<sup>a</sup> ed. Mineapolis: Burgess, 1960.

LYNCH, D. P.; MEMPHIS, T. Oral candidiasis: History, classification and clinical presentation. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v.78, p.189-93, 1994.

MAGALDI, S.; MATA-ESSAYAG, S.; HARTUNG DE CALRILES, C.; PEREZ, C.; COLELLA, M. T.; OLAIZOLA, C.; ONTIVEROS, Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **J. Infect. Dis.**, Chicago, n.8, p.39-45, 2004.

MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral Microbiology**. 3<sup>a</sup>ed.London: Chapman e Hall, 1992.

MARTINS, C. A. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.33, p.236-40, 2002.

MCMULLAN-VOGEL, C. G.; JÜDE, H. D.; OLLERT, M. W., VOGEL, C. W. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.14, p.183-9, 1999.

MIRBOD, F.; BANNO, Y.; GHANNOUM, M. A.; IBRAHIM, A. S.; NAKASHIMA, S.; KITAJIMA, Y.; COLE, G. T.; NOZAWA, Y. Purification and characterization of lysophospholipase-transacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1257, n.2, p.181-8, 1995.

MONOD, M.; CALOCCÍA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi, **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v.292, p.405-19, 2002.

MONROY, T. B.; MALDONADO, V. M.; MARTÍNEZ, F. F.; BARRIOS, B. A.; QUINDÓS, G.; VARGAS, L. O. S. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Oral Med. Oral Pathol.**, v.10, suppl. 1, p.27-39, 2005.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; RODRIGUES, J. A. O.; BORIOLLO, M. F. G.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J. F. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.15, n.3, p.187-95, 2001.

MUKHERJEE, P. K.; SESHAN, K. R.; LEIDICH, S. D.; CHANDRA, J.; COLE, G. T.; GHANNOUM, M. A. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. **Microbiol.**, New York, v.147, p.2585-97, 2001.

NÄRHI, T. O.; AINAMO, A.; MEURMAN, J.H. Salivary yeasts, saliva and oral mucosa in the elderly. **J. Dent. Res.**, Washington, v.72, n.6, p.1009-14, 1993.

NAGLIK, J. R.; RODGERS, C. A.; SHIRLAW, P. J.; DOBBIE, J. L.; FERNANDES-NAGLIK, L. L.; GREENSPAN, D.; AGABIAN, N.; CHALLACOMBE, S. J. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. **J. Infect. Dis.**, Chicago, n.188, p.469-79, 2003.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell. Microbiol.**, Oxford, v.6, n.10, p.915-26, 2004.

NAVAZESH, M.; WOOD, G. J.; BRIGHTMAN, V. J. Relationship between salivary flow rates and *Candida albicans* counts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v.80, n.3, p.284-8, 1995

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Publication Of M27-A2: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: approved standard – second edition. **NCCLS**, v.22, n.15, p.1-29, 2002.

NICOLATOU-GALITIS O., DARDOUFAS, K.; MARKOULATOS, P.; SOTIROPOULOU-LONTOU, A.; KYPRIANOS, K.; KOLITSI, G.; PISSAKAS, G.; SKARLEAS, C.; KOULOULIAS, V.; PAPANICOLAOU, V.; LEGAKIS, N.; VELEGRAKI, A. Oral pseudomembranous candidiasis, herpes simplex virus-1 infection, and oral mucositis in head and neck cancer patients receiving radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mouthwash. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.30, p.471-80, 2001.

NIWERTH, M.; KORTING, H. C.; Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v.44, p.361-67, 2001.

ODDS, F. C. **Candida and candidosis**. 2<sup>a</sup> ed. London, Ballière Tindall, 1988.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, p.1923-9, 1994.

ÖHMAN, S-C.; DAHLÉN, G.; MÖLLER, A.; ÖHMAN, A. Angular cheilitis: a clinical and microbial study. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v.15, p.213-7, 1986.

OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.48, n.1, p.71-4, 1990.

OLIVEIRA, E. E.; SILVA, S. C.; SOARES, A. J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M. R. R. Toxinas killer e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v.31, p.523-7, 1998.

PAILLAUD, E.; MERLIER, I.; DUPEYRON, C.; SCHERMAN, E.; POUPON, J.; BORIES, P. Oral candidiasis and nutritional deficiencies in elderly hospitalised patients. **Brit. J. Nutrit.**, Cambridge, v.92, p.861-97, 2004.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; SOBEL, J. S.; FILLER, S. G.; DISMUKES, W. E.; WALSH, T. J.; EDWARD, J. E. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.38, n.2, p.161-89, 2004.

PAULA, C. R.; SAMPAIO, M. C.; BIRMAN, E. G.; SIQUEIRA, A. M. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. **Mycopathologia**, Den Haag, v.112, p.119-24, 1990.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X.; PAULA, C. R. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.14, p.119-22, 2000.

PEREZOUS, L. F.; FLAITZ, C. M.; GOLDSCHMIDT, M. E.; ENGELMIER, R. L. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: A literature review. **J. Prosthet. Dent.**, Saint Louis, n.93, p.288-93, 2005.

PICHOVÁ, I.; PAVLICKOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; DOLEJSI, E.; HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O.; WEBER, J.; RUML, T.; SOUCEK, M. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.268, p.2669-77, 2001.

PIRES, F. R.; SANTOS, E. B. D.; BONAN, P. R. F.; DE ALMEIDA, O. P.; LOPES, M. A. Denture stomatitis and salivary *Candida* in brazilian edentulous patients. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, n.29, p.1115-9, 2002.

POSTERARO, B.; ROMANO, L.; SANGUINETTI, M.; MASUCCI, L.; MORACE, G.; FADDA, G. Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.38, p.29-36, 2000.

POWELL, H. L.; SAND, C. A.; RENNIE, R. P. Evaluation of CHROMagar *Candida* for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.32, p.201-4, 1998.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, n.20, p.7-14, 1982.

REICHART, P. A.; SAMARANAYAKE, L. P.; PHILIPSEN, H. P. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. **Oral Dis.**, Hampshire, v.6, p.85-91, 2000.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALDI, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.14, n.4, p.643-58, 2001.

RIBEIRO, M. A.; MIRANDA, A. E.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R. Prevalence and exoenzyme secretion by *Candida albicans* isolates from oral and vaginal mucosae of HIV-infected women. **Mycopathologia**, Den Haag, v.157, p.255-61, 2004.

RINDUM, J. L.; STENDERUP, A.; HOLMSTRUP, P. Identification of *Candida albicans* types related to health and pathological oral mucosa. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.23, p.406-12, 1994.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: does it matter? **Int. J. Infect. Dis.**, Chicago, v.6, suppl.1, p.47-53, 2002.

RÜCHEL, R.; TEGELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.20, n.3, p.233-44, 1982.

RÜCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BONING, B. Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. **Zentbl. Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene A**, Stuttgart, v.255, p.537-48, 1983.

SAMARANAYAKE, L. P.; GEDDES, D. A. M.; WEETMAN, D. A., MACFARLANE, T.W. Growth and acid production of *Candida albicans* in

carbohydrate supplemented media. **Microbios**, Cambridge, v.37, p.105-15, 1983.

SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MacFARLANE, T. W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, n.22, p. 201-7, 1984.

SAMARANAYAKE, L. P. Nutritional factors and oral candidosis. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v.15, p. 61-5, 1986.

SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. **Oral Candidosis**. Londres: Wright, 1990.

SAMARANAYAKE, Y. H. e SAMARANAYAKE, L. P. Experimental Oral Candidiasis in animal models. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.14, n.2, p.398-429, 2001.

SCHARDOSIM, L. R.; CHERUBINI, K. Quantificação de *Candida albicans* na cavidade bucal de bebês – Revisão de literatura. **Rev. Bras. Patol. Oral**, São Paulo, v.3, n.3, p.155-8, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, M. R. R. **Variabilidade fenotípica e genotípica de amostras de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS**. São Paulo, 1999. 158p. Tese (Doutoramento) – Instituto de Ciências Biomédicas – USP.

SIQUEIRA, J. F.; BILGE, H. S. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v.97, p.632-41, 2004.

SOYSA, N. S.; SAMARANAYAKE, L. P.; ELLEPOLA, A. N. B. Cytotoxic drugs, radiotherapy and oral candidiasis. **Oral Oncol.**, Oxford, v.40, p.971-8, 2004.

SPOLIDORIO, L. C.; MARTINS, V. R. G.; NOGUEIRA, R. D.; SPOLIDORIO, D. M. P. Frequência de *Candida* sp em biópsias de lesões da mucosa bucal. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.17, n.1, p.89-93, 2003.

STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v.48, p.3-10, 1990.

SULLIVAN, D. J.; WESTERNENG, T. J.; HAYNES, K. A.; BENNET, D. E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiol.**, New York, v.141, p.1507-21, 1995.

TAKAHASHI, N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. **Int. Congr. Ser.**, Amsterdam, v.1284, p.103-12, 2005.

TORRES, S. R.; PEIXOTO, C. B.; CALDAS, D. M.; SILVA, E. B.; AKITI, T.; NUCCI, M. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v.93, n.2, p.149-54, 2002.

TORRES, S. R.; PEIXOTO, C. B.; CALDAS, D. M.; SILVA, E. B. MAGALHÃES, F. A. C.; UZEDA, M.; NUCCI, M. Clinical aspects of *Candida* species carriage in saliva of xerostomic subjects. **Med. Mycol.**, Oxford, v.41, p.411-5, 2003.

UETA, E.; TOYOHITO, T.; SAYOKO, D.; OSAKI, T. Regulation of *Candida albicans* growth and adhesion by saliva. **J. Lab. Clin. Med.**, Saint Louis, v.136, n.1, p.66-73, 2000.

UZUN, O.; ARIKAN, S.; KOCAGÖZ, S.; SANCAK, B.; UNAL, S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.38, p.101-7, 2000.

VARGAS, K. G.; JOLY, S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.40, n.2, p.341-50, 2002.

WALTIMO, T. M. T.; ORSTAVIK, D.; MEURMAN, J. H.; SAMARANAYAKE, L. P.; HAAPASALO, M. P. P. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.45, p.245-8, 2000.

WARNAKULASURYA, K.; SAMARANAYAKE, L. P.; PEIRIS, J. S. M. Angular cheilitis in a group of Sri Lankan adults: a clinical and microbiologic study. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.20, p.172-5, 1991.

WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. A. O. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **Oral Dis.**, Hampshire, v.6, p.3-11, 2000.

WILLIAMSON, M.; SAMARANAYAKE, L. P.; MacFARLANE, T. W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. **J. Med. Vet. Mycol.**, Oxfordshire, v.24, n.5, p.415-7, 1986.

WROBLEWSKA, M. M.; SWOBODA-KOPEC, E.; ROKOSZ, A.; KRAWCZYK, E.; MARCHEL, H.; LUCZAK, M. Epidemiology of clinical isolates of *Candida albicans* and their susceptibility to triazoles. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v.20, p.472-5, 2002.

WU, T.; SAMARANAYAKE, L. P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **J. Med. Microbiol.**, London, v.48, p.711-20, 1999.

YÜCESOY, M. e MAROL, S. Performance of CHROMagar *Candida* and BIGGY agar for identification of yeasts species. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, London, v.2, p. 1-8, 2003.

ZAUGG, C.; ZEPELIN, M. B.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, n.1, p.405-12, 2001.



## ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963  
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil  
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/13406/FORP/290506

Prezado(a) Professor(a),

**Ref.: Processo nº 2004.1.809.58.1**

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informo que o referido Comitê, em sua 67ª Sessão realizada no dia 26 de maio de 2006, analisou e **aprovou o Relatório Final** do Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado: **"Isolamento, quantificação, identificação fenotípica, genotípica e sensibilidade e antifúngicos de leveduras isoladas da saliva de pacientes portadores de lesão bucal"**.

Solicitamos que quando da publicação do trabalho em forma de artigo, seja entregue uma fotocópia na Secretaria do Comitê.

Atenciosamente,

**Glauce Della Rosa**  
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. REGINA CÉLIA CÂNDIDO**

Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas - FCFRP/USP

GDR/gdr

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Protocolo de diluição para o fluconazol.

Concentração Inicial ( $\mu\text{g/mL}$ )	Volume da Concentração Inicial (mL) + RPMI (mL)	Concentração Intermediária ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração Final ( $\mu\text{g/mL}$ )	Poços
1280	0,2 + 1,8	128	64	2
640	0,2 + 1,8	64	32	3
640	0,1 + 1,9	32	16	4
160	0,2 + 1,8	16	8	5
160	0,1 + 1,9	8	4	6
160	0,1 + 3,9	4	2	7
20	0,2 + 1,8	2	1	8
20	0,1 + 1,9	1	0,5	9
20	0,1 + 3,9	0,5	0,25	10
20	0,1 + 7,9	0,25	0,125	11

**APÊNDICE B** – Protocolo de diluição para a anfotericina B e o itraconazol.

Concentração Inicial (µg/ml)	Volume (mL) + DMSO (mL)	Concentração Intermediária A (µg/mL)	Volume (mL) + RPMI (mL)	Concentração Intermediária B (µg/mL)	Concentração Final (µg/mL)	Poços
1600	0,4 + 1,6	320	0,2 + 1,8	32	16	2
1600	0,2 + 1,8	160	0,2 + 1,8	16	8	3
1600	0,1 + 1,9	80	0,2 + 1,8	8	4	4
1600	0,1 + 3,9	40	0,2 + 1,8	4	2	5
200	0,2 + 1,8	20	0,2 + 1,8	2	1	6
200	0,1 + 1,9	10	0,2 + 1,8	1	0,5	7
200	0,1 + 3,9	5	0,2 + 1,8	0,5	0,25	8
25	0,2 + 1,8	2,5	0,2 + 1,8	0,25	0,125	9
25	0,1 + 1,9	1,25	0,2 + 1,8	0,125	0,06	10
25	0,1 + 3,9	0,62	0,2 + 1,8	0,06	0,03	11

## APÊNDICE C – MEIOS DE CULTURA

### Ágar Sabouraud (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Dextrose (Synth) .....	40g
Peptona (Merck) .....	10g
Ágar bacteriológico (Difco) .....	15g
Água destilada .....	1000mL

Dissolver a quente. Distribuir em tubos 20 x 200 mm e autoclavar a 120°C, durante 20 minutos. Solidificar em posição inclinada. Conservar em geladeira.

### CHROMagar® Candida (ODDS e BERNAERTS, 1994).

Cloranfenicol .....	0,5g
Mistura cromogênica .....	22,0g
Peptona.....	10,2g
Ágar .....	15,0g
Água destilada .....	1000mL

Conforme a recomendação do fabricante, dissolver, a quente, 47,7 g do pó em 1000 mL de água destilada. Após a fusão do ágar distribuir cerca de 20 mL do meio em placas de Petri 90 x 90 mm. Conservar sob refrigeração.

**Ágar Fubá** (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Fubá. (Carrefour) .....	40g
Ágar bacteriológico (Difco) .....	22,0g
<i>Tween</i> 80 (Merck) .....	10,2g
Água destilada .....	1000mL

Suspender o fubá em água e aquecer em banho-maria a 60°C, durante 1 hora. A seguir filtrar a suspensão com o auxílio de gaze dobrada e completar o volume até 1000 mL. Adicionar o ágar e aquecer o meio até a completa dissolução dos componentes. Adicionar o *Tween 80* e homogeneizar o meio para distribuir nos tubos, esterilizar em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Conservar sob refrigeração.

**Ágar uréia de Christensen** (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Peptona (Merck) .....	1g
Dextrose (Synth) .....	1g
Cloreto de Sódio (Reagen) .....	5g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen) .....	2g
Vermelho de fenol (Merck) .....	0,012g
Uréia (Reagen) .....	20g
Ágar bacteriológico (Difco) .....	15g
Água destilada .....	1000mL

Colocar os componentes, com exceção da uréia, em balão volumétrico, acrescentar a água destilada, esterilizar em autoclave a 120°C durante 20 minutos. A seguir resfriar à aproximadamente 50°C e adicionar a uréia assepticamente. Homogeneizar e distribuir em tubos 13 x 100 mm esterilizados. Solidificar em posição inclinada.

**Meio para fermentação de glicose (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).**

Peptona (Merck) .....	2,5g
Extrato de levedura (Oxoid) .....	2,5g
Glicose (Synth) .....	3,0g
Água destilada .....	100mL

Dissolver os componentes em água destilada. A seguir, adicionar a glicose. Distribuir o meio em quantidades aproximadas de 3,5 mL em tubos de 13 x 100 mm, contendo tubos de Durham em posição invertida. A seguir, esterilizar em autoclave a 120°C durante 15 minutos. Para evitar a hidrólise ou caramelização do açúcar, abrir a válvula da autoclave rapidamente e esfriar os tubos em banho de gelo (LORD, 1960). Conservar em geladeira.

**Meio C – para assimilação de fontes de carbono** (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Sulfato de amônio (Ecibra) .....	5g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen) .....	1g
Sulfato de magnésio heptaidratado (Merck) .....	0,5g
Ágar bacteriológico (Difco) .....	20g
Água destilada .....	1000mL

Suspender os componentes em água destilada, sob agitação, e aquecer até fusão do ágar. Distribuir 18 mL do meio em tubos 25 x 200 mm, e em seguida esterilizar em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Conservar em geladeira.

**Meio N – para assimilação de fontes de nitrogênio** (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991).

Glicose (Synth) .....	20g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen) .....	1g
Sulfato de magnésio heptaidratado (Merck) .....	0,5g
Ágar bacteriológico (Difco) .....	20g
Água destilada .....	1000mL

Misturar em água destilada, sob agitação, todos os componentes, exceto a glicose. Aquecer a suspensão até a fusão do ágar. Acrescentar a glicose. Distribuir em volumes de 18mL do meio em tubos 25 x 200 mm, esterilizar em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Conservar em geladeira.

**Ágar-fosfolipase** (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982; WILLIAMSON; SAMARANAYAKE; MacFARLANE, 1986).

Peptona (Merck) .....	10g
Glicose (Synth) .....	20g
Cloreto de sódio (Reagen) .....	57,3g
Cloreto de cálcio (Reagen) .....	0,55g
Ágar bacteriológico (Difco) .....	20g
Água destilada.....	1000mL
Emulsão de gema de ovo a 50%.....	160mL

Colocar todos os componentes em balão volumétrico, acrescentar a água destilada, esterilizar em autoclave a 120°C por 20 minutos. Resfriar a 50°C, adicionar 160 mL de emulsão de ovo a 50% (80 g de gema de ovo, homogeneizada com 80 mL de solução fisiológica esterilizada, em frasco com pérolas de vidro esterilizadas). Distribuir em placas de Petri esterilizadas 20 x 100 mm. Conservar em geladeira.

**Ágar proteinase** (RÜCHEL; TEGELLER; TROST, 1982).

**Solução:**

YCB – Yeast Carbon Base (Difco) .....	11,7g
Albumina Bovina Fração V (Sigma) .....	2g
Protovit (Roche) .....	2,5mL
Água destilada .....	100mL



Em um béquer dissolver os componentes em água destilada e esterilizar por filtração, utilizando membrana Millipore de 0,22 $\mu$ m.

**Ágar base:**

Ágar bacteriológico (Difco) .....	18g
Água destilada .....	900mL

Em um balão volumétrico colocar o ágar e a água, autoclavar a 120°C durante 20 minutos. Após resfriamento à cerca de 50°C, homogeneizar o meio com a solução previamente preparada e filtrada. Distribuir em placas de Petri esterilizadas 20 x 100 mm. Conservar em geladeira.

**RPMI-1640 tamponado com 0,165 mol/L MOPS (NCCLS, 2002).**

RPMI 1640 (Gibco BRL) .....	10,4g
Tampão MOPS (USB) .....	34,5g
Glicose (Synth) .....	18g
Água MilliQ® .....	1000mL

Dissolver tampão MOPS (morfolino-propanossulfônico) em 900mL de água MilliQ®, para alcançar uma concentração de 0,165 mol L<sup>-1</sup>. Agitar até dissolução completa. Acrescentar o RPMI-1640 e a glicose, ajustar o pH a 7,0 $\pm$ 0,1, à temperatura ambiente, utilizando hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup>. Transferir para balão volumétrico e acrescentar água MilliQ® para completar o volume de 1000 mL. Esterilizar por filtração. Conservar em geladeira.

**APÊNDICE D** – Quantificação de leveduras (UFC/mL) nas amostras de saliva pacientes do grupo com lesões.

<i>AMOSTRAS POSITIVAS</i>	<i>UFC/mL</i>
P-01	4.400
P-02	15.000
P-06	2.000
P-07	2.000
P-08	2.800
P-09	3.100
P-10	12.000
P-11	9.000
P-12	9.400
P-13	16.000
P-15	2.600
P-16	3.700
P-17	4.800
P-18	4.000
P-19	2.000
P-20	2.800
P-21	3.000
P-25	4.000
P-28	3.800
P-32	20.000
P-33	13.000
P-35	4.000
P-37	18.000
P-38	3.000
P-39	10.000
P-40	10.000
P-41	6.000
P-42	12.600
P-43	2.000
P-45	3.500
P-46	5.000
P-47	3.000
P-48	4.500
P-49	7.100
P-50	5.500
P-51	5.500
P-53	3.400
P-54	6.400
P-56	4.100
P-57	4.500
P-58	4.400
P-59	2.500
P-61	6.100
P-64	4.500
P-66	5.700
P-69	4.400

*continua...*

*continuação...*

<i>AMOSTRAS POSITIVAS</i>	<i>UFC/mL</i>
P-72	4.000
P-73	2.800
P-75	3.300
P-77	6.000
P-80	4.500
P-81	3.800
P-82	3.200
P-83	5.400
P-84	3.100
P-85	4.000
P-86	2.700
P-87	3.000
P-88	5.400
P-89	7.000
P-90	4.900
P-91	4.200
P-92	3.900
P-94	4.000
P-95	10.000
P-96	6.500
P-97	8.000
P-98	10.000
P-99	2.500
P-100	8.000

*P= paciente*

**APÊNDICE E** – Quantificação de leveduras (UFC/mL) nas amostras de saliva dos indivíduos do grupo controle.

<i>AMOSTRAS POSITIVAS</i>	<i>UFC/mL</i>
C-06	650
C-08	1400
C-11	500
C-12	100
C-15	150
C-26	400
C-29	10
C-31	30
C-34	12
C-35	30
C-36	140
C-39	70
C-45	1470
C-46	1300
C-47	120
C-49	1100

*C= grupo controle*

**APÊNDICE F – Perfil fisiológico das leveduras.**

N° de isolados	Tubo germinativo	Urease	Crescimento 42°C	<i>Fermentação</i>				<i>Assimilação</i>										Identificação	
				Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Glicose	Maltose	Sacarose	Lactose	Celobiose	Rafnose	Ramnose	Trealose	Melibiose	Peptona		KNO <sub>3</sub>
77	+	-	+	+	+	-	-	+	+	V	-	-	-	-	+	-	+	-	<i>C. albicans</i>
19	-	-	NR	+	+	+	-	+	+	+	-	V	-	-	+	-	+	-	<i>C. tropicalis</i>

V= variável; NR = não realizado + = positivo; - = negativo.

**APÊNDICE G – Perfil dos pacientes com lesão bucal e resultado do exame micológico.**

Identificação	Iniciais	Sexo	Idade	Tipo de lesão	Cultura	Leveduras
P-01	J. A. C.	F	46	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-02	L. F. O.	F	51	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-03	M. F. P. S.	F	51	Pseudomembranosa	-	-
P-04	I. S. S.	F	50	Estomatite protética	-	-
P-05	A. E. C. V.	F	55	Pseudomembranosa	-	-
P-06	F. S. B.	F	68	Pseudomembranosa	+	<i>C. tropicalis</i>
P-07	I. P. M.	F	55	Queilite angular	+	<i>C. albicans</i>
P-08	G. F. S.	F	75	Pseudomembranosa	+	<i>C. tropicalis</i>
P-09	D. M. S. C.	F	69	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-10	D. L. R.	F	67	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-11	A. R. M.	F	73	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-12	I. D. F.	F	65	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-13	D. S. F.	F	47	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-14	M. L. N.	M	51	Eritematosa	-	-
P-15	J. R. M. O.	M	69	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-16	L. M. S.	F	45	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-17	M. A. L.	F	49	Estomatite protética e queilite angular	+	<i>C. albicans</i>
P-18	I. A. B.	F	49	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-19	J. R. B.	F	60	Estomatite protética e queilite angular	+	<i>C. tropicalis</i>
P-20	M. O.	F	62	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-21	M. A. C.	F	52	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-22	J. M. C.	M	65	Pseudomembranosa	-	-
P-23	J. B. O.	M	63	Pseudomembranosa	-	-
P-24	F. A. P.	F	44	Hiperplásica	-	-
P-25	J. L. O.	F	30	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-26	J. F.	F	35	Queilite angular	-	-
P-27	E. F. C. S.	F	32	Pseudomembranosa	-	-
P-28	J. C. S.	M	49	Eritematosa	+	<i>C. albicans</i>
P-29	M. T. C.	F	44	Eritematosa	-	-
P-30	M. R. R. F.	F	34	Queilite angular	-	-
P-31	E. M. J.	F	39	Estomatite protética	-	-

continua...

continuação...

Identificação	Iniciais	Sexo	Idade	Tipo de lesão	Cultura	Leveduras
P-32	P. F.	M	66	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-33	M. P.	M	71	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-34	N. A. M.	F	52	Estomatite protética	-	-
P-35	P. R. D.	F	67	Pseudomembranosa	+	<i>C. tropicalis</i>
P-36	M. N. S.	F	40	Estomatite protética	-	-
P-37	N. V. L.	F	55	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-38	M. M. L.	F	39	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-39	J. M. C.	M	75	Pseudomembranosa	+	<i>C. tropicalis</i>
P-40	M. C. L.	F	45	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-41	M. A. S.	F	44	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-42	R. N. A.	M	49	Estomatite protética e queilite angular	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-43	S. R. C.	F	47	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-44	M. S. A. S.	M	48	Eritematosa	-	-
P-45	R. S. S.	F	38	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-46	G. B. C.	M	52	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-47	T. A. O.	F	38	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-48	M. N. F.	F	50	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-49	M. A. O. S.	F	57	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-50	P. O. F.	M	66	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-51	C. M. C.	F	48	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-52	C. S. M.	F	50	Queilite angular	-	-
P-53	A. C. O.	M	69	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-54	S. S. V.	F	43	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-55	W. C. C.	M	48	Hiperplásica	-	-
P-56	V. C. M.	M	56	Eritematosa	+	<i>C. albicans</i>
P-57	R. O. S.	F	39	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-58	M. A. P. R.	M	40	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-59	M. R. L.	M	35	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-60	I. D. S.	F	35	Eritematosa	-	-
P-61	D. C. A.	F	45	Estomatite protética e queilite angular	+	<i>C. albicans</i>
P-62	J. O. M.	M	60	Pseudomembranosa	-	-
P-63	M. J. S.	F	44	Queilite angular	-	-

continua...

continuação...

Identificação	Iniciais	Sexo	Idade	Tipo de lesão	Cultura	Leveduras
P-64	L. S. M.	F	48	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-65	M. A. F.	F	39	Queilite angular	-	-
P-66	G. P. S.	M	55	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-67	M. P. V.	M	42	Estomatite protética	-	-
P-68	R. S.	M	49	Hiperplásica	-	-
P-69	P. R. F.	F	54	Queilite angular	+	<i>C. tropicalis</i>
P-70	R. M.	M	41	Estomatite protética	-	-
P-71	G. M. S.	F	40	Eritematosa	-	-
P-72	M. G. M.	F	39	Queilite angular	+	<i>C. tropicalis</i>
P-73	R. S. G.	M	35	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-74	A. J. L. S.	M	54	Hiperplásica	-	-
P-75	L. N. A.	F	42	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-76	N. C. L.	F	36	Estomatite protética	-	-
P-77	P. A. L.	F	44	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-78	M. F. C.	F	41	Estomatite protética	-	-
P-79	A. C. V.	F	62	Pseudomembranosa	-	-
P-80	R. S. S.	M	52	Queilite angular	+	<i>C. albicans</i>
P-81	A. C. S.	F	47	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-82	H. M. G.	F	54	Estomatite protética e queilite angular	+	<i>C. albicans</i>
P-83	R. L. M.	M	46	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-84	L. M. M.	F	48	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-85	P. O. C.	F	45	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-86	P. C. A.	M	49	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-87	M. A. C.	F	46	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-88	M. G.	F	51	Queilite angular	+	<i>C. albicans</i>
P-89	J. M. T.	M	52	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-90	M. S. M.	F	75	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-91	C. S. F.	F	47	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-92	J. S. P.	F	55	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-93	L. M. O.	F	41	Estomatite protética	-	-
P-94	J. G. C.	F	74	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i>
P-95	L. F. M.	M	51	Estomatite protética e queilite angular	+	<i>C. albicans</i>

continua...



*continuação...*

Identificação	Iniciais	Sexo	Idade	Tipo de lesão	Cultura	Leveduras
P-96	E. M. A.	F	40	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-97	L. C. A.	F	48	Eritematosa	+	<i>C. albicans</i>
P-98	A. O. B.	F	65	Pseudomembranosa	+	<i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
P-99	M. V. T.	F	42	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>
P-100	D. S. M.	F	38	Estomatite protética	+	<i>C. albicans</i>

### APÊNDICE H – Perfil dos indivíduos do grupo controle e resultado do exame micológico

Identificação	Iniciais	Sexo	Idade	Cultura	Leveduras
C-01	K. R. C. C.	F	26	-	-
C-02	I. R. S. M.	M	25	-	-
C-03	A. E. J.	F	30	-	-
C-04	C. D. C.	F	32	-	-
C-05	F. J. M. S.	M	27	-	-
C-06	S. S.	F	45	+	<i>C. albicans e C. tropicalis</i>
C-07	A. R. M. O.	M	27	-	-
C-08	E. W.	M	27	+	<i>C. albicans</i>
C-09	R. E. P.	M	26	-	-
C-10	C. N.	M	33	-	-
C-11	R. S. P.	M	34	+	<i>C. tropicalis</i>
C-12	N. J. C.	M	22	+	<i>C. tropicalis</i>
C-13	J. M. G. T.	F	23	-	-
C-14	F. M. J.	M	21	-	-
C-15	A. P. N.	F	28	+	<i>C. albicans</i>
C-16	S. F. F.	F	29	-	-
C-17	Z. O. G.	F	41	-	-
C-18	R. C. F.	F	27	-	-
C-19	F. A. P.	F	28	-	-
C-20	D. R. C.	M	20	-	-
C-21	M. B. A. M.	F	35	-	-
C-22	F. S. A.	M	27	-	-
C-23	L. C. R.	F	26	-	-
C-24	M. D. B.	M	42	-	-
C-25	R. E. S.	M	32	-	-
C-26	H. H. P.	M	27	+	<i>C. albicans</i>
C-27	L. D. F.	F	22	-	-
C-28	F. B. V.	M	24	-	-
C-29	P. H. F. C.	M	24	+	<i>C. albicans</i>
C-30	D. C. C.	F	22	-	-
C-31	L. R. M.	M	23	+	<i>C. albicans</i>

continua...

continuação...

Identificação	Iniciais	Sexo	Idade	Cultura	Leveduras
C-32	L. C. C. B.	F	22	-	-
C-33	H. L. S. F.	F	23	-	-
C-34	J. P. M.	M	24	+	<i>C. albicans</i>
C-35	M. F. S.	F	23	+	<i>C. albicans</i>
C-36	R. D. F.	F	22	+	<i>C. albicans</i>
C-37	M. F. A.	F	23	-	-
C-38	R. L. C.	F	23	-	-
C-39	M. F. S.	F	26	+	<i>C. albicans</i>
C-40	T. M. A.	F	24	-	-
C-41	J. C. F.	F	30	-	-
C-42	I. L. B. C. C.	F	29	-	-
C-43	I. C. V. P.	F	36	-	-
C-44	L. A. R. M.	F	31	-	-
C-45	D. R. A. R.	F	26	+	<i>C. albicans</i>
C-46	A. P. Z. C.	F	30	+	<i>C. albicans</i>
C-47	A. P. S.	M	25	+	<i>C. albicans</i>
C-48	E. C. C.	M	27	-	-
C-49	P. M. H.	F	25	+	<i>C. albicans</i>
C-50	M. E. N. B. S.	F	40	-	-

**APÊNDICE I** – Atividade das enzimas fosfolipase e proteinase das cepas isoladas da saliva dos pacientes do grupo com lesões bucais.

<i>Cepa</i>	<i>Fosfolipase</i>		<i>Proteinase</i>	
	PZ	Escore	PZ	Escore
CAL1	0,57	3	0,58	3
CAL2	0,53	3	0,52	3
CTL2	1,00	1	0,80	2
CTL6	1,00	1	1,00	1
CAL7	0,68	2	0,53	3
CTL8	1,00	1	0,56	3
CAL9	0,76	2	0,77	2
CAL10	0,70	2	0,58	3
CAL11	0,60	3	0,84	2
CTL11	1,00	1	0,73	2
CAL12	0,60	3	0,42	3
CTL12	1,00	1	1,00	1
CAL13	0,65	2	0,42	3
CTL13	1,00	1	1,00	1
CAL15	0,55	3	0,51	3
CTL15	1,00	1	1,00	1
CAL16	0,45	3	0,47	3
CAL17	0,78	2	0,78	2
CAL18	0,66	2	0,61	3
CTL19	1,00	1	1,00	1
CAL20	0,52	3	0,60	3
CAL21	0,70	2	0,55	3
CAL25	0,58	3	0,45	3
CAL28	0,65	2	0,40	3
CAL32	0,63	3	0,58	3
CAL33	0,73	2	0,60	3
CTL35	1,00	1	1,00	1
CAL37	0,53	3	0,52	3
CTL37	1,00	1	1,00	1
CAL38	0,62	3	0,52	3
CTL39	1,00	1	1,00	1
CAL40	0,57	3	0,70	2
CAL41	0,55	3	0,63	3
CAL42	0,56	3	0,61	3
CTL42	1,00	1	1,00	1
CAL43	0,57	3	0,70	2
CAL45	0,63	3	0,58	3
CAL46	0,63	3	0,60	3
CAL47	0,60	3	0,62	3
CAL48	0,46	3	0,62	3
CAL49	0,61	3	0,58	3
CTL49	1,00	1	0,78	2
CAL50	0,62	3	0,72	2
CAL51	0,60	3	0,61	3

*continua...*

continuação..

Cepa	Fosfolipase		Proteinase	
	PZ	Escore	PZ	Escore
CAL53	0,54	3	0,55	3
CAL54	0,65	2	0,70	2
CAL56	0,59	3	0,68	2
CAL57	0,60	3	0,57	3
CAL58	0,60	3	0,58	3
CAL59	0,60	3	0,55	3
CAL61	0,52	3	0,41	3
CAL64	0,63	3	0,62	3
CAL66	0,70	2	0,57	3
CTL69	1,00	1	0,72	2
CTL72	1,00	1	0,58	3
CAL73	0,59	3	0,52	3
CAL75	0,58	3	0,66	2
CAL77	0,57	3	0,47	3
CAL80	0,57	3	0,54	3
CAL81	0,76	3	0,57	3
CAL82	0,57	3	0,66	2
CAL83	0,59	3	0,61	3
CAL84	0,60	3	0,66	2
CAL85	0,64	2	0,75	2
CAL86	0,61	3	0,58	3
CAL87	0,63	3	0,60	3
CAL88	0,62	3	0,57	3
CAL89	0,61	3	0,68	3
CAL90	0,66	2	0,71	2
CAL91	0,65	2	0,70	2
CAL92	0,83	2	0,75	2
CAL94	0,52	3	0,70	2
CAL95	0,63	3	0,53	3
CAL96	0,62	3	0,65	2
CAL97	0,57	3	0,50	3
CAL98	0,72	2	0,69	2
CTL98	1,00	1	0,88	2
CAL99	0,61	3	0,75	2
CAL100	0,63	3	0,57	3

CAL= *Candida albicans* lesão, CTL = *Candida tropicalis* paciente.

**APÊNDICE J** – Atividade das enzimas fosfolipase e proteinase das cepas isoladas da saliva dos indivíduos do grupo controle.

Cepa	Fosfolipase		Proteinase	
	PZ	Escore	PZ	Escore
CAC06	0,57	3	0,60	3
CTC06	1,00	1	1,00	1
CAC08	0,56	3	0,47	3
CTC11	1,00	1	0,55	3
CTC12	1,00	1	1,00	1
CAC15	0,63	3	0,60	3
CAC26	0,61	3	0,62	3
CAC29	0,73	2	0,60	3
CAC31	0,61	3	0,47	3
CAC34	0,64	2	0,52	3
CAC35	0,65	2	0,51	3
CAC36	0,57	3	0,59	3
CAC39	0,61	3	0,75	2
CAC45	0,63	3	0,70	2
CAC46	0,55	3	0,84	2
CAC47	0,68	2	0,78	2
CAC49	0,65	2	0,76	2

CAC= *Candida albicans* controle, CTC = *Candida tropicalis* controle.

**APÊNDICE L** – CIM das drogas avaliadas: anfotericina B, itraconazol e fluconazol para os isoladas da saliva de pacientes do grupo com lesões bucais.

Cepa	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Anfotericina B	Itraconazol	Fluconazol
CAL1	1,00	16,00	64,00
CAL2	1,00	0,03	0,25
CTL2	2,00	0,50	0,25
CTL6	2,00	2,00	8,00
CAL7	2,00	0,03	0,25
CTL8	2,00	0,06	1,00
CAL9	2,00	0,06	1,00
CAL10	1,00	0,03	64,00
CAL11	1,00	0,03	0,25
CTL11	2,00	0,06	0,50
CAL12	1,00	0,03	0,25
CTL12	2,00	0,50	4,00
CAL13	1,00	0,03	0,25
CTL13	2,00	0,25	0,25
CAL15	2,00	0,03	0,25
CTL15	2,00	16,00	16,00
CAL16	1,00	0,03	0,125
CAL17	1,00	0,03	0,125
CAL18	2,00	0,03	0,25
CTL19	4,00	0,25	32,00
CAL20	2,00	0,03	0,25
CAL21	2,00	0,03	0,125
CAL25	1,00	0,06	0,25
CAL28	1,00	0,03	0,25
CAL32	1,00	0,03	0,25
CAL33	1,00	0,03	64,00
CTL35	2,00	8,00	64,00
CAL37	2,00	0,03	64,00
CTL37	2,00	0,25	2,00
CAL38	1,00	0,03	0,125
CTL39	2,00	0,50	16,00
CAL40	1,00	0,03	0,125
CAL41	1,00	0,03	0,125
CAL42	1,00	0,125	64,00
CTL42	2,00	0,50	4,00
CAL43	1,00	0,06	0,25
CAL45	2,00	0,03	0,25
CAL46	2,00	0,03	0,25
CAL47	2,00	0,06	2,00
CAL48	2,00	0,06	2,00
CAL49	2,00	0,03	0,25
CTL49	4,00	0,125	0,25
CAL50	4,00	0,03	0,50
CAL51	2,00	0,06	0,50

*continua...*

continuação...

Cepa	Concentração inibitória mínima (µg/mL)		
	Anfotericina B	Itraconazol	Fluconazol
CAL53	0,50	0,06	0,25
CAL54	1,00	0,06	1,00
CAL56	1,00	0,06	0,50
CAL57	1,00	0,06	0,5
CAL58	1,00	0,03	0,25
CAL59	1,00	0,06	1,00
CAL61	1,00	0,03	0,125
CAL64	2,00	0,03	0,25
CAL66	1,00	0,03	0,25
CTL69	4,00	0,03	8,00
CTL72	4,00	0,03	4,00
CAL73	2,00	0,03	2,00
CAL75	1,00	0,03	0,125
CAL77	1,00	0,03	0,25
CAL80	1,00	0,03	0,50
CAL81	2,00	0,03	16,00
CAL82	1,00	0,03	0,25
CAL83	1,00	0,03	0,25
CAL84	0,50	0,03	0,25
CAL85	1,00	0,06	1,00
CAL86	0,50	0,06	0,25
CAL87	1,00	0,03	0,25
CAL88	0,50	0,06	0,25
CAL89	1,00	0,03	0,125
CAL90	0,50	0,03	0,25
CAL91	0,50	0,03	0,25
CAL92	0,125	0,03	0,25
CAL94	1,00	0,03	0,25
CAL95	2,00	0,03	0,50
CAL96	1,00	0,03	0,125
CAL97	0,50	0,03	0,125
CAL98	1,00	0,06	0,50
CTL98	4,00	0,25	2,00
CAL99	1,00	0,03	0,25
CAL100	1,00	0,06	0,50

CAL= *Candida albicans* lesão, CTL = *Candida tropicalis* lesão.



**APÊNDICE M** – CIM das drogas avaliadas: anfotericina B, itraconazol e fluconazol para os isolados da saliva dos indivíduos grupo controle.

Cepa	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Anfotericina B	Itraconazol	Fluconazol
CAC06	2,00	0,03	0,50
CTC06	2,00	0,125	32,00
CAC08	2,00	0,03	0,25
CTC11	4,00	0,06	0,50
CTC12	4,00	0,50	32,00
CAC15	1,00	0,03	0,25
CAC26	1,00	0,03	0,25
CAC29	1,00	0,03	0,25
CAC31	1,00	0,03	0,25
CAC34	1,00	0,03	0,25
CAC35	0,50	0,03	0,125
CAC36	2,00	0,06	0,50
CAC39	1,00	0,03	0,25
CAC45	1,00	0,03	0,25
CAC46	2,00	0,03	0,25
CAC47	1,00	0,03	0,25
CAC49	1,00	4,00	1,00

CAC= *Candida albicans* controle, CTC = *Candida tropicalis* controle.