

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas**

**Rosema Santin**

Pelotas, 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ROSEMA SANTIN**

**Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras  
isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Sanidade Animal - Veterinária Preventiva).

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientadora: Patrícia da Silva Nascente

Pelotas, 2009

Dados de catalogação na fonte:  
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S235i Santin, Rosema

Isolamento, identificação e suscetibilidade in vitro de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas / Rosema Santin. - Pelotas, 2009. 89f. : il.

Dissertação ( Mestrado em Sanidade Animal-Veterinária Preventiva ) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2009, Mário Carlos Araújo Meireles , Orientador; co-orientador Patrícia da Silva Nascente.

1.Leveduras 2. Cavidade oral 3. Cães 4. Anti-sépticos orais  
I Meireles, Mário Carlos Araújo (orientador) II .Título.

CDD 636.7089

**Banca Examinadora:**

Prof<sup>o</sup> Dr. Sydney Hartz Alves - UFSM

Prof<sup>a</sup> Dra. Márcia de Oliveira Nobre - UFPel

Prof<sup>a</sup> Dra. Marlete Brum Cleff - UFPel

Prof<sup>o</sup> Dr. Mário Carlos Araújo Meireles - UFPel (Orientador)

*Aos meus pais,  
**Roque e Rosa,**  
por todo amor, carinho,  
compreensão, incentivo...*

*Ao meu irmão **Roberto,**  
maior e verdadeiro amigo...*

*Ao meu namorado,  
**Eduardo,**  
por estar sempre presente....  
pelo amor, paciência e incentivo*

## **Agradecimentos**

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida, pelas oportunidades e conquistas, pela saúde, pela força para chegar até aqui...

Aos meus pais, Rosa e Roque, todo meu amor. Obrigada pela vida, pelo amor, carinho, compreensão a mim dedicados. Ao meu irmão e amigo Roberto pelo amor, paciência, amizade. Muito obrigada, amo vocês. Ao meu namorado Eduardo, pelo amor, carinho, paciência, compreensão, apoio e estímulo indispensável em todos os momentos. Ao meu amigo Leonardo pela paciência e amizade.

Ao meu orientador prof<sup>o</sup> Mário Meireles pelos ensinamentos, amizade e confiança. À amiga e co-orientadora Patrícia da Silva Nascente pelas horas dedicadas a leitura desta dissertação, pela paciência, compreensão e amizade.

A todos os amigos do grupo de pesquisa em Micologia, Eme, Raquel, Isabel, Mel, Rê, Anezinha, Tati, Martinha, Helen, Antonella, Ana Paula, Anezona, Luiza, Ângela, Franklin, Josi, Ryan, Lara, pela amizade, aprendizado, força, compreensão e apoio a mim dedicados.

À prof<sup>a</sup> Márcia pela amizade e auxílio na parte clínica do experimento. Ao HUCV-UFPel pela disponibilidade do espaço para as coletas. Ao prof<sup>o</sup> Schuch, pelos ensinamentos e pelo auxílio na análise estatística.

A todo pessoal do Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita da Santa Casa – Complexo Hospitalar de Porto Alegre, especialmente ao prof<sup>o</sup> Luiz Carlos Severo pelo auxílio na identificação das leveduras e, a Mel acima de tudo pela amizade e tempo disponibilizado para essa identificação.

Ao CNPq pela bolsa de estudos e, aos demais órgãos financiadores, CAPES e FAPERGS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, a todos professores, alunos e servidores da Faculdade de Veterinária.

Aos animais, nossos pacientes por serem estímulo e aprendizado.

## Resumo

SANTIN, Rosema. **Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas**. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Objetivou-se avaliar a cavidade oral de fêmeas caninas errantes de Pelotas-RS, isolar e identificar leveduras de três sítios desta cavidade, comparar duas técnicas de colheita da mucosa gengival (*swab* e cureta) e testar a suscetibilidade *in vitro* destas leveduras frente a anti-sépticos orais utilizados na rotina odontológica de pequenos animais e seus princípios ativos. Foram avaliadas 59 fêmeas caninas, errantes, SRD, provenientes de Pelotas/RS. Os animais foram selecionados aleatoriamente, e distribuídos em três grupos de idade conforme avaliação da arcada dentária. Estes foram avaliados quanto à conformidade cranial, presença de cálculo dentário, fraturas dentárias, maloclusão, halitose, sangramento gengival e mensuração da profundidade de sulco periodontal. As amostras foram obtidas da mucosa gengival, biofilme dental e sulco periodontal, com diferentes formas de coletas: *swab*, cureta, sonda periodontal milimetrada e ponta de membrana em éster de celulose. O teste de suscetibilidade *in vitro* foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo testando o produto A (0,12% de gluconato de clorexidina, 0,12% de cloreto de benzalcônio e 0,10% de extrato de clorofila) e, o produto B (0,2% de cloreto de benzalcônio, 1% de tintura de própolis e 0,5% de aroma hortelã-pimenta) frente a 15 leveduras isoladas. Também foram avaliados os princípios ativos gluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e tintura de própolis isoladamente. As fraturas dentárias foram mais frequentes nos animais com seis anos ou mais ( $p=0,0030$ ). Nos cães com até dois anos a presença de cálculo dentário apresentou-se com menor frequência ( $p=0,0000$ ) em relação aos outros dois grupos. Na relação entre o número de locais de isolamento com idade, conformidade cranial, presença de fratura, cálculo dentário, halitose, sangramento gengival e maloclusão não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Foram isoladas 61 leveduras, *M. pachydermatis* (50,82%), *Rhodotorula* spp. (13,11%), *C. albicans* (4,92%), *C. catenulata* (3,28%), *C. famata* (1,64%), *C. guilliermondii* (1,64%), *C. parapsilosis* (1,64%), *C. intermedia* (1,64%), *T. asahii* (13,11%), *T. mucoide* (1,64%) e *C. albidus* (6,56%) distribuídas em 30 (50,85%) animais. Foi observada inibição do crescimento de todas as leveduras, em todos os produtos, em todas as concentrações, com exceção da tintura de própolis que não demonstrou ação nenhuma nas concentrações testadas. Sendo assim, na avaliação da cavidade oral das fêmeas caninas predominaram presença de cálculo dentário, fraturas dentárias e maloclusões. As leveduras isoladas fazem parte da microbiota

dos diferentes sítios da cavidade oral das fêmeas caninas estudadas, estando presentes sem causar alterações. O isolamento de leveduras foi maior naquelas fêmeas que tinham halitose. Não houve diferença entre as técnicas utilizadas (*swab* ou cureta) para colheita de material da mucosa gengival. Os anti-sépticos orais e os compostos gluconato de clorexidina e o cloreto de benzalcônio foram eficazes frente às leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas em todas as concentrações testadas, inclusive nas abaixo da recomendada para uso. Nas condições estudadas, a tintura de própolis não é recomendada para utilização como anti-séptico oral frente às leveduras nas concentrações estudadas.

**Palavras-Chaves:** Leveduras. Cavidade oral. Cães. Anti-sépticos orais.

## Abstract

SANTIN, Rosema. **Isolation, identification and *in vitro* susceptibility test of yeasts from oral cavity of female canine.** 2009. 89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aims of this study was the oral cavity evaluation of females stray dogs from Pelotas-RS, as well as yeast isolation and identification from three different areas of this cavity, comparison of two technique of sample collection (swabs and currettes) and test the *in vitro* susceptibility of isolated yeasts against common oral antiseptics used in pets. Fifty-nine randomized animals were included in the study. All of them were SRD, without age defined and from Pelotas-RS. They were divided in three groups of ages by the evaluation of dental arc, and were examined to determine the cranial morphology, presence of dental plaque, tooth fractures, malocclusion, halitosis and gingival bleeding. Measure of periodontal groove depth was also done. Samples were collected from three areas, gingival mucosa, dental biofilm and periodontal grooves, with different collection techniques: swab, currettes, millimeter periodontal probe and cellulose polymers membranes. *In vitro* susceptibility tests by microdilution methods was done with 15 of those yeasts against A product (0,12% chlorhexidine gluconate, 0,12% benzalkonium chloride and 0,10% chlorophila extract) and B product (0,2% benzalkonium chloride, 1% propolis and 0,5% peppermint arome). It was also evaluated chemical principles of products in separated, as chlorhexidine gluconate, benzalkonium chloride and propolis. Tooth fractures was observed in higher proportion at animals with six or more years old ( $p=0,0030$ ). Dogs younger than 2 years old had lower rate of dental plaques than the others groups ( $p=0,0000$ ). The association of positive areas of yeast isolation with age, tooth fracture, dental plaque, halitosis, gingival bleeding or malocclusion was not statistically significant. Sixty-one yeasts were isolated, characterized by *M. pachydermatis* (50,82%), *Rhodotorula* spp. (13,11%), *C. albicans* (4,92%), *C. catenulata* (3,28%), *C. famata* (1,64%), *C. guilliermondii* (1,64%), *C. parapsilosis* (1,64%), *C. intermedia* (1,64%), *T. asahii* (13,11%), *T. mucoide* (1,64%) and *C. albidus* (6,56%), from 30 (50,85%) animals. Yeasts growing inhibition was observed in all products tested and in all concentrations of them, with exception of propolis that did not show activity against yeasts. In conclusion, at oral cavity exam of female dogs, the mainly alterations found were dental plaques, tooth fractures and malocclusion. Isolated yeasts are normal habitants from the three different areas of oral cavity studied, without resulting in clinical signs. In relation to the techniques, it was not found difference between swab and currettes for oral sample collection. Yeast isolation was higher in female dogs that show halitosis. Oral antiseptics tested,

as well as chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride were effective against yeasts isolated from canine oral cavity in all dilution tested. Propolis, at the conditions and dilutions tested, is not recommended as an oral antiseptic against yeast.

**Key-words:** Yeasts, oral cavity, dogs, oral antiseptics.

## Lista de Figuras

Figura 1 -	Esquema demonstrando as estruturas anatômicas do dente canino.....	20
Figura 2 -	Colheita de material da mucosa gengival através de swab estéril (A) seguida de cureta (B), conforme técnica 1.....	42
Figura 3 -	Colheita de material do biofilme através de raspagem do dente canino superior.....	42
Figura 4 -	Demonstração da mensuração da profundidade de sulco e colheita de amostras com sonda periodontal milimetrada dos dentes 4ºPMSD (A) e CSE (B).....	43
Figura 5 -	Colheita das amostras do sulco periodontal dos dentes 4ºPMSD (A) e CSE (B) através de ponta de membrana HA em ésteres de celulose.....	43
Figura 6 -	Ajuste do inóculo na escala 2,0 de McFarland através do densitômetro (A) e preenchimento da galeria para posterior incubação (B).....	48
Figura 7 -	Demonstração do aparelho ATB™ Expression™ utilizado para leitura automatizada na identificação das leveduras isoladas da cavidade oral.....	48
Figura 8 -	Produtos comerciais e seus princípios ativos com descrição das concentrações utilizadas no teste <i>in vitro</i> .....	49

Figura 9 -	Presença de cálculo dentário e sangramento gengival (A), fratura dentária nos caninos inferiores (B), maloclusão, atrito entre os caninos e desgaste de incisivos (C) e mensuração da profundidade de sulco (2,5mm) do canino superior esquerdo (D).....	53
Figura 10 -	Prevalência (n) de leveduras da mucosa oral de fêmeas caninas de acordo com a técnica utilizada (swab e cureta).....	55
Figura 11 -	Distribuição de frequências de isolamento de leveduras em cada alteração encontrada na cavidade oral, tipo de crânio e diferentes grupos de idade.....	57
Figura 12 -	Distribuição de frequências dos 61 isolados de leveduras nos diferentes sítios da cavidade oral das 59 fêmeas caninas.....	58
Figura 13 -	Macromorfologia das colônias características do gênero <i>Malassezia</i> (A) e aspecto microscópico da <i>M. pachydermatis</i> , demonstrando os brotamentos em base larga, “pinos de boliche” (B).....	59
Figura 14 -	Colônias róseas com características macroscópicas de <i>Rhodotorula</i> spp. isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas....	59
Figura 15 -	Blastoconídeos com formação de tubo germinativo em soro equino, caracterizando <i>C. albicans</i> .....	60
Figura 16 -	Leveduras do gênero <i>Candida</i> isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas. <i>C. albicans</i> (A); <i>C. catenulata</i> (B); <i>C. famata</i> (C) <i>C. guilliermondii</i> (D); <i>C. parapsilosis</i> (E) e <i>C. intermedia</i> (F).....	61
Figura 17 -	Diferentes colônias de <i>Trichosporon asahii</i> isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas. <i>T. asahii</i> – colônia rugosa (A) e <i>T. asahii</i> – colônia mucóide e radiada (B).....	62

Figura 18 -	Colônias de <i>T. mucoide</i> (A) e <i>C. albidus</i> (B) isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas.....	62
Figura 19 -	Frequência de isolamento dos cinco gêneros encontrados na cavidade oral de fêmeas caninas.....	64
Figura 20 -	Antifunigrama através da técnica de Microdiluição em Caldo com anti-sépticos orais frente a <i>C. albicans</i> (A), <i>Rhodotorula</i> spp. (B), <i>T. asahii</i> (C) e <i>M. pachydermatis</i> (D) demonstrando poço com crescimento (seta vermelha) e sem crescimento (seta branca).....	65
Figura 21 -	Demonstração dos resultados da concentração fungicida mínima (CFM) dos isolados de <i>C. albicans</i> (A), <i>Rhodotorula</i> spp. (B), <i>T. asahii</i> (C) e <i>M. pachydermatis</i> (D) no controle positivo (canto superior esquerdo) e na tintura de própolis a 2% (canto inferior direito).....	66

## Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Idade, conformidade cranial, profundidade de sulco periodontal e alterações encontradas na cavidade oral de fêmeas caninas as quais foram avaliadas estatisticamente.....	41
Tabela 2 -	Descrição dos locais e diferentes formas de colheitas utilizadas na obtenção das amostras dos diferentes sítios da cavidade oral de fêmeas caninas.....	44
Tabela 3 -	Relação do número de fêmeas caninas com isolamento de leveduras da mucosa gengival através da técnica 1 (coleta com <i>swab</i> antes da cureta).....	54
Tabela 4 -	Relação do número de fêmeas caninas com isolamento de leveduras da mucosa gengival através da técnica 2 (coleta com cureta antes do <i>swab</i> ).....	55
Tabela 5 -	Relação dos locais, formas de coletas, número de amostras coletadas, número de coletas com isolamento e o número de espécies diferentes de leveduras isoladas de cada local da cavidade oral de fêmeas caninas.....	56
Tabela 6 -	Distribuição de frequências de leveduras com relação às diferentes formas e locais de coleta das 413 amostras da cavidade oral de fêmeas caninas.....	63
Tabela 7 -	Descrição das leveduras isoladas e número de animais com isolamento para cada um dos gêneros.....	63

### **Lista de abreviaturas e siglas**

4ºPMSD – quarto pré-molar superior direito

4ºPPMS – colheita através de ponta de membrana de HA éster de celulose do sulco periodontal do 4º pré-molar superior

4ºSPMS – colheita com sonda do sulco periodontal do 4º pré-molar superior

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CSE – Canino superior esquerdo

DIM – Diluição Inibitória Máxima

HUCV-UFPel – Hospital Universitário de Clínicas Veterinária

mm – milímetro

NCCLSI – National Committee for Clinical Laboratory Standards

PCSE - colheita através de ponta de membrana de HA éster de celulose do sulco periodontal do canino superior esquerdo

SCSE – colheita com sonda do sulco periodontal do canino superior esquerdo

SNC – Sistema Nervoso Central

SRD – Sem Raça Definida

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

## Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	4
<b>Resumo</b> .....	5
<b>Abstract</b> .....	7
<b>Lista de Figuras</b> .....	9
<b>Lista de Tabelas</b> .....	12
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	13
<b>Sumário</b> .....	14
<b>1 Introdução</b> .....	17
<b>2 Revisão bibliográfica</b> .....	19
2.1 Anatomia e exame clínico da cavidade oral de cães.....	19
2.2 Microbiota oral fúngica e bacteriana.....	22
2.3 Afecções da cavidade oral de cães associadas à microbiota.....	24
2.4 Fungos leveduriformes.....	25
2.4.1 Gênero <i>Malassezia</i> .....	25
2.4.2 Gênero <i>Candida</i> .....	28
2.4.3 Gênero <i>Trichosporon</i> .....	31
2.4.4 Gênero <i>Rhodotorula</i> .....	32
2.4.5 Gênero <i>Cryptococcus</i> .....	33
2.5 Anti-sépticos orais.....	34
2.5.1 Clorexidina.....	34
2.5.2 Cloreto de Benzalcônio.....	36
2.5.3 Própolis.....	37
<b>3 Material e métodos</b> .....	39
3.1 Animais.....	39

3.1.1 Conformidade cranial.....	40
3.1.2 Avaliação da cavidade oral.....	40
3.1.2.1 Mensuração da profundidade de sulco periodontal.....	40
3.1.3 Colheita das amostras.....	41
3.1.4 Métodos de colheita das amostras.....	41
3.2 Processamento das amostras.....	44
3.2.1 Manutenção das amostras.....	44
3.3 Identificação das leveduras isoladas.....	45
3.3.1 Características macromorfológicas.....	45
3.3.2 Características micromorfológicas.....	45
3.4 Caracterização dos gêneros e espécies isolados.....	45
3.4.1 <i>Malassezia</i> spp.....	45
3.4.2 <i>Rhodotorula</i> spp.....	45
3.4.3 Reação da catalase.....	46
3.4.4 Hidrólise da uréia.....	46
3.4.5 Assimilação de carboidrato.....	46
3.4.6 <i>Candida</i> spp., <i>Trichosporon</i> spp. e <i>Cryptococcus</i> spp.....	46
3.4.7 Prova do tubo germinativo.....	46
3.4.7 Identificação através do sistema ID 32C.....	47
3.5 Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	48
3.5.1 Anti-sépticos orais.....	49
3.5.2 Leveduras utilizadas no teste <i>in vitro</i> .....	50
3.5.3 Preparação dos inóculos.....	50
3.5.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	50
3.5.5 Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	51
3.6 Análise estatística.....	51
<b>4 Resultados</b> .....	<b>52</b>
4.1 Avaliação da cavidade oral.....	52
4.2 Metodologia de colheita.....	54
4.3 Isolamento e identificação.....	56
4.4 Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	64
4.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	64
4.4.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	65
<b>5 Discussão</b> .....	<b>67</b>

<b>6 Conclusões.....</b>	<b>75</b>
<b>Referências.....</b>	<b>76</b>
<b>Apêndice.....</b>	<b>88</b>

## 1 Introdução

A cavidade oral de humanos e animais abriga grande variedade de leveduras e bactérias bastante complexas e diversificadas. Conhecer esta microbiota é de fundamental importância em odontologia e medicina, pois estes microrganismos são responsáveis por diversas afecções na cavidade oral assim como, podem estar envolvidos em afecções sistêmicas como nos quadros de endocardites (TRABULSI; SAMPAIO, 2005). Na medicina veterinária, saber identificar as enfermidades da cavidade oral e, quais os principais microrganismos com potencial patogênico estão presentes também possui papel importante, a fim de fornecer suporte clínico, auxiliar no diagnóstico e terapia destas (BRAGA et al., 2005).

Estudos indicam que as bactérias encontradas na cavidade oral de cães podem ser anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas e aeróbicas estritas ou microaerófilas, sendo principalmente dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Bacteroides* (TRABULSI; SAMPAIO, 2005), *Fusobacterium* e *Porphyromonas* (BRAGA et al., 2005; NISHIYAMA et al., 2007). Estes agentes têm sido estudados, em animais, principalmente com relação a ferimentos causados por mordeduras e periodontite (VERSTRAETE, 1998).

As leveduras já descritas como parte da microbiota oral de animais domésticos e silvestres são *Malassezia pachydermatis* (BOND; SAIJONMAA-KOULUMIES; LLOYD, 1995; BOND; LLOYD, 1997; BRAGA et al., 2005; BRITO et al., 2008), *Rhodotorula* spp. (BRAGA et al. 2005) e *Candida* spp., os quais também são descritos como microrganismos comensais da pele, trato genital, gastrointestinal e de outras mucosas de mamíferos e animais silvestres (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; PACHALY; GIOSO, 2001; CLEFF et al., 2005; BRITO et al., 2008). Outros fungos como *Trichosporon* spp. e *Cryptococcus* spp. têm sido descritos em casos de micoses, principalmente em pacientes humanos imunocomprometidos. Em

animais, são poucas as pesquisas que descrevem o gênero *Trichosporon*, porém com *Cryptococcus neoformans* e outras espécies menos patogênicas deste gênero são encontrados relatos clínicos (HONSHO et al., 2003; LARSSON et al., 2003; LAMBRECQUE; SYLVESTRE; MESSIER, 2005). Entretanto, com relação à microbiota oral a pesquisa destas leveduras não tem sido realizada.

A saúde oral em pequenos animais vem ganhando espaço nos últimos anos, devido à aproximação, cada vez maior, do proprietário com seu animal de estimação. Na rotina odontológica, o uso de anti-sépticos orais visa principalmente reduzir a concentração de microrganismos ali presentes e, conseqüentemente a formação do biofilme dental (GIOSO, 2003; GIOSO; CARVALHO, 2004), prevenindo diversas doenças e lesões orais ou sistêmicas.

Devido aos poucos estudos avaliando o estado clínico da cavidade oral de cães, as leveduras isoladas deste local, assim como o potencial patogênico desses agentes na cavidade oral desencadeando enfermidades, os objetivos deste trabalho foram: avaliar a cavidade oral de fêmeas caninas errantes da cidade de Pelotas-RS, isolar e identificar leveduras de três sítios desta cavidade, comparar o uso de *swab* e cureta estéril para colheita da mucosa gengival e testar a suscetibilidade *in vitro* destas leveduras frente a anti-sépticos bucais e seus princípios ativos isoladamente utilizados na rotina odontológica de pequenos animais.

## **2 Revisão bibliográfica**

Nos últimos anos, o médico veterinário passou a desempenhar papel fundamental diante do aumento do número de animais de estimação, bem como na busca pela melhora da qualidade de vida destes animais (VENTURINI et al., 2007). A odontologia e a cirurgia oral são especialidades relativamente novas na prática veterinária e acompanham o desenvolvimento da medicina veterinária (GIOSO, 2003). Atualmente, os casos envolvendo cirurgias orais e problemas dentários são significativos na rotina da clínica de pequenos animais (ROZA, 2004).

### **2.1 Anatomia e exame clínico da cavidade oral de cães**

A cabeça é a parte do corpo do animal mais importante e especializada, pois é onde se encontra o cérebro e os órgãos sensoriais da audição, visão, paladar e olfato (GIOSO; CARVALHO, 2005). As variações anatômicas e de formato cranial em cães, podem ser divididas em três tipos de conformação, os braquicefálicos, como as raças pequinês, pug, shitzu, lhasa-apso, boxer e bulldog, são os que possuem um perfil facial curto (MITCHELL, 2005). Os dolicocefálicos são indivíduos com perfil facial longo e estreito, como das raças daschund, doberman, husky siberiano, pastor alemão e collie. O tipo mesocefálico está entre os dois tipos faciais já descritos, como por exemplos as raças labrador, spaniels, terriers, poodle, schnauzer e beagle (CARVALHO; GIOSO; CARVALHO, 2007).

Os dentes servem principalmente para apreensão e mastigação dos alimentos. Existem quatro tipos principais de dentes com base em seu aspecto macroscópico, localização anatômica na boca e função. Os incisivos servem para mordiscar, os caninos para agarrar e dilacerar e os pré-molares e molares para cortar e triturar os alimentos. Estas estruturas são derivadas de tecidos ectodérmicos e mesodérmicos, que são firmemente fixados à mandíbula e maxila (DORN, 1998).

A anatomia do dente consiste basicamente em: esmalte, dentina, cimento, polpa, sulco gengival, gengiva livre, ligamento periodontal e osso alveolar (GIOSO, 2003; ROZA, 2004; MITCHELL, 2005) conforme mostra a Fig. 1.

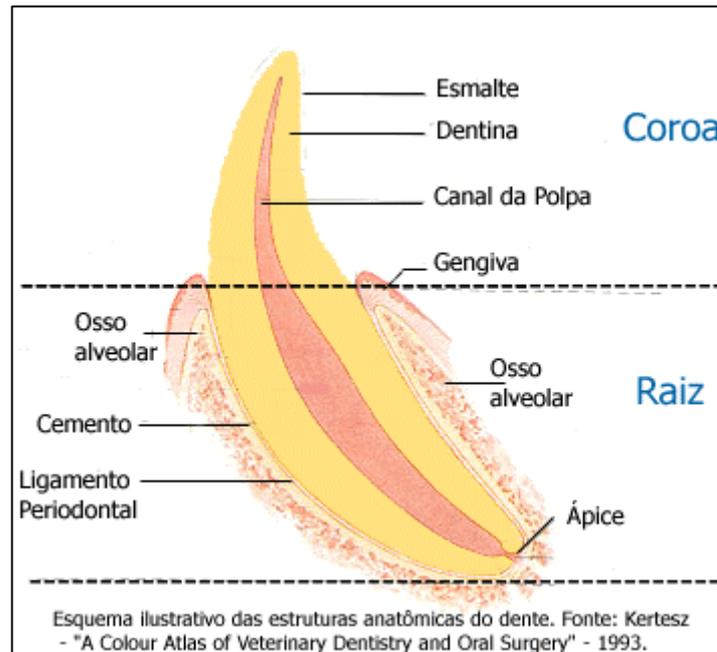


Figura 1 – Esquema demonstrando as estruturas anatômicas do dente canino

Fonte: [www.dentalvet.com.br](http://www.dentalvet.com.br)

O cão possui 28 dentes decíduos (fórmula para os dentes decíduos:  $2x(I3/3, C1/1, PM3/3)=28$  dentes) que começam sua erupção a partir da terceira semana de vida e na décima semana todos já estão erupcionados. A erupção dos dentes permanentes começa a partir dos três meses de idade e, aos sete meses, a maioria dos cães já está com a dentição completa (42 dentes), com algumas variações de raça (fórmula para os dentes permanentes:  $2x(I3/3, C1/1, PM4/4, M2/3)=42$  dentes (SAIDLA, 2004; MITCHELL, 2005).

A semiologia do sistema digestório inicia pelo exame da cavidade bucal, sendo de extrema importância na prática clínica, porém, muitas vezes, este não é realizado devido ao desconhecimento do profissional ou por fatores do próprio paciente, como agressividade, dor e fatores implícitos na manipulação da boca (CORRÊA; VENTURINI; GIOSO, 1998). O exame odontológico sempre deve ser precedido da anamnese completa e exame clínico geral do paciente, observando-se

o estado físico e quaisquer evidências de alterações, principalmente que revelam problemas sistêmicos (GIOSO, 2003).

Quando o paciente apresentar sinais clínicos sugestivos de doença na cavidade oral, deve-se realizar o exame completo e detalhado desta, incluindo a avaliação dos lábios, vestíbulo bucal, dentição, gengiva, palato duro e mole, tonsilas, tecido sublingual e língua (DeBOWES; HARVEY, 1999), além de um completo exame do contorno da cabeça, pesquisando aumento de volume, simetria e sensibilidade. Deve-se dar atenção para narinas e plano nasal, olhos, formação de fístulas e, dor ao abrir a boca (GIOSO, 2003; MITCHELL, 2005). Também é necessária a palpação da mandíbula, maxila e linfonodos regionais. Na maioria das vezes, um exame mais detalhado da cavidade oral necessita que o paciente se encontre sobre efeito anestésico, como por exemplo, para mensuração da profundidade de sulco e formação de bolsa periodontal nas periodontopatias (DeBOWES; HARVEY, 1999; GIOSO, 2003). Este procedimento requer a utilização de sonda periodontal milimetrada, cujas profundidades entre 1 a 3mm são consideradas normais em cães (ROZA, 2004; MITCHELL, 2005).

Os principais sinais de doença oral nos animais domésticos incluem halitose, disfagia, alterações comportamentais, ptialismo, saliva com sangue, prurido na face, descargas nasais, espirros, aumento de volume facial e fístulas oronasais (DeBOWES; HARVEY, 1999). Porém, o animal com algum distúrbio na cavidade oral pode levar meses a anos para demonstrar algum sinal evidente para seu proprietário (VENTURINI et al., 2007). Na maioria das vezes, são necessários exames complementares como hemograma, radiografias intra-orais para se chegar a um diagnóstico preciso, até mesmo quando se trata de uma enfermidade sistêmica causando alterações na boca (GIOSO, 2003; ROZA, 2004; MITCHELL, 2005).

Através da avaliação dental é possível fazer uma estimativa da idade dos cães relacionando com o desgaste dos dentes, porém, há diversas variáveis que podem influenciar nesta estimativa, como o tipo de alimentação, higiene bucal, maloclusão e traumatismo (GIOSO, 2003).

## 2.2 Microbiota oral fúngica e bacteriana

A microbiota oral de humanos e animais ainda não está completamente descrita por ser muito complexa e diversificada (BRAGA et al., 2005), abrigando grande variedade de microrganismos, como bactérias e leveduras (TRABULSI; SAMPAIO, 2005).

Braga et al. (2005) estudaram a microbiota oral de 29 cães da raça pastor alemão, com e sem doença periodontal utilizando pontas de papel absorvente introduzidas nos sulcos gengivais, concluindo que a microbiota periodontal é composta de 56,40% bactérias anaeróbicas estritas, 35,12% anaeróbicas facultativas, 6,4% aeróbicas estritas ou microaerófilas e 1,64% de leveduras.

Em 1995, buscando isolar *M. pachydermatis* de cães saudáveis, Bond, Saijonmaa-Koulumies e Lloyd, encontraram baixa frequência da levedura em todos os sítios anatômicos coletados (cavidade nasal, cavidade oral, ânus, prepúcio, vulva e ouvido), e em apenas um animal isolou-se grande número da levedura na mucosa oral. Já em outro estudo, Bond e Lloyd (1997) compararam a população de *M. pachydermatis* na pele e nas mucosas de cães da raça basset hound com e sem seborréia e de cães sem raça definida. O isolamento da levedura, em todos os sítios analisados, foi sempre superior nos basset com seborréia. Analisando somente as leveduras provenientes da boca, dos 30 cães sem raça definida (SRD) coletados, em seis houve isolamento, dos 13 basset saudáveis em 12 houve crescimento e dos 33 cães basset com seborréia, 29 foram positivos para a levedura.

Segundo Brito et al. (2008), a mucosa oral é o segundo sítio com maior número de leveduras isoladas, sendo que do total de 203 animais foram obtidos 75 isolados, destes, 69 foram classificados como *M. pachydermatis*, quatro *C. parapsilosis*, uma *C. tropicalis* e um *Saccharomyces cerevisiae*. No estudo de Braga et al. (2005), as únicas leveduras isoladas do sulco gengival de cães foram *M. pachydermatis* representando 90,91% dos isolados leveduriformes e *Rhodotorula* spp., sendo que estes microrganismos estavam presentes somente no sulco gengival de cães com doença periodontal, com exceção de um isolado de *M. pachydermatis* proveniente de sulco periodontal saudável. Em cães atópicos, a frequência de isolamento de *M. pachydermatis* da cavidade oral foi de 33,3% (NARDONI et al., 2007). Num estudo de Canizzo et al. (2007), foi demonstrada a capacidade de aderência e formação de biofilme de cepas de *M. pachydermatis* sobre diferentes materiais, como o poliestireno e poliuretano, assim como já

demonstrado quanto a espécies de *Candida* também capazes de produzir biofilme (GASPARETTO, et al., 2005; LÓPEZ-RIBOT, 2005).

As leveduras *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. viswanathii*, *C. glabrata*, *Aureobasidium (Pullularia) pullulans* e *Debaryomyces nepalensis* também já foram descritas como parte da microbiota oral de cães (MORETTI et al., 2007). *C. albicans* já foi isolada da mucosa oral de quatro (11,76%) cães com sinais de gengivite e estomatite tais como, anorexia, halitose, sangramento na cavidade oral, disfagia, salivação e linfadenopatia submandibular (JADHAV; PAL, 2006), porém, no estudo de Brito et al. (2008) e Hayashi, Takada e Hirasawa (2008) não foi isolada da cavidade oral de cães. Esta levedura também pode afetar todo o trato digestório de aves, porém, o maior índice de afecção envolve a cavidade oral (PACHALY, 2006; PACHALY; GIOSO, 2001), pois são microrganismos amplamente distribuídos no ambiente e, frequentemente colonizam pele e mucosas, como mucosa oral, trato gastrointestinal e mucosa genital de mamíferos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002) e pássaros (PACHALY, 2006). Num estudo referente ao isolamento de leveduras da cavidade oral de gatos, o único fungo isolado foi *C. albicans* (FERREIRO et al. 2002).

Em humanos, as leveduras também podem ser isoladas a partir de canal radicular infectado, tanto em cultura pura como em associação com bactérias (WALTIMO et al., 2003). *C. albicans* já foi isolada de casos de periodontite apical e marginal não responsível à terapia (WALTIMO et al., 2000).

Os microrganismos bacterianos predominantes no espaço subgengival de cães com doença periodontal são *Porphyromonas* spp., *Bacterioides* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp. (DOMINGUES et al., 1999; BRAGA et al., 2005), *Actinomyces* spp., *Eubacterium* spp., *Gemella* spp. (DOMINGUES et al., 1999), *Fusobacterium* spp. e cocobacilo Gram negativo com pigmento negro, *Pasteurella* spp., bastonete e cocobacilo Gram negativo, *Staphylococcus* spp., bastonetes Gram positivos, *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli* (BRAGA et al. 2005). Os gêneros mais frequentemente isolados da saliva são *Actinomyces* (26%), *Streptococcus* e *Granulicatella*, e os mais encontrados da placa dental são *Porphyromonas*, *Actinomyces* e *Neisseria* (ELLIOTT et al., 2005).

Nishiyama et al. (2007), pesquisando a presença dos microrganismos *Porphyromonas gengivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister pneumosintes*, *Actinobacillus*

*actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* e *Treponema denticola* de amostras subgengivais de 40 cães, com (25) e sem (15) doença periodontal através de identificação molecular (PCR), observaram que nos cães com doença *P. gingivalis* foi isolada em 64%, *C. rectus* em 36%, *A. actinomycetemcomitans* em 24%, *P. intermedia* e *T. forsythensis* em 20%, *F. nucleatum* em 16% e *E. corrodens* em 12%. Nos cães sadios, somente em um foi isolado *P. gingivalis* (6,66%), em nenhum dos outros foram isolados os microorganismos estudados. Para Greene (2006), os principais microorganismos encontrados na cavidade oral de cães clinicamente saudáveis são dos gêneros *Neisseria*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Bacterioides*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Candida* e *Mycoplasma*.

Em cães errantes da cidade de Guarulhos/SP, as principais bactérias aeróbias observadas na mucosa oral foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp., seguida de *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp. e *Streptococcus* spp. (LIPPOLIS; BENITES; MELVILLE, 2004). As bactérias aeróbicas e microaerófilas, *Micrococcus luteus*, *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., e outras encontradas em menores quantidades, são isoladas principalmente do sulco gengival saudável de cães (BRAGA et al., 2005).

A microbiota presente no biofilme dentário pode alterar-se de microorganismos gram positivos, não patogênicos, sem motilidade quando não se tem alteração na cavidade oral para uma microbiota anaeróbia, gram negativa com motilidade nos estágios mais severos das lesões (GIOSO, 2003).

Em uma revisão de literatura, Eto, Raslan e Cortinelli (2003) concluíram que a presença das diferentes espécies bacterianas na mucosa oral de humanos reflete diretamente a condição periodontal e, a participação destes microorganismos favorece a instalação e progressão da afecção oral.

### **2.3 Afecções da cavidade oral de cães associadas à microbiota**

A doença periodontal é a principal enfermidade infecciosa e acomete cerca de 80% de cães e gatos. Estudos indicam que animais com idade acima de quatro anos apresentam algum grau de doença periodontal, incluindo desde gengivite discreta à severa periodontite. Além de destruir os tecidos de sustentação do dente, como gengiva, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar (GIOSO, 2003) os microorganismos envolvidos na periodontite também possuem potencial para causar

diversas alterações sistêmicas (DeBOWES, 2004; MITCHELL, 2005). A principal causa das periodontopatias é a placa dental ou biofilme dental em contato com a margem gengival, a afecção inicia-se com gengivite leve podendo progredir para uma periodontite severa se não for tratada e controlada adequadamente (GIOSO, 2003; ROZA, 2004).

A prevalência de periodontite em cães idosos é maior quando comparada aos jovens (DeBOWES; HARVEY, 1999; TELHADO et al., 2004) e ocorre uma relação inversa com o peso do animal, ou seja, animais de pequeno porte estão mais predispostos a desenvolver algum grau de periodontite (HARVEY; SHOFER; LASTER, 1994). Um estudo retrospectivo realizado por Venturini et al. (2007) das doenças da cavidade oral de pequenos animais atendidos em 44 meses em um centro odontológico veterinário demonstrou que a afecção periodontal foi a mais frequentemente diagnosticada nos cães (71,4%) e gatos (74%), seguida de fraturas dentárias nos cães. A presença de cárie foi constatada em apenas 1,1% dos animais, enfermidade com baixa prevalência em pequenos animais já descrita por outros autores (PACHALY; GIOSO, 2001; GIOSO, 2003; ROZA, 2004).

Estomatite fúngica, geralmente resulta de infecção por espécies do gênero *Candida*, porém são raras em pequenos animais. As candidíases podem estar associadas com inflamação oral difusa, especialmente na língua e nas junções mucocutâneas (GREENE, 2006). Em cães, *C. albicans* já foi isolada da cavidade oral de quatro animais que apresentavam sinais de gengivite e/ou estomatite (JADHAV; PAL, 2006). Em humanos, as candidíases bucais são comuns, principalmente em pacientes imunocomprometidos (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; AKPAN; MORGAN, 2002; GOMPERTZ et al., 2005).

Com relação às lesões por *M. pachydermatis* na cavidade oral de cães, somente foi relatado um caso da associação de estomatite, faringite e tonsilite causada por esta levedura (PINTER; NOBLE, 1998).

## **2.4 Fungos leveduriformes**

### **2.4.1 Gênero *Malassezia***

O gênero *Malassezia*, primeiramente descrito por Baillon em 1889, pertence à família Cryptococcaceae, ordem Cryptococcales, classe Blastomycetes e divisão Deuteromycotina. As células apresentam-se esféricas ou elipsóides com brotamento único em base larga (KREGGER, 1984; WILKINSON; HARVEY, 1996). É

caracterizado por leveduras que necessitam obrigatoriamente da suplementação dos meios de cultivo com ácidos graxos de cadeia longa, sendo a única espécie não-lipodependente a *M. pachydermatis* (MANSFIELD; BOOSINGER; ATTLEBERGER, 1990; GUÉHO; MIDGLEY; GUILLOT, 1996).

A parede celular destas leveduras é espessa, com múltiplas camadas e apresentam protuberâncias na parte interna da parede que corresponde à invaginação da membrana plasmática. A reprodução é assexuada com produção de blastoconídeos por um processo unipolar repetitivo ou brotamento, formando uma célula globosa, oval ou cilíndrica, adquirindo o formato alongado quando se desliga da célula-mãe. A separação da célula filha, proporciona a formação de um colar de cicatrizes na célula-mãe, após distintos brotamentos (GUÉHO; MIDGLEY; GUILLOT, 1996).

Em animais, foi Weidman em 1925, que isolou a levedura de um rinoceronte indiano (*Rhinoceros unicornis*) com dermatite esfoliativa, sendo então denominada *Pityrosporum pachydermatis*, devido à semelhança com *Pityrosporum* humano, diferenciando-se apenas por não possuir característica de lipodependência (GUILLOT; BOND, 1999). Gustafson, em 1955, substituiu a nomenclatura para *Pityrosporum canis* e, em 1974, foi estabelecido que as leveduras do gênero que não necessitassem de suplementação de lipídios seriam agrupadas em único táxon, atualmente designado *Malassezia pachydermatis*, segundo alteração proposta por Yarrow e Ahearn (1984), que deram prioridade a *Malassezia*, já que este gênero havia sido descrito previamente.

Em 1955, Sloof descreveu a presença da levedura em cães, isolando-a em cerca de 70% do total de amostras estudadas de casos de otite externa (SLOOF, 1974). Fraser, em 1965, estudando a *M. pachydermatis*, concluiu que esta levedura pode ser um agente significativo nas otites caninas, por causarem irritação do epitélio do meato acústico, mas que também está presente em cães com orelhas saudáveis, embora apresente um número menor de células visualizadas na microscopia.

Um importante estudo feito por Guého, Midgley e Guillot (1996) reclassificou as leveduras do gênero, agrupando-as em sete espécies: a já conhecida não-lipodependente *M. pachydermatis* e seis espécies lipodependes *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. slooffiae*, *M. globosa*, *M. obtusa* e *M. restricta*.

Na atualização do gênero realizada por Ashbee (2007) concluiu-se que existiriam 11 espécies distintas e, a distribuição das espécies na pele normal e quando patogênicas apresentaram variação significativa, sendo que uma determinada espécie seria responsável por uma doença específica.

Recentemente, o gênero *Malassezia* aumentou para 13 espécies, sendo *M. pachydermatis* ainda a única não-lipodependente e 12 lipodependentes (GUILLOT; HADINA; GUÉHO, 2008). As novas espécies incluídas foram: *M. dermatis* (SUGITA et al. 2002), *M. japonica* (SUGITA et al., 2003), *M. yamatoensis* (SUGITA et al., 2004). As espécies *M. nana*, isolada de otites em gatos e bovinos (HIRAI et al., 2004), *M. caprae* e *M. equina* isoladas da pele hígida em cabras e pele hígida e com lesões em equinos, respectivamente (CABAÑES et al., 2007), sendo as duas últimas identificadas após o estudo realizado por Ashbee (2007).

*M. pachydermatis* cresce bem em meio ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a 37°C em 24-48h, apresentando colônias opacas, de coloração amarelo creme a marrom alaranjado, textura seca e friável, superfície redonda ou em forma de cúpula (GUÉHO; MIDGLEY; GUILLOT, 1996; GUILLOT et al., 1996). Esta levedura é particularmente sensível ao frio e a maioria das cepas torna-se inviável após três meses em temperaturas de 4°C (GUILLOT; BOND, 1999).

Morfologicamente observa-se a levedura como células isoladas ou em grupos, com formato oval ou com germinação unipolar de base larga, adquirindo o formato de garrafa, estando, normalmente, ausentes as hifas e pseudohifas (GUÉHO; MIDGLEY; GUILLOT, 1996; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996).

A reação de catalase é positiva (BOND; ANTHONY, 1995; GUILLOT et al., 1996; COUTINHO, 1997; NOBRE et al., 1998; NASCENTE et al., 2004), exceto para *M. restricta* (GUILLOT et al., 1996), e a incorporação de 10% de Tween 20 ao ágar glicose/peptona inibe o seu crescimento, o que diferencia a *M. pachydermatis* das demais espécies do gênero (GUÉHO; MIDGLEY; GUILLOT, 1996).

A hidrólise da uréia apresenta diversidade de resultados observados por vários autores (BOND; ANTHONY, 1995; NOBRE et al., 1998; NASCENTE et al., 2004).

As leveduras do gênero *Malassezia* são microrganismos comensais de diversos sítios anatômicos de humanos e animais domésticos podendo tornar-se patógenos. *Malassezia pachydermatis* é a espécie mais estudada em animais e é considerada parte da microbiota de vários sítios anatômicos em cães e gatos,

principalmente do meato acústico externo e tegumento cutâneo, embora também possa ser freqüentemente isolada do reto, sacos anais, vagina, espaço interdental (NOBRE et al., 1998; BOND; LAMPORT; LLOYD, 2000; NASCENTE et al., 2004) e cavidade oral (BOND; LLOYD, 1997; BRAGA et al., 2005, BRITO et al. 2008). Esta levedura também está frequentemente relacionada aos casos de otite externa canina (NOBRE et al., 1998; NASCENTE et al., 2004; MACHADO et al., 2003; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007).

A proliferação desta levedura pode ser inibida por outros microrganismos ou ser favorecida por eles (GABAL, 1988; NOBRE et al., 1998). Segundo Lobell, Weingarten e Simmons (1995), o uso indiscriminado de antibacterianos além de causar resistência de agentes patogênicos, elimina bactérias comensais que competem com a *M. pachydermatis* facilitando o seu desenvolvimento.

#### **2.4.2 Gênero *Candida***

Lagenbeck (1839) foi quem fez o primeiro relato do isolamento da levedura na mucosa oral de um paciente humano. Porém, foi em 1923 que Berkhout classificou um grupo de leveduras anascosporadas pertencentes até então ao gênero *Monília* como *Candida*. O gênero *Candida* é constituído por leveduras com reprodução assexuada, através da formação de blastoconídeos, pseudohifas e, ocasionalmente hifas verdadeiras. Atualmente, está classificado na subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem Moniliales, família Cryptococcaceae. No entanto, espécies como *C. guilliermondii* e *C. krusei* já têm a forma sexuada ou teleomorfa conhecida, e são classificadas na subdivisão Ascomycotina, classe Hemiascomycetes, ordem Endomycetales, família Saccharomycetaceae, gênero *Pichia* e gênero *Issatchenkia*, respectivamente (RIPPON, 1988; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

Estas leveduras são componentes da microbiota de humanos e animais clinicamente saudáveis e são descritos como agentes oportunistas causadores de micoses em todo o mundo. Estão amplamente distribuídas no ambiente e, frequentemente colonizam pele e mucosas, como cavidade oral, trato gastrointestinal e mucosa genital de mamíferos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002; SÓRIA et al., 2002; CLEFF et al., 2005; ANDRADE, 2006).

Quando realizado o exame direto do material clínico serão visualizadas, na forma saпрóbia, leveduras Gram positivas, com tamanho de 2-3x4-6 $\mu$ m, ovaladas e/ou alongadas com brotamento. Em parasitismo serão visualizados blastoconídeos, hifas e pseudohifas. Quando cultivada em ágar Sabouraud dextrose a 35°C tem crescimento em 24-48h, apresentando colônias brilhantes ou opacas, coloração branca a creme, textura cremosa, bordas regulares ou irregulares e odor de levedo. Na microscopia é possível observar blastoconídeos esféricos de 8-12 $\mu$ m ou ovais (6-10x3,6-6 $\mu$ m) com paredes finas, ausência de cápsula, algumas espécies podem apresentar clamidoconídeos terminais ou intercalares (LACAZ et al., 2002).

As principais espécies dentro do gênero são *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. famata* e *C. rugosa* (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; SIDRIM; MOREIRA, 1999). *C. albicans* tem sido isolada da boca, tubo digestivo, intestino, orofaringe, vagina e da pele de indivíduos sadios, principalmente humanos. Sendo assim, a maioria das infecções causadas por esta levedura é de origem endógena. Contudo, mais recentemente, a transmissão exógena, principalmente intra-hospitalar de espécies do gênero, tem sido relatada (GOMPERTZ et al., 2005). Estudos indicam que essas leveduras podem estar presentes nas mãos de agentes da saúde que trabalham em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (NASCENTE et al., 2007) e, também em cateteres umbilicais de recém-nascidos internados na UTI neonatal, alertando sobre a presença destas e a ocorrência de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes internados nestas unidades (FERNANDES et al., 2007).

*Candida albicans* é considerada patógeno oportunista das regiões mucocutâneas, trato digestório e genital de mamíferos e aves, além de estar envolvida em alguns casos de lesões cutâneas, unhas e trato respiratório com potencial para desencadear infecção fúngica sistêmica (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; CLEFF et al., 2007a; CLEFF et al., 2008).

Em animais, as leveduras do gênero *Candida* são isoladas das mucosas vaginal, oral e anal, bem como da pele, meato acústico externo e espaço interdigital, podendo tornar-se patogênicas com o aumento do número de células (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; WILKINSON; HARVEY, 1996; MOREIRA JR, 2001; BRITO et al., 2008). Em cães, *Candida* spp. já foi isolada do tegumento e das mucosas (GUILLOT; CHERMETTE; MAILLARD, 1996; MORETTI et al., 2004;

CLEFF et al., 2005; CLEFF et al., 2007b; BRITO et al., 2008) e *C. krusei* já foi isolada de um tubo de gastrostomia em um felino (BOUTILIER; CARR, 2005). Porém, outras espécies como *C. catenulata*, *C. famata* e *C. intermedia* ainda não foram descritas como parte da microbiota oral de cães. Entretanto, estas leveduras possuem potencial patogênico para desenvolver infecções sistêmicas, principalmente em paciente imunodeprimidos (RADOSAVLJEVIC et al., 1999).

Mesmo não sendo indicativo de doença, a presença da levedura é fundamental para instalação da infecção clínica, sendo que a concentração do microrganismo está relacionada à maior probabilidade de desenvolvimento de qualquer forma de candidíase (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996). Terapia com antineoplásicos, permanência de cateter intravenoso por longo período em pacientes críticos, pacientes neutropênicos e transplantados; alterações das barreiras anatômicas por traumas, queimaduras, cateterismo, ventilação mecânica; circunstâncias que alterem a microbiota normal, como uso de antibióticos de amplo espectro, desequilíbrios nutricionais, doenças auto-imunes e metabólicas, endocrinopatias, uso de antibioticoterapia e glicocorticoterapia indiscriminada ou fármacos indutores de neutropenia, são os responsáveis pelo desenvolvimento dos casos mais graves da doença (FERREIRO et al., 2002; TEIXEIRA; MEZZARI, 2005; GOMPERTZ et al., 2005; CLEFF et al., 2007a).

A candidíase oral é muito comum, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004) e, a espécie mais comumente isolada nestes casos é a *C. albicans*, porém outras espécies podem estar envolvidas (AKPAN; MORGAN, 2002; GOMPERTZ et al., 2005). Em um estudo de Azevedo et al. (1999) leveduras do gênero *Candida* foram encontradas na saliva de 47,4% de indivíduos sem lesão oral, em 81,8% de portadores de lesões orais compatíveis com candidose, em 44,4% pacientes com alguma lesão oral e em 86,4% diretamente das lesões. A ocorrência da cultura pura de leveduras em casos de periodontite apical indica seu potencial patogênico no canal radicular, a capacidade de *Candida* sp. sobreviver em ambiente com nutrientes limitados e a capacidade de resistir a ação dos produtos frequentemente utilizados na endodontia (WALTIMO et al., 2003).

Em pequenos animais, os relatos de candidíase são cada vez mais comuns, sendo descritos casos de piodermatite das pregas labiais, dermatite mucocutânea localizada e disseminada, otites, infecções do trato urinário e infecções sistêmicas

(RAPOSO et al., 1996; MUELLER; BETTENAY; SHIPSTONE, 2002; MORETTI et al., 2004; CLEFF et al., 2007a), casos de infecção oral também já foram descritos (JADHAV; PAL, 2006).

### 2.4.3 Gênero *Trichosporon*

O gênero *Trichosporon* pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família cryptococcaceae (LACAZ et al., 2002). As espécies de *Trichosporon* estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, amostras de água, vegetais e em excrementos de animais, podendo ser isoladas, também, da pele hígida e trato respiratório do homem (LACAZ et al., 2002; WALSH et al., 2004). Em mamíferos e aves, este gênero também já foi isolado (SHAREEF et al., 2008).

Em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol as colônias apresentam-se macroscopicamente de coloração creme, aspecto cremoso com sulcos radiados, com desenvolvimento rápido. Ao exame microscópio, apresentam micélio formado por hifas claras, septadas e ramificadas que formam artroconídeos e blastoconídeos (LACAZ et al., 2002).

Seis espécies do gênero *Trichosporon* têm sido associadas à doença no homem, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides* e *T. ovoides* (SUGITA et al., 1999). *T. beigellii* não é mais considerada como espécie (GOMPERTZ et al., 2005; CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008).

A principal micose superficial relacionada com o gênero *Trichosporon*, é caracterizada pela presença de nódulos claros e pouco aderentes ao pêlo, conhecida como piedra branca (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA; 2004; GOMPERTZ et al., 2005). E a tricosporonose é a doença sistêmica grave, de mau prognóstico que acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, demonstrando que este gênero pode estar envolvido também em infecções sistêmicas (SUGITA; NISHIKAWA; SHINODA, 1998; LACAZ et al., 2002; WOODGYER, 2004; GOMPERTZ et al., 2005), além de infecções cutâneas superficiais (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). Em 2008, SHAREEF e colaboradores descreveram um caso de glossite, em paciente humano, que teve como agente etiológico *T. asahii*. Recentemente, esta mesma espécie foi descrita como um emergente patógeno oportunista causando infecções disseminadas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (LACAZ et al., 2002; WALSH et

al., 2004; WOODGYER, 2004). Na literatura consultada, não foram encontrados relatos de infecção por leveduras do gênero *Trichosporon* em animais, porém já foram isoladas de lavado broncoalveolar de cães hígidos (MELCHERT et al., 2008) e do meato acústico externo de gatos saudáveis (AMARAL et al., 1998).

#### **2.4.4 Gênero *Rhodotorula***

O gênero *Rhodotorula* está classificado na subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcaceae e ordem Cryptococcales. Em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol a 28-37°C, as colônias apresentam-se lisas, mucóides, brilhantes, arredondadas de coloração rósea ao avermelhado devido aos pigmentos carotenóides (BISWAS et al., 2001). Muitas colônias apresentam aspecto mucóide devido à formação da cápsula, enquanto outras são pastosas ou secas e rugosas. Na microscopia observam-se blastoconídeos unicelulares ovóides ou alongados com reprodução por brotamento multilateral. Pseudohifas normalmente estão ausentes, embora algumas espécies possam apresentar até mesmo hifas verdadeiras. Não assimila inositol, hidrolisa a uréia e não possui capacidade fermentativa (LACAZ et al., 2002).

*Rhodotorula* spp. é saprófita de ambientes domésticos e comensal de pele úmida. Pode ser isolada como contaminantes da pele ou de ambientes e são raramente isoladas de material clínico do trato urinário e úlceras (GREENE; CHANDLER, 2006). *R. rubra* e outras espécies raramente têm sido isoladas de pacientes com doença grave no estágio terminal. Entretanto, dos casos registrados, a maioria foi causada pela espécie *rubra*, cuja presença foi observada em infecções fatais de pulmão, rins e SNC (LACAZ et al., 2002; LO RE; FISHMAN; NACHAMKIN, 2003). *Rhodotorula* spp. já foi isolada das mãos de agentes da saúde que trabalham em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (NASCENTE et al., 2007).

Espécies do gênero *Rhodotorula* apresentam-se como leveduras com potencial patogênico emergente (NAVARRO; LAUZURICA; GIMENEZ, 2001). Acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos e, já foi isolado da urina, fezes, pele e cavidade oral de humanos hospitalizados (RIPPON, 1988; KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Em animais, já foi isolado do meato acústico externo (BORNAND, 1992; AMARAL et al. 1998), cavidade oral de cães (BRAGA et al. 2005), mucosa vaginal de gatas (ANDRADE, 2006) e de fêmeas caninas hígidas (CLEFF et al., 2007b) e, da região perianal de cães saudáveis (BRITO et al., 2008).

A correta identificação é necessária para a conduta do tratamento, pois este gênero apresenta-se resistente a alguns antifúngicos como fluconazol e equinocandinas. As infecções com resolução espontânea, em pacientes imunocompetentes, sem uso de antifúngico específico pode sugerir a baixa virulência desta levedura (TUON; COSTA, 2008).

#### **2.4.5 Gênero *Cryptococcus***

Atualmente, o gênero *Cryptococcus* pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, ordem Moniliales, família *Cryptococcaceae* (LACAZ et al., 2002). O principal patógeno do gênero é o *C. neoformans*, porém, existem 19 espécies de *Cryptococcus* e, apesar de raros relatos envolvendo outras espécies com potencial patogênico (MITCHELL; PERFECT, 1995), podemos destacar patógenos oportunistas como *C. albidus*, *C. curvatus*, *C. terreus* e *C. laurentii* (SUGITA et al., 2001). Existem duas variedades do *C. neoformans*, sendo que do ponto de vista epidemiológico, a var. *neoformans* é cosmopolita e frequentemente isolada das excretas ressecadas de aves, especialmente pombos urbanos (*Columba livia domestica*) (ELLIS; PFEIFFER, 1990; LEVITZ, 1991), enquanto a var. *gattii* mostrou ter uma associação com várias espécies de eucaliptos (ELLIS; PFEIFFER, 1990; KWON-CHUNG; BENNET, 1992; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em humanos, a criptococose é considerada uma micose oportunística que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos (LACAZ et al., 2002). O primeiro caso de criptococose em pequenos animais foi descrito por Holzworth em 1952 em um gato doméstico e até hoje é considerada a micose sistêmica mais comum dentre as que acometem felinos (GROGAN; HART, 1997, LARSSON et al., 2003). Apesar de ser uma doença ainda pouco diagnosticada, o número de relatos vem crescendo nos últimos anos (HONSHO et al., 2003; LARSSON et al., 2003; THOMSON; MIRANDA; SILVA, 2006).

A espécie *C. albidus* é também sapróbia, encapsulada, porém raramente está associada a casos clínicos. Em cães, já foram descritos dois casos de infecção sistêmica pelo agente e um caso de pielonefrite (NEWMAN; LANGSTON; SCASE, 2003; LABRECQUE; SYLVESTRE; MESSIER, 2005; KANO et al., 2008). Também há relatos de casos esporádicos da infecção por *C. albidus* em humanos, cavalo e felino (GLUCK; MYERS; PASS, 1987; LOISON; BOUCHARA; GUÉHO, 1996). Em

cães, *C. laurentii* já foi isolado de seis (13,1%) pacientes com otite externa (BERNARDO; MARTINS; MARTINS, 1998).

## 2.5 Anti-sépticos orais

Devido à aproximação, cada vez maior, do proprietário com seu animal de estimação, a preocupação com a saúde oral em pequenos animais vem ganhando maior importância nos últimos anos. Os anti-sépticos orais são agentes antimicrobianos usados para reduzir a microbiota oral e, conseqüentemente a placa dental. Entretanto, deve-se ter em mente que estes produtos possuem efeito limitado e transitório, pois reduzem a carga bacteriana oral, porém não têm capacidade de remover a placa e o cálculo dentário (GIOSO; CARVALHO, 2004).

O principal anti-séptico utilizado em animais é a clorexidina, mas existem outros compostos disponíveis no mercado, como os compostos de amônia quaternária, compostos fenólicos, iodo polivinil-pirrolidona e triclosan (GIOSO; CARVALHO, 2004). A aplicação de anti-sépticos bucais pode ser considerada ao menos como uma medida preventiva, assim como alternativa ou complemento na terapia de enfermidades da cavidade oral, principalmente as candidoses em humanos (CANDIDO; AZEVEDO; ITO, 1996).

### 2.5.1 Clorexidina

A clorexidina, dentre os anti-sépticos orais utilizados na clínica de pequenos animais, é um dos produtos mais eficazes, pois possui efeito bactericida imediato, poder de retenção, período de ação de 12h, dentre outras vantagens (HENNET, 2002; GIOSO; CARVALHO, 2004). Em humanos, a clorexidina também é um dos produtos mais comumente utilizados como anti-séptico bucal, anti-placa e no controle de doenças periodontais (TOMÁS et al., 2008).

Um estudo realizado em humanos, para determinar a concentração inibitória mínima de três anti-sépticos bucais frente a *C. albicans* isoladas da cavidade oral, demonstrou que o produto cujo princípio ativo é a clorexidina (Periogard<sup>®</sup>-Colgate) foi mais efetivo, em concentrações relativamente baixas (6,4µg/mL), o que demonstra sua possível aplicação na prevenção de candidoses bucais. Nesta concentração, os produtos Malvona<sup>®</sup>-Primá e Cepacol<sup>®</sup>-Merrel, cujo princípio ativo é o cloreto de cetilpiridínio, inibiram 30% e 0% das cepas, respectivamente. Para estes

produtos a concentração que ocorreu inibição de todas as cepas testadas foi 25,6µg/mL (CANDIDO; AZEVEDO; ITO, 1996).

Waltimo et al. (1999) avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de 0,5% de acetato clorexidina que mostrou-se efetiva em cinco minutos e, a concentração de 0,05% foi efetiva em 1h, frente à *C. albicans* isolada da cavidade oral de humanos utilizando a técnica em disco de papel filtro, previamente sensibilizado com a levedura mergulhada nas soluções das diferentes concentrações e em diferentes tempos de incubação a 37°C.

O estudo de Meiller et al. (2001) avaliou a atividade antimicrobiana de três produtos comerciais de uso odontológico e 0,2% de digluconato de clorexidina, sendo um dos produtos a base de 0,12% de digluconato de clorexidina, todos foram testados frente a diferentes espécies de *Candida* através da macrodiluição. Observaram que estes produtos podem auxiliar no controle de fungos patogênicos investigados e reduzir a colonização oral por esses microrganismos.

Foi comparado o efeito bactericida frente a bactérias da microbiota salivar de humanos a duas concentrações de digluconato de clorexina (0,2% *versus* 0,12%). As amostras de saliva foram colhidas depois de 30 segundos e 1h da utilização dos enxaguatórios bucais e posteriormente diluídas e semeadas para contagem de UFC/mL, sendo observada uma redução do total de bactérias, principalmente anaeróbias obrigatórias, porém esta atividade antibacteriana do digluconato de clorexidina 0,2% foi maior e somente esta concentração foi bactericida contra bactérias anaeróbias obrigatórias (TOMÁS et al., 2008).

Machado et al. (2007) estudaram o efeito da escovação dos dentes duas vezes/dia com o gel de clorexidina a 0,2% no controle da gengivite e *Candida* spp. em crianças HIV positivo, demonstrando que a terapia foi eficaz após 21 dias de uso e que o intervalo de 35 dias sem tratamento foi suficiente para aumentar significativamente a frequência de gengivite e *Candida* spp. nestes pacientes. Estudos *in vivo* também demonstram que a utilização da clorexidina é capaz de reduzir a gengivite em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico (JAMILIAN, et al., 2008).

Dentre os anti-sépticos orais utilizados na clínica de pequenos animais, a clorexidina é o produto mais eficaz, pois possui efeito bactericida imediato, poder de retenção, período de ação de 12h, dentre outras vantagens (HENNET, 2002;

GIOSO; CARVALHO, 2004). Existem ainda formulações que contêm clorexidina na linha dermatológica em pequenos animais. Além disso, é um potente anti-séptico indicado na desinfecção de material cirúrgico, instalações como estábulos, ordenhadeiras, laticínios e abatedouros e em instalações veterinárias como hospitais, clínicas, canis, gatis e centrais de inseminação.

### 2.5.2 Cloreto de Benzalcônio

O cloreto de benzalcônio está presente em formulações de anti-sépticos orais para pequenos animais apesar de ser um desinfetante à base de amônia quaternária com ação bactericida e amplo espectro de ação, o qual possui recomendação para desinfecção de utensílios e equipamentos em atividades leiteiras, indústrias avícolas, pecuária, haras, canis e gatis. Existem ainda, em medicina veterinária, solução oftálmica, deo-colônia e solução bucal para pequenos animais (CPVS, 2009), porém, na literatura consultada, não foram encontrados estudos científicos demonstrando a eficiência e toxicidade deste composto quando utilizado como anti-séptico bucal. Este composto também é utilizado em medicina humana como descongestionante nasal, contudo estudos indicam que o uso deste medicamento pode agravar problemas respiratórios (O ESTADO DO PARANÁ, 2008) e, quando foram avaliados os efeitos genotóxicos e citotóxicos *in vitro* em diferentes concentrações (variando de 0,002% a 0,05%) do cloreto de benzalcônio através da exposição de cultura celular por duas horas, revelaram que concentrações empregadas nos produtos comerciais nasais causaram danos no DNA das células epiteliais do trato respiratório (DEUTSCHLE et al., 2006). Foi relatado caso fatal de envenenamento, em humano, pela ingestão de cloreto de benzalcônio a 10% utilizado na desinfecção de ambientes (HITOSUGI; MARUYAMA; TAKATSU, 1998).

Cloreto de benzalcônio a 0,5% demonstrou atividade desinfetante contra espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, porém foi relativamente ineficaz contra *Aspergillus ochraceus* (GUPTA; AHMAD; SUMMERBELL, 2002).

### 2.5.3 Própolis

Por centenas ou milhares de anos a própolis vem sendo bastante utilizada em medicina humana para curar infecções (SANTOS et al., 2002).

Vários estudos têm mostrado que a própolis apresenta ação antibacteriana, antiinflamatória (DÍAZ et al., 1997), antifúngica (NETO, 2004) dentre outras. E, além disso, é capaz de estimular o sistema imune (FISCHER et al., 2007). Foi demonstrado *in vitro* através do método de diluição em ágar que, bactérias orais anaeróbias foram sensíveis aos extratos de própolis provenientes de diferentes regiões com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) que variaram de 4 a 512 mg/mL. Extratos etanólicos de própolis foram mais eficientes contra amostras de bactérias anaeróbias Gram positivas do que Gram negativas isoladas da cavidade oral de humanos (KORU et al., 2007) e, considerando a crescente resistência de bactérias anaeróbias à terapia antimicrobiana, a própolis pode ser considerada na terapia de doenças da cavidade oral (SONMEZ et al., 2005; KORU et al., 2007).

No estudo de Ferreira et al. (2007) foi demonstrada a atividade antibacteriana do extrato de etanol de própolis frente a patógenos endodônticos como, *Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*. Também foi testada a suscetibilidade *in vitro*, através da difusão em ágar, de bactérias bucais contra diferentes tinturas fitoterápicas, dentre elas a própolis. As bactérias testadas foram *Streptococcus mutans*; *Streptococcus sobrinus*; *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*; *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus casei*. Com relação à tintura de própolis foi observada diluição inibitória máxima de 1:32 para *S. aureus*, 1:16 para *S. mutans* e *S. sobrinus*, 1:8 para *L. casei* e 1:4 para *S. sanguis* e *S. mitis*, demonstrando atividade antibacteriana frente a todos isolados, porém em diferentes diluições (SOARES et al., 2006).

Leveduras como, *C. tropicalis* e *C. albicans* demonstraram sensibilidade a baixas concentrações de própolis *in vitro* através do método de diluição em ágar (SFORCIN et al., 2001). Azevedo et al. (1999) isolaram e identificaram leveduras da cavidade oral de humanos com e sem lesão e também estudaram a atividade antifúngica frente a estas levedura através da técnica de diluição em meio sólido de dois produtos comerciais, um contendo extrato alcólico de própolis 10g% e o outro com 0,12% de clorexidina para determinar a Diluição Inibitória Máxima (DIM). A contagem de UFC total/mL de saliva demonstrou um valor médio no grupo com

candidose bucal ( $171,5\% \times 10^3$ ) maior do que no controle ( $72,6 \times 10^3$ ) e portadores de anormalidade ( $8,3 \times 10^3$ ). A maioria das leveduras (95,7%) foi sensível aos anti-sépticos, sendo que o extrato alcólico de própolis apresentou DIM igual a 1:20 para 77,1% e, a clorexidina uma DIM de 1:160 para 60% cepas de cavidades sadias; semelhante ao obtido com cepas de lesões bucais. Resultados diferentes ocorreram, principalmente, entre as diferentes espécies. Os resultados indicam a possibilidade de se empregar os anti-sépticos, como a própolis e a clorexidina, na prevenção e terapia da candidose bucal.

O produto natural própolis foi capaz de inibir espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *C. kefyr*, tanto *in vitro* através de difusão em ágar como *in vivo* na redução de *C. albicans* da cavidade oral de ratos (NETO, 2004). Os resultados de um estudo preliminar realizado por Williams (2005) sugerem que o extrato de própolis pode ser eficaz no tratamento da candidíase oral, além disso, parece ser tão eficaz quanto o tratamento com a nistatina. Apesar dos resultados satisfatórios em odontologia humana, não foram encontrados estudos científicos *in vitro* e/ou *in vivo* indicando o uso da tintura de própolis como anti-séptico bucal em pequenos animais.

### 3 Material e métodos

Durante o período de seis meses foi estudada a presença de leveduras na cavidade oral de fêmeas caninas, bem como foi avaliada a suscetibilidade *in vitro* de diferentes espécies isoladas frente a anti-sépticos orais utilizados na rotina odontológica de pequenos animais e seus princípios ativos separadamente.

#### 3.1 Animais

Foram avaliadas 59 fêmeas caninas, errantes, SRD, com idades desconhecidas, que foram divididas em três grupos conforme avaliação da arcada dentária, sendo o Grupo 1 com animais de zero a dois anos, o Grupo 2 com animais de três a cinco anos e o Grupo 3 com animais de seis anos ou mais. Todas as fêmeas eram provenientes do município de Pelotas/RS e encaminhadas no Hospital Universitário de Clínicas Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (HUCV-UFPel) para ovário-histerectomia eletiva. Assim que os animais chegavam ao HUCV-UFPel passavam por exame clínico geral e coleta de sangue para hemograma pré-operatório. Para o presente estudo os animais foram selecionados aleatoriamente conforme liberação do centro cirúrgico.

As amostras da cavidade oral foram obtidas de três sítios anatômicos distintos, como mucosa gengival, biofilme dental e sulco periodontal, com diferentes formas de coletas, como *swab*, cureta, sonda periodontal milimetrada<sup>1</sup> e ponta de membrana HA em éster de celulose<sup>2</sup>, sendo todo o procedimento de colheita realizado no pós-cirúrgico imediato. Todas as fêmeas foram acompanhadas com fichas de identificação (Apêndice A). A alimentação que os animais recebiam durante o tempo que permaneciam no HUCV-UFPel era a base de rações

---

<sup>1</sup> ABC Instrumentos Cirúrgicos LTDA – São Paulo

<sup>2</sup> Millipore® Indústria e Comércio LTDA – Alphaville, Barueri, São Paulo

comerciais adequada ao peso corporal e água *ad libitum*, também eram realizados passeios diários com os animais.

### **3.1.1 Conformidade cranial**

Todas as fêmeas eram SRD, porém todas foram classificadas quanto à conformidade cranial em braquicefálicos, dolicocefálicos e mesocefálicos.

### **3.1.2 Avaliação da cavidade oral**

A avaliação clínica da cavidade oral foi realizada com as pacientes previamente anestesiadas, no pós-cirúrgico imediato. Foram analisadas quanto à presença de cálculo dentário, fraturas dentárias, maloclusão, halitose e sangramento gengival.

#### **3.1.2.1 Mensuração da profundidade de sulco periodontal**

A mensuração da profundidade do sulco periodontal foi realizada introduzindo-se a sonda periodontal milimetrada por toda a face vestibular dos dentes 4º pré-molar superior direito (4ºPMSD) e canino superior esquerdo (CSE), de cada animal. As variáveis analisadas e alterações com as quais foram comparadas estão descritas na tab. 1.

Tabela 1 – Idade, conformidade cranial, profundidade de sulco periodontal e alterações encontradas na cavidade oral de fêmeas caninas as quais foram avaliadas estatisticamente

<b>Variáveis</b>	<b>Alterações da cavidade oral</b>
<b>Idade</b>	fratura dentária
Grupo 1	cálculo dentário
Grupo 2	sangramento gengival
Grupo 3	halitose
	média da profundidade de sulco periodontal
<b>Conformidade cranial</b>	fratura dentária
Dolicocefálicos	cálculo dentário
Mesocefálicos	sangramento gengival
	halitose
	Maloclusão
	média da profundidade de sulco periodontal
<b>Profundidade sulco periodontal</b>	fratura dentária
	cálculo dentário
	sangramento gengival
	halitose

### 3.1.3 Colheita das amostras

Durante o período do estudo, foram avaliados 59 animais e colhidas 413 amostras obtidas de três sítios anatômicos distintos da cavidade oral, como mucosa gengival, biofilme dental e sulco periodontal dos dentes 4ºPMSD e CSE, com diferentes formas de colheita, totalizando sete coletas por animal.

### 3.1.4 Métodos de colheita das amostras

A colheita de material da mucosa gengival foi realizada através de duas técnicas, sendo a Técnica 1 primeiramente com *swab* estéril seguida de cureta (Fig. 2) e a Técnica 2 primeiramente com cureta estéril seguida de *swab*. A amostra do biofilme dental, colhida através da fricção de cureta estéril, era proveniente do canino superior (esquerdo ou direito aleatoriamente) (Fig. 3). Do sulco periodontal foram colhidas duas amostras, de ambos os dentes: 4ºPMSD e CSE, diretamente com sonda periodontal milimetrada<sup>1</sup> estéril (Fig. 4) e através da ponta de membrana HA em éster de celulose esterilizadas que foram introduzidas nos respectivos sulcos dentários (Fig. 5). Na tab. 2, estão descritos os locais de colheita e métodos utilizados para obtenção das amostras.

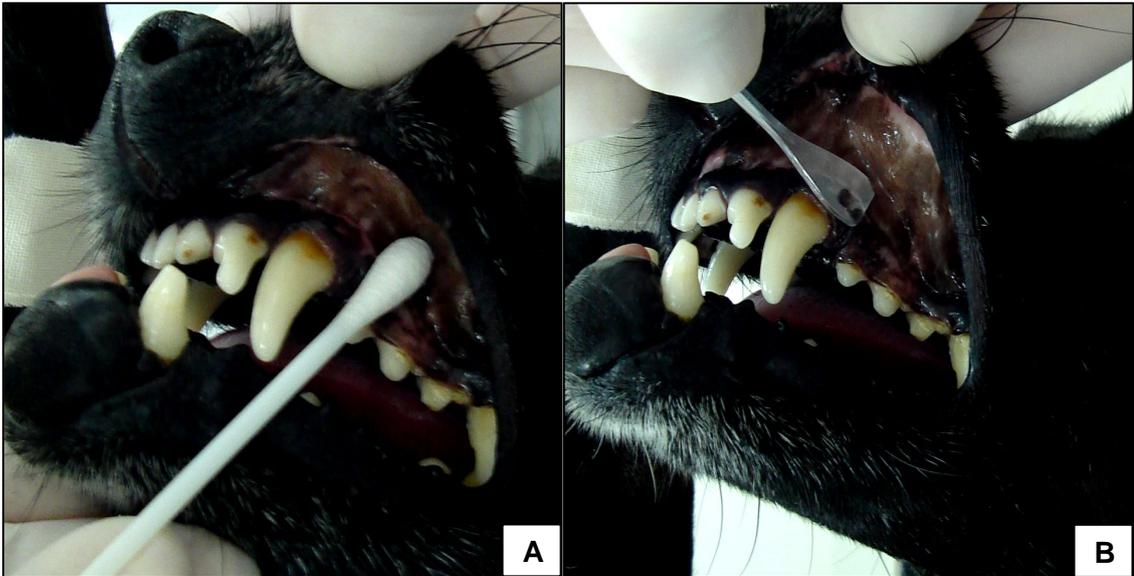


Figura 2 – Colheita de material da mucosa gengival através de *swab* estéril (A) seguida de cureta (B), conforme técnica 1

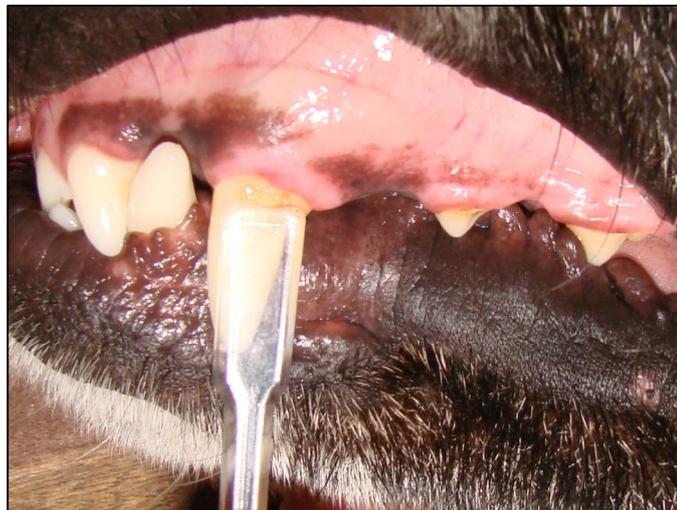


Figura 3 – Colheita de material do biofilme através de raspagem do dente canino superior

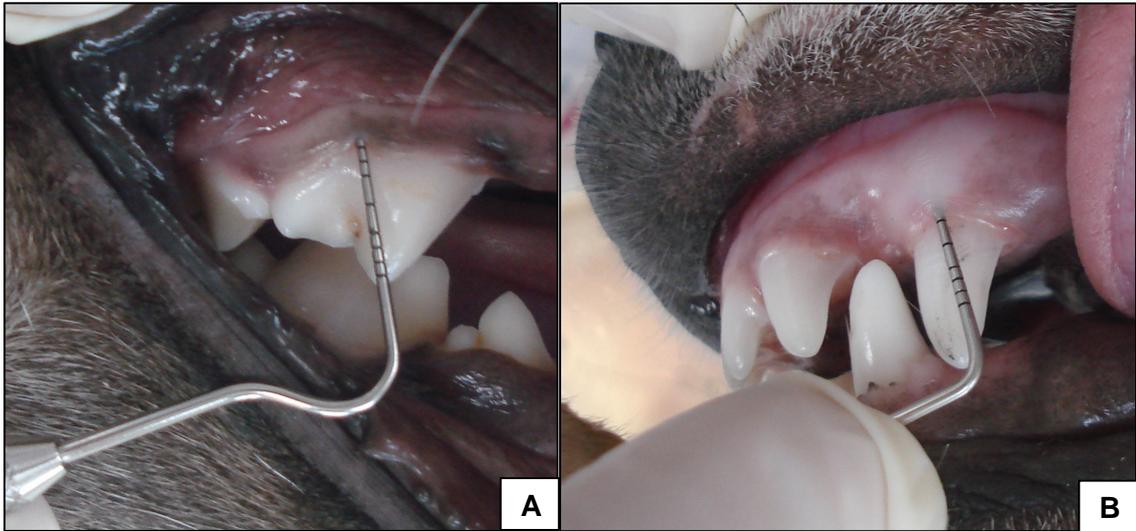


Figura 4 – Demonstração da mensuração da profundidade de sulco e colheita de amostras com sonda periodontal milimetrada dos dentes 4ºPMSD (A) e CSE (B)

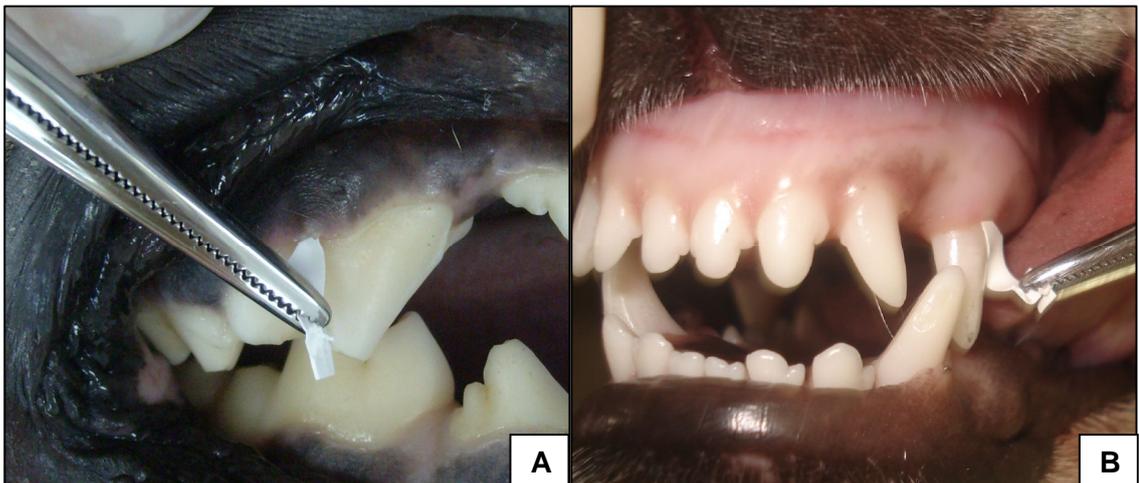


Figura 5 – Colheita das amostras do sulco periodontal dos dentes 4ºPMSD (A) e CSE (B) através de ponta de membrana HA em ésteres de celulose

Tabela 2 – Descrição dos locais e diferentes formas de colheitas utilizadas na obtenção das amostras dos diferentes sítios da cavidade oral de fêmeas caninas

<b>Local de coleta (método utilizado)</b>	<b>Amostras n</b>
Mucosa gengival ( <i>swab</i> )	59
Mucosa gengival (cureta)	59
Biofilme* (cureta)	59
4°PMSD (sonda milimetrada)	59
4°PMSD (membrana HA de celulose)	59
CSE (sonda milimetrada)	59
CSE (membrana HA de celulose)	59
<b>Total</b>	<b>413</b>

\*as amostras provenientes do biofilme foram colhidas do canino superior esquerdo ou direito escolhido aleatoriamente

### 3.2 Processamento das amostras

As amostras provenientes dos diferentes sítios da cavidade oral foram imediatamente semeadas em placas de Petri contendo meio de cultivo ágar Sabouraud dextrose<sup>1</sup> com cloranfenicol acrescido de azeite de oliva e, incubadas a 36°C por até dez dias, com observação diária, para posterior identificação.

#### 3.2.1 Manutenção das amostras

As amostras que apresentavam características morfológicas compatíveis com o gênero *Malassezia* foram repicadas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e mantidas em temperatura ambiente. Para a manutenção e caracterização dos gêneros *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* foram realizadas subculturas em placas contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, sendo os cultivos, posteriormente, refrigerados. As amostras eram observadas periodicamente e repicadas com intervalos mensais até completa identificação.

<sup>1</sup> Sabouraud Dextrose Agar®, Acumedia Manufacturs, Neogen Corporation, Lansing, Michigan.

### **3.3 Identificação das leveduras isoladas**

As diferentes colônias foram estudadas quanto aos aspectos macro e micromorfológicos, bem como as características fisiológicas e bioquímicas.

#### **3.3.1 Características macromorfológicas**

A caracterização macromorfológica das colônias leveduriformes foi realizada através da observação destas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol acrescido de azeite de oliva e ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol. Foram avaliadas características do verso e reverso das colônias, bordas, consistência, coloração, textura e formação de halos.

#### **3.3.2 Características micromorfológicas**

Para avaliação dos aspectos micromorfológicos foi realizado exame direto através de esfregaço dos cultivos corado pelo método de Gram com posterior visualização com objetiva de 100X e óleo de imersão. Esta etapa foi realizada em busca de células com morfologia compatível com leveduras. As características observadas foram quanto ao tipo de brotamento, presença ou não de micélio e presença ou ausência de cápsula.

### **3.4 Caracterização dos gêneros e espécies isolados**

#### **3.4.1 *Malassezia* spp.**

As amostras compatíveis macro e micromorfológicamente com o gênero *Malassezia* foram avaliadas quanto às características bioquímicas como crescimento em meio de cultura sem adição de ácidos graxos de cadeia longa, para comprovação da não-lipodependência e através dos testes de produção de urease e catalase.

#### **3.4.2 *Rhodotorula* spp.**

Para as leveduras do gênero *Rhodotorula* utilizou-se a identificação as características macro e micromorfológicas das colônias, os testes bioquímicos como produção de urease e o teste do inositol.

### 3.4.3 Reação da catalase

A reação de catalase, que detecta a presença desta enzima, foi avaliada a partir da reação de uma alçada da colônia em estudo obtida através de subcultura de 24-48h, com uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% em uma lâmina de microscopia. Nos casos positivos, o contato produz O<sub>2</sub> e apresenta formação de bolhas.

### 3.4.4 Hidrólise da uréia

O teste da hidrólise da uréia foi realizado através da semeadura, com auxílio da alça de platina, do inóculo da levedura com 24h em meio sólido de Christensen<sup>1</sup>. O material foi incubado a 36°C por 48h com observação da troca da coloração do meio provocada pelo marcador de pH, quando ocorre a hidrólise. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram mudança da coloração inicial, de amarela para rosa.

### 3.4.5 Assimilação de carboidrato

Para identificação do gênero *Rhodotorula* realizou-se a técnica de assimilação, utilizando-se inositol como fonte de açúcar.

### 3.4.6 *Candida* spp., *Trichosporon* spp. e *Cryptococcus* spp.

Para a identificação presuntiva de *Candida albicans* foi realizado teste do tubo germinativo. As espécies dos gêneros *Candida*, *Trichosporon* e *Cryptococcus*, incluindo as espécies que formaram tubo germinativo, foram identificadas através do sistema padronizado ID 32C<sup>2</sup> para identificação de leveduras.

### 3.4.7 Prova do tubo germinativo

Para a prova do tubo germinativo foram utilizadas subculturas de colônias com 24h. De cada isolado foi feita, de forma asséptica, uma suspensão com uma alçada da colônia em 0,5 ml de soro equino e, incubou-se a 36°C por 2-3h em estufa bacteriológica. Após este período, com uma gota desta suspensão, montou-se uma preparação entre lâmina-lamínula. Foram considerados positivos os casos em que

---

<sup>1</sup> Bacto-urea Broth. Difco Laboratories, USA.

<sup>2</sup> ID32C<sup>®</sup> - bioMérieux, Marcy-l'Etoile/France.

ocorreu formação de filamento fino e cilíndrico originado da levedura, sem constrição.

### **3.4.7 Identificação através do sistema ID 32C**

Para identificação das leveduras através do sistema ID32C com leitura e interpretação automatizada, contou-se com a colaboração do Laboratório de Micologia do Hospital Santa Rita da Santa Casa – Complexo Hospitalar de Porto Alegre-RS. O sistema ID32C possui 32 testes de assimilação e uma base de dados. As leveduras a serem identificadas foram subcultivadas em meio sólido (ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol) a 25°C por 24h. Os inóculos foram preparados com as colônias de 24h em NaCl 0,85%<sup>1</sup> e ajustados na escala 2,0 de McFarland no densitômetro. Após foram adicionados 250µl do inóculo no meio C. Para preenchimento da galeria, onde se encontram os açúcares a serem testados, a pipeta foi calibrada para distribuição de 135µl desta suspensão (Fig. 6). As galerias foram fechadas e identificadas com número do isolado e horário de incubação a 30°C. A primeira leitura e interpretação automatizada através do aparelho ATB<sup>TM</sup> Expression<sup>TM2</sup> (Fig. 7) era realizada em 24h e quando não obtinha-se uma excelente identificação da levedura em estudo, a galeria era novamente incubada por 48 ou 72h. Quando a identificação ao final das 72h não era satisfatória, todo procedimento era repetido.

---

<sup>1</sup> API<sup>®</sup> Suspension Medium – bioMérieux SA, Marcy-l’Etoile/France.

<sup>2</sup> ATB<sup>TM</sup> Expression<sup>TM®</sup> - bioMérieux SA, Marcy-l’Etoile/France.

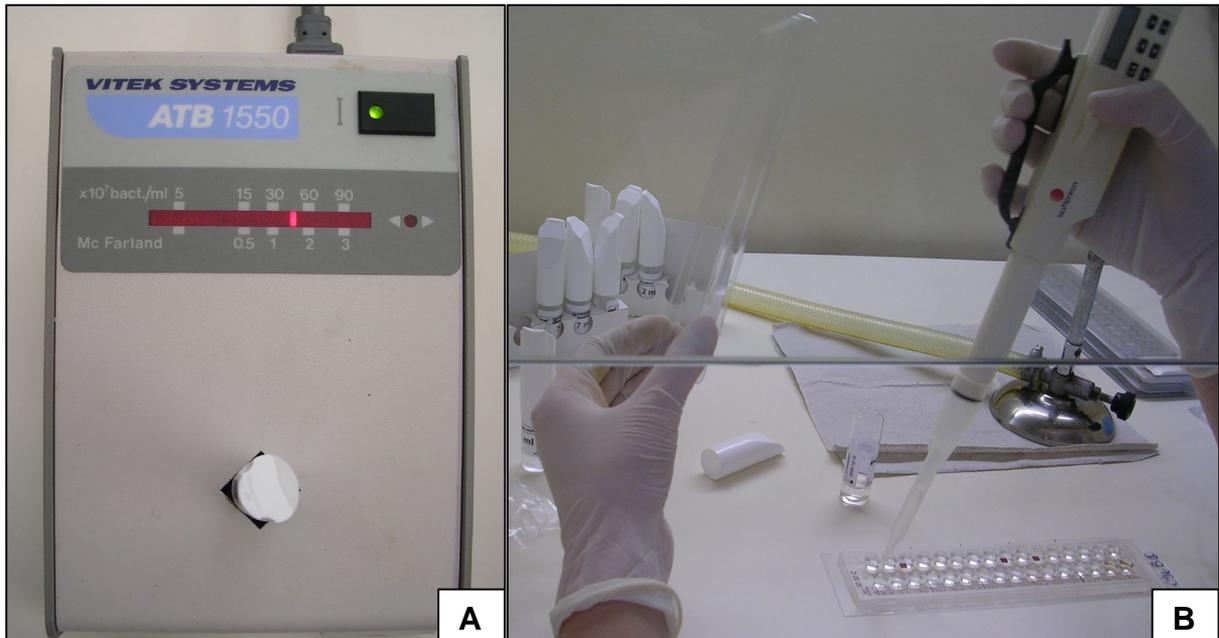


Figura 6 – Ajuste do inóculo na escala 2,0 de McFarland através do densitômetro (A) e preenchimento da galeria para posterior incubação (B)



Figura 7 – Demonstração do aparelho ATB<sup>TM</sup> Expression<sup>TM</sup> utilizado para leitura automatizada na identificação das leveduras isoladas da cavidade oral

### 3.5 Teste de suscetibilidade *in vitro*

O teste de sensibilidade *in vitro* para as leveduras foi realizado através da técnica de Microdiluição em Caldo (MC), preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (antigo NCCLS) de acordo com o documento de referência M27A2, com algumas modificações para *M. pachydermatis* e uso de anti-sépticos.



### 3.5.2 Leveduras utilizadas no teste *in vitro*

Para realização do teste de suscetibilidade *in vitro* foram utilizados 15 isolados provenientes de três sítios distintos da cavidade oral de fêmeas caninas do município de Pelotas-RS.

### 3.5.3 Preparação dos inóculos

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens, com crescimento de 24h em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol a 36°C, após foram suspensos em 5mL de solução salina estéril e homogeneizados. Esta suspensão do inóculo foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland que corresponde a um inóculo inicial de aproximadamente  $5 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. Após, foi preparado uma diluição de 1:50 transferindo-se 100µl desta suspensão para 4,9mL de solução salina estéril e, a diluição de 1:20 foi através da transferência de 250µl da suspensão anterior em 4,75mL de meio RPMI-1640. Esta última diluição do inóculo foi dispensada em alíquotas de 100µl nos poços, contendo previamente 100µl dos produtos a serem testados e suas diluições. Quanto às cepas de *M. pachydermatis*, utilizou-se Sabouraud dextrose líquido para preparação dos inóculos, bem como para preenchimento dos poços utilizados no teste (EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003). As diluições, para esta espécie, foram preparadas conforme descrito anteriormente para as demais cepas.

### 3.5.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A leitura do teste de suscetibilidade *in vitro* foi realizada em 24, 48 e 72 horas após a incubação, quando foi realizada comparação visual do crescimento da levedura nos poços do controle positivo com o crescimento nos poços referentes aos produtos A e B e às diferentes concentrações dos compostos testados. A menor concentração capaz de produzir proeminente inibição (50%) do crescimento da levedura em relação ao poço controle-positivo foi identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima) do produto para aquela amostra.

### **3.5.5 Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Para confirmação dos resultados obtidos através da CIM, uma alíquota de 5 $\mu$ L de todos os pocinhos de todas as concentrações e produtos testados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. As placas permaneceram incubadas a 36°C por 48h quando foi realizada leitura.

### **3.6 Análise estatística**

Os dados foram analisados através do pacote estatístico “Statistix 8.0”, sendo utilizado teste qui-quadrado para diferenciar formas de coleta, relação entre as alterações encontradas na cavidade oral e relação entre as alterações e ocorrência de isolamento de leveduras. Análise de variância com delineamento completamente casualizado e teste de Tukey foram utilizados para comparação de média da profundidade de sulco.

## **4 Resultados**

### **4.1 Avaliação da cavidade oral**

Foram avaliados 59 animais selecionados aleatoriamente entre fêmeas caninas encaminhadas ao HUCV-UFPel para ovário-histerectomia eletiva. As características analisadas foram idade, conformação cranial e alterações na cavidade oral. Quanto à idade, os animais foram divididos em três grupos, no grupo 1, com 19 (32,2%) animais, as idades variaram de zero a dois anos, no grupo 2, composto por 24 (40,68%) animais, de três a cinco anos e no grupo 3, com 16 (27,12%) animais, com seis anos ou mais.

Com relação aos tipos cranianos, os animais foram divididos em três grupos, os braquicefálicos (dois animais), dolicocefálicos (13 animais) e mesocefálicos (44 animais). Porém, o grupo braquicefálicos apresentou apenas dois representantes, não sendo avaliado estatisticamente.

Na avaliação da cavidade oral foi encontrada presença de cálculo dentário em 46 animais (77,97%), fratura dentária em 18 (30,51%), maloclusão em 14 (23,73), halitose em sete (11,86%), sangramento gengival em sete (11,86%) e na mensuração profundidade de sulco gengival dos dentes 4º pré-molar superior direito e canino superior esquerdo, foi encontrada média de 2mm para ambos os dentes. Na Fig. 9 estão demonstradas as alterações encontradas na cavidade oral das fêmeas caninas.

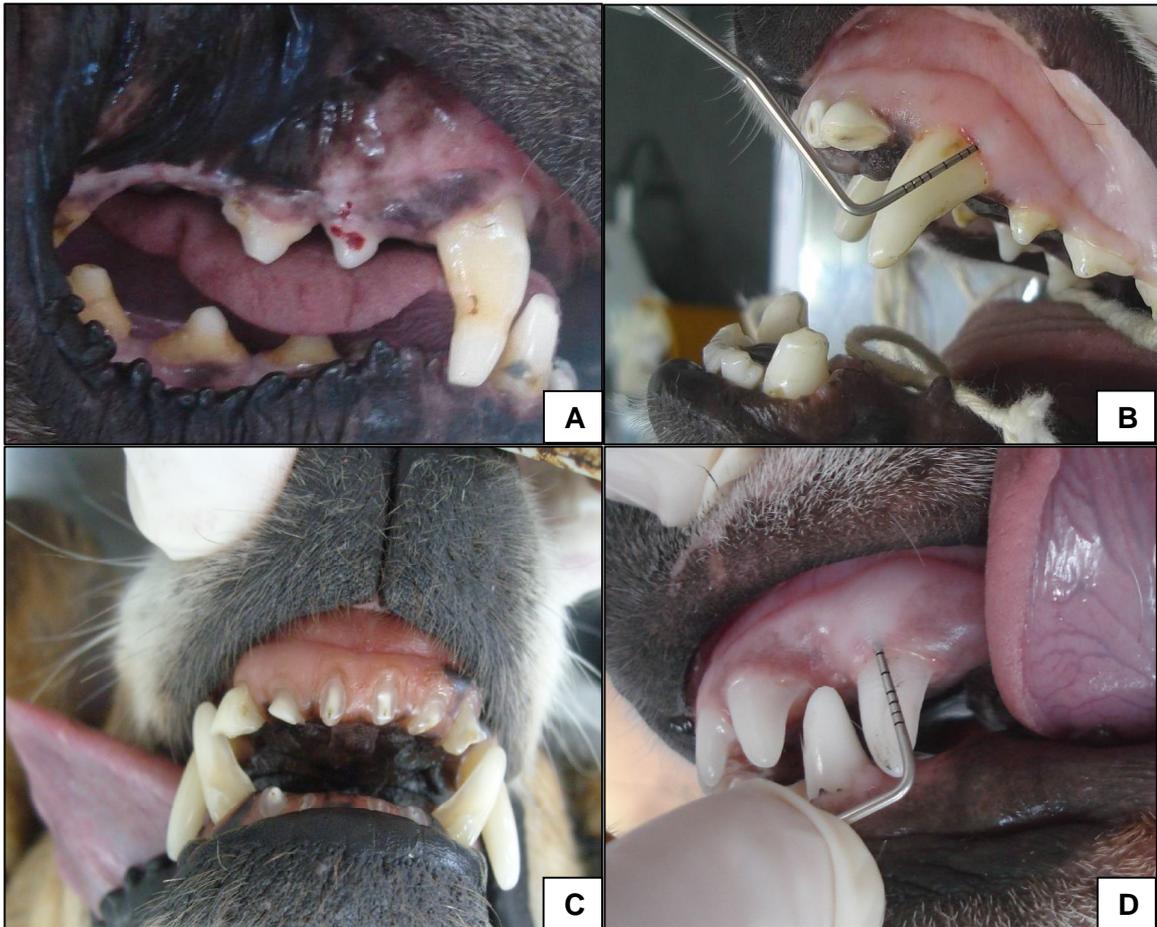


Figura 9 – Presença de cálculo dentário e sangramento gengival (A), fratura dentária nos caninos inferiores (B), maloclusão, atrito entre os caninos e desgaste de incisivos (C) e mensuração da profundidade de sulco (2,5mm) do canino superior esquerdo (D)

Ao relacionar a idade com a presença de fraturas, observou-se diferença significativa ( $p=0,0030$ ) dos animais que tinham fratura do grupo 3 (16,94%) em relação aos do grupo 2 (10,17%) e do grupo 1 (3,39%). Quanto à presença de cálculo dentário com relação à idade, foi observada diferença estatística significativa ( $p=0,0000$ ) entre os grupo 1 (11,86%) e os grupos 2 (38,98%) e 3 (27,12%), sendo que o grupo 1 apresentou menor frequência de cálculo dentário que os outros dois grupos. Quanto à presença de sangramento gengival com relação à idade, também foi encontrada diferença estatística significativa ( $p=0,0136$ ) entre o grupo 3 (8,47%) e os grupos 2 (3,39%) e 1 (não foi encontrado sangramento gengival em nenhum animal deste grupo). Entretanto, quanto à relação entre halitose e idade, não houve diferença significativa ( $p=0,5150$ ).

Quando relacionado tipo de crânio com presença de fratura, presença de cálculo dentário, halitose, sangramento gengival e maloclusão não houve diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ). Assim como, na comparação entre as médias de profundidade de sulco que foi 2mm no 4ºPMSD e também no CSE. Em apenas dois (3,39%) sulcos do 4ºPMSD e um (1,69%) do CSE a profundidade foi superior a 3mm, não houve diferença estatisticamente significativa com relação á conformidade cranial, idade, cálculo dentário, fratura, halitose e sangramento gengival. Na relação entre o número de locais de isolamento com idade, conformidade cranial, presença de fratura, presença de cálculo dentário, halitose, sangramento gengival e maloclusão também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ).

#### 4.2 Metodologia de colheita

Foi realizada coleta em 59 (100%) fêmeas caninas de três diferentes sítios da cavidade oral, totalizando sete formas de coleta.

As coletas da mucosa gengival foram realizadas através de duas técnicas, com cureta e *swab* estéreis nos 59 animais, porém, de 30 cães a coleta foi primeiramente com *swab* (Técnica 1) e, em 29 primeiramente com cureta (Técnica 2). A coleta prévia com qualquer uma das duas técnicas reduziu significativamente a possibilidade de isolamento com a segunda técnica utilizada. Em apenas dois casos houve o isolamento de microrganismo na segunda coleta que não haviam sido obtidos na primeira técnica. A relação do número de isolamentos com a sequência de técnicas utilizadas estão descritas nas tab. 3 e tab. 4.

Tabela 3 – Relação do número de fêmeas caninas com isolamento de leveduras da mucosa gengival através da técnica 1 (coleta com *swab* antes da cureta)

<b>Cureta</b> <b>Swab</b>	Isolamento n(%)	Sem isolamento n(%)	Total n(%)
Isolamento n(%)	4(13,33)	6(20,0)	10(33,33)
Sem isolamento n(%)	-	20(66,67)	20(66,67)
<b>Total n(%)</b>	4(13,33)	26(86,67)	30(100)

Tabela 4 – Relação do número de fêmeas caninas com isolamento de leveduras da mucosa gengival através da técnica 2 (coleta com cureta antes do swab)

<b>Swab</b> \ <b>Cureta</b>	Isolamento n(%)	Sem isolamento n(%)	<b>Total n(%)</b>
Isolamento n(%)	1(3,45)	-	1(3,45)
Sem isolamento n(%)	7(24,14)	21(72,41)	28(96,55)
<b>Total n(%)</b>	8(27,59)	21(72,41)	29(100)

As populações selecionadas para cada sequência de coleta foram alocadas aleatoriamente. Para análise da prevalência de isolamentos de leveduras da mucosa gengival considerou-se apenas a primeira coleta, 30 com swab (Técnica 1) e 29 com cureta (Técnica 2), e neste caso não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,63$ ) entre elas, observando-se a prevalência de 33,33% ( $n=10$ ) na coleta com swab (Técnica 1) e 27,59% ( $n=8$ ) na coleta com cureta (Técnica 2). Os dados referentes aos isolamentos de acordo com a técnica estão descritos na Fig. 10.

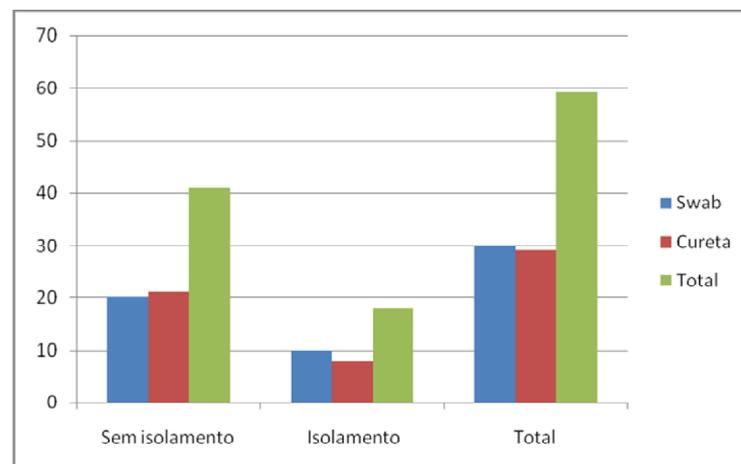


Figura 10 – Prevalência (n) de leveduras da mucosa oral de fêmeas caninas de acordo com a técnica utilizada (swab e cureta)

Das 413 amostras coletadas, considerando as sete formas de coletas em cada um dos 59 animais, somente a coleta com sonda do 4º PMS não acrescentou novos isolados. Dos 30 (100%) animais em que se obteve isolamento de leveduras, em 19 (63,33%) apenas uma forma de coleta ou local apresentou isolamento, em

três (10%) animais foram isoladas leveduras de duas formas de coletas ou locais, em cinco (16,67%) em três locais ou formas de coleta, em dois (6,67%) em quatro e um (3,33%) animal isolou-se em cinco locais ou formas de coleta. Dos 30 animais, 22 (73,33%) apresentaram somente um microrganismo, em seis (20%) foram isolados dois e em dois (6,67%) foram isoladas três leveduras de espécies diferentes. A descrição do número de coletas, isolamento de leveduras em relação aos locais de coleta e espécies diferentes de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas estão descritos na tab. 5.

Tabela 5 – Relação dos locais, formas de coletas, número de amostras coletadas, número de coletas com isolamento e o número de espécies diferentes de leveduras isoladas de cada local da cavidade oral de fêmeas caninas

Local de coleta	Amostras n	Coletas com isolamento n(%)	Espécies diferentes isoladas n
Mucosa gengival ( <i>swab</i> )	59	11(18,64)	5
Mucosa gengival (cureta)	59	12(20,34)	5
Biofilme	59	12(20,34)	4
Sonda 4 <sup>o</sup> PMSD	59	3(5,08)	5
Sonda CSE	59	5(8,47)	3
Papel 4 <sup>o</sup> PMSD	59	5(8,47)	5
Papel CSE	59	5(8,47)	3
<b>Total</b>	<b>413</b>	<b>53(12,83)</b>	<b>11</b>

### 4.3 Isolamento e identificação

O isolamento de leveduras ocorreu em 30 (50,85%) dos animais, sendo que o percentual de isolamento de leveduras nos animais com halitose (85,7%) foi significativamente superior do que dos animais que não tinham (46,2%) com  $p=0,0494$ . Quando comparado a ocorrência de isolamento de leveduras com presença de cálculo dentário, sangramento gengival, conformidade cranial e idade não foi encontrada diferença significativa. O número de isolamentos para cada alteração encontrada na cavidade oral, tipo de crânio e idade estão descritos na Fig. 11.

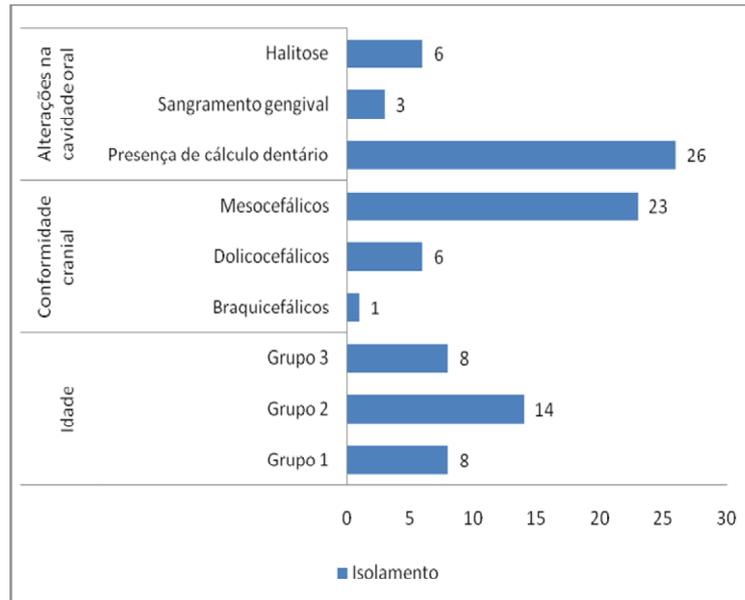


Figura 11 – Distribuição de frequências de isolamento de leveduras em cada alteração encontrada na cavidade oral, tipo de crânio e diferentes grupos de idade

Dos 59 (100%) animais avaliados, observou-se isolamento de leveduras em 30 (50,85%), sendo que sete (11,86%) animais apresentaram duas ou mais leveduras na mesma forma de coleta ou local. De 413 amostras obtidas, incluindo as sete formas de coleta em cada animal, observou-se o isolamento de 61 leveduras de 11 espécies diferentes. A distribuição de frequências dos 61 isolados de leveduras nos diferentes locais de colheita na cavidade oral e o número de animais sem isolamento estão descritos na Fig. 12.

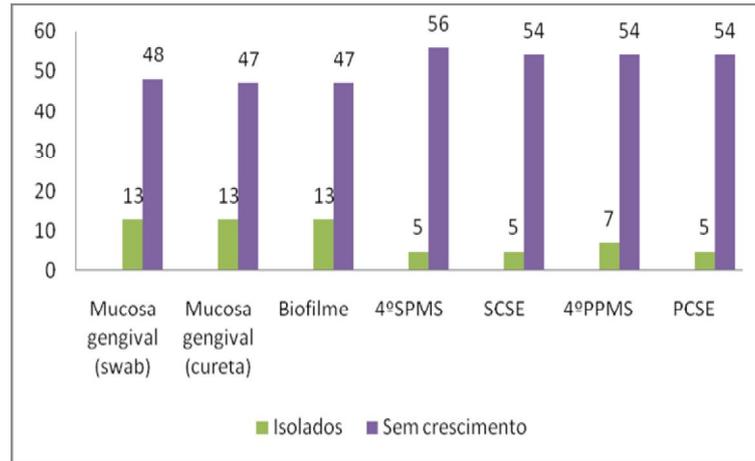


Figura 12 - Distribuição de frequências dos 61 isolados de leveduras nos diferentes sítios da cavidade oral das 59 fêmeas caninas

Na análise microscópica realizou-se esfregaço com coloração de gram, confirmando as células leveduriformes. Todas as colônias leveduriformes foram subcultivadas para posterior identificação em tubos e placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol.

Para identificação do gênero *Malassezia*, foram avaliadas características de colônias que se apresentavam de coloração amarelo creme ou marrom alaranjado, superfície em forma de cúpula, com textura seca e friável. Na microscopia foram observadas células ovais ou com brotamento unipolar de base larga com formato de “pino de boliche” e ausência de hifas ou pseudohifas (Fig. 13). Estas colônias com características macro e microscópicas do gênero *Malassezia* foram subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol para comprovação ou não da lipodependência. Também foram avaliados os testes de urease, onde 80% das amostras foram positivas e o teste da produção de catalase, que resultou positivo em 100% das amostras, porém, algumas cepas demonstraram-se fracamente positivas. Todas as leveduras compatíveis com o gênero foram identificadas como *M. pachydermatis*.

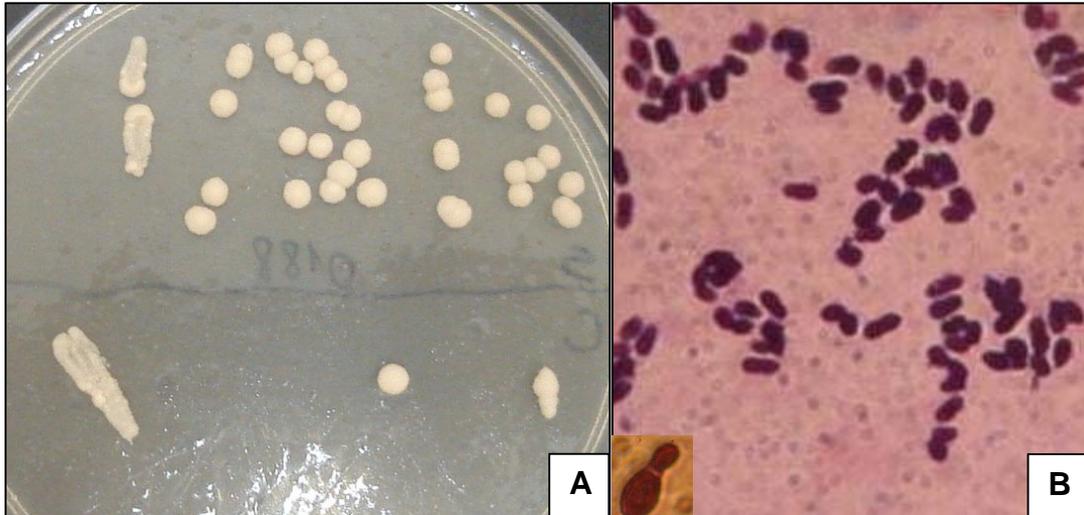


Figura 13 – Macromorfologia das colônias características do gênero *Malassezia* (A) e aspecto microscópico da *M. pachydermatis*, demonstrando os brotamentos em base larga, “pinos de boliche” (B)

O gênero *Rhodotorula* foi identificado através da macroscopia das colônias que apresentaram-se arredondadas, com superfície lisa e brilhante e com pigmento carotenóide (Fig. 14). Na microscopia foi possível observar os blastoconídeos e ausência de hifas e pseudohifas. Para diferenciação do gênero também foram utilizados os testes da urease, que foi positivo em todas as amostras e o teste do inositol, que resultou negativo.



Figura 14 – Colônias róseas com características macroscópicas de *Rhodotorula* spp. isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas

As colônias compatíveis macro e microscopicamente com o gênero *Candida* foram avaliadas quanto à produção de tubo germinativo em soro equino, somente três cepas foram capazes de produzir tubo germinativo (Fig. 15) sendo classificadas como *C. albicans*.



Figura 15 – Blastoconídios com formação de tubo germinativo em soro equino, caracterizando *C. albicans*

Todas as leveduras, com exceção dos gêneros *Malassezia* e *Rhodotorula*, foram identificadas através do sistema padronizado para identificação de leveduras ID 32C com leitura automatizada através do aparelho ATB™ Expression™, inclusive as leveduras com capacidade de produção do tubo germinativo.

As leveduras isoladas dos diferentes sítios da cavidade oral de fêmeas caninas foram: *M. pachydermatis* (31-50,82%), *Rhodotorula* spp (8-13,11%), *C. albicans* (3-4,92%), *C. catenulata* (2-3,28%), *C. famata* (1-1,64%), *C. guilliermondii* (1-1,64%), *C. parapsilosis* (1-1,64%), *C. intermedia* (1-1,64%) (Fig. 16), *T. asahii* (8-13,11%), *T. mucoide* (1-1,64%) (Fig. 17) e *C. albidus* (4-6,56%) (Fig. 18).

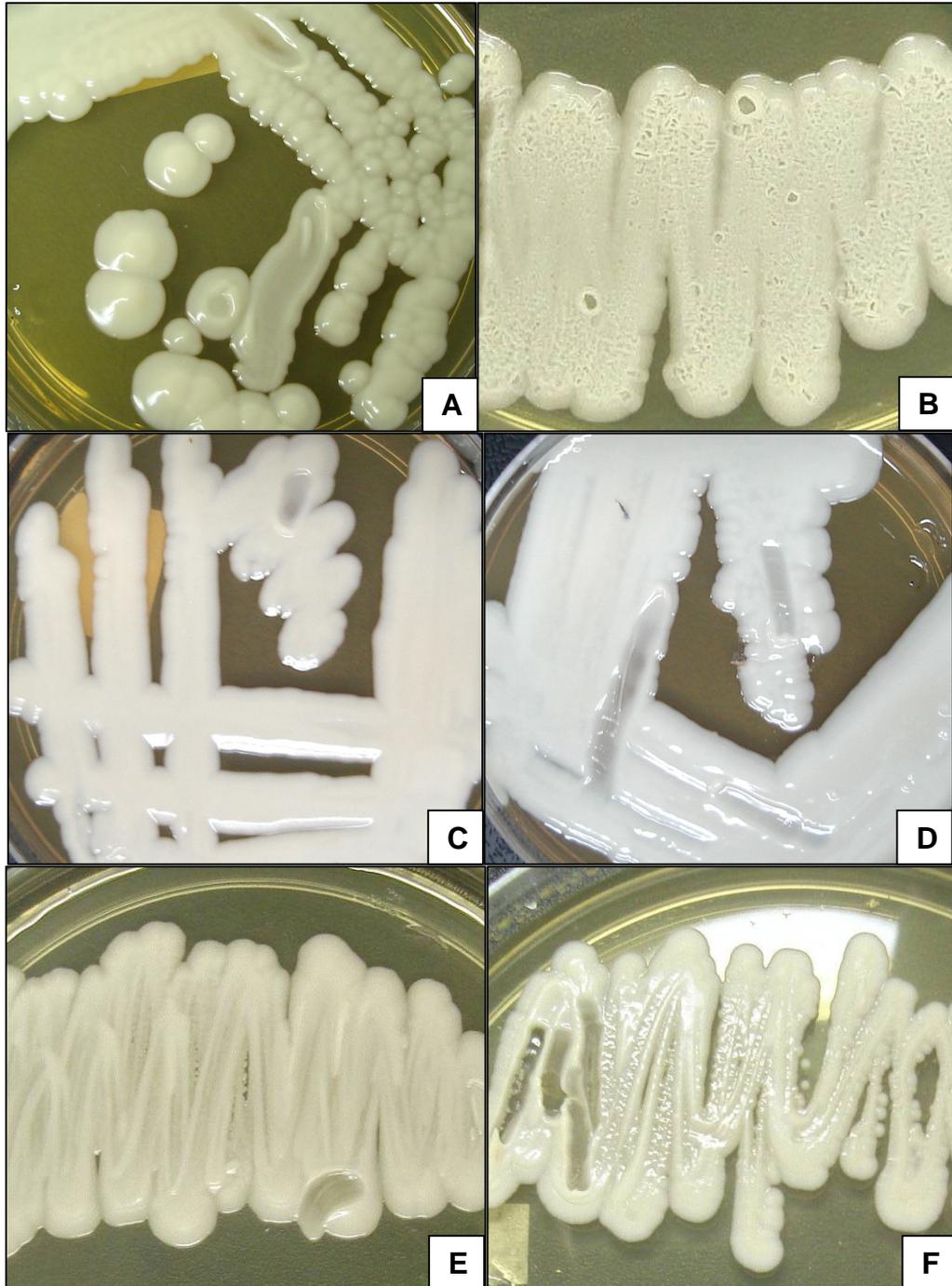


Figura 16 – Leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas. *C. albicans* (A); *C. catenulata* (B); *C. famata* (C); *C. guilliermondii* (D); *C. parapsilosis* (E) e *C. intermedia* (F)

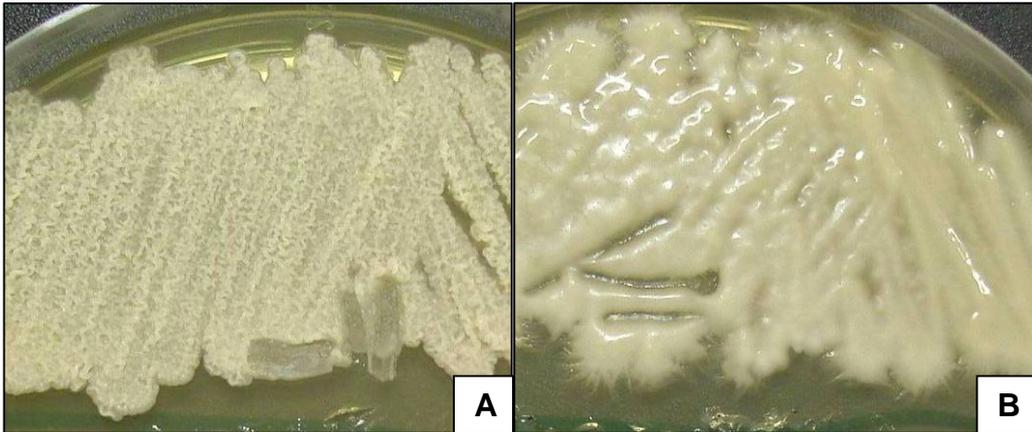


Figura 17 – Diferentes colônias de *Trichosporon asahii* isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas. *T. asahii* – colônia rugosa (A) e *T. asahii* – colônia mucóide e radiada (B)

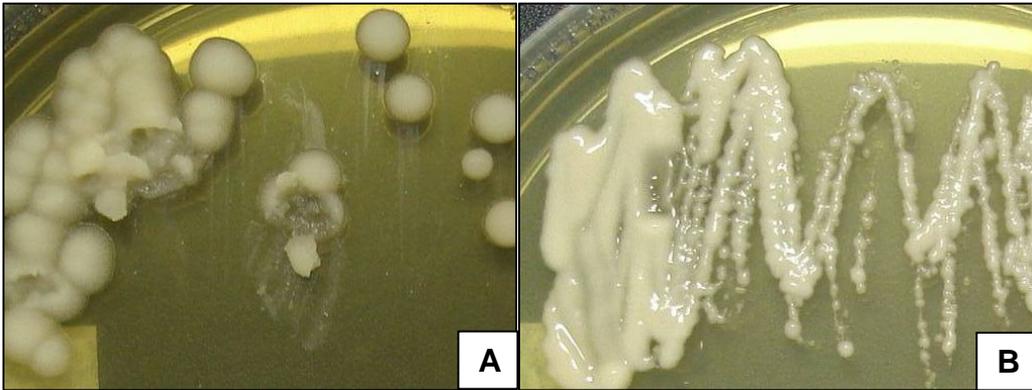


Figura 18 – Colônias de *T. mucoide* (A) e *C. albidus* (B) isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas

Os gêneros e espécies, formas de coleta e o local de onde foram isoladas as leveduras estão descritos na tab. 6.

Tabela 6 – Distribuição de frequências de leveduras com relação às diferentes formas e locais de coleta das 413 amostras da cavidade oral de fêmeas caninas

Levedura	Mucosa gengival (swab) n(%)	Mucosa gengival (cureta) n(%)	Biofilme n(%)	4ºSPMS n(%)	SCSE n(%)	4ºPPMS n(%)	PCSE n(%)	Total n(%)
<i>M. pachydermatis</i>	8(13,11)	9(14,75)	9(14,75)	1(1,67)	1(1,64)	1(1,64)	2(3,28)	31(50,82)
<i>C. albicans</i>	1(1,64)	-	-	-	-	2(3,28)	-	3(4,92)
<i>C. catenulata</i>	-	-	-	1(1,64)	-	1(1,64)	-	2(3,28)
<i>C. famata</i>	1(1,64)	-	-	-	-	-	-	1(1,64)
<i>C. guilliermondii</i>	-	1(1,64)	-	-	-	-	-	1(1,64)
<i>C. parapsilosis</i>	-	1(1,64)	-	-	-	-	-	1(1,64)
<i>C. intermedia</i>	-	-	-	1(1,64)	-	-	-	1(1,64)
<i>Rhodotorula spp</i>	2(3,28)	1(1,64)	1(1,64)	1(1,64)	1(1,64)	2(3,28)	-	8(13,11)
<i>T. asahii</i>	1(1,64)	-	2(3,28)	-	3(4,92)	-	2(3,28)	8(13,11)
<i>T. mucoide</i>	-	-	-	-	-	-	1(1,64)	1(1,64)
<i>C. albidus</i>	-	1(1,64)	1(1,64)	1(1,64)	-	1(1,64)	-	4(6,56)
<b>Total</b>	<b>13(21,31)</b>	<b>13(21,31)</b>	<b>13(21,31)</b>	<b>5(8,2)</b>	<b>5(8,2)</b>	<b>7(11,47)</b>	<b>5(8,2)</b>	<b>61(100)</b>

4ºSPMS – colheita com sonda do sulco periodontal do 4º pré-molar superior; SCSE – colheita com sonda do sulco periodontal do canino superior esquerdo; 4ºPPMS – colheita através de ponta de membrana de HA éster de celulose do sulco periodontal do 4º pré-molar superior; PCSE - colheita através de ponta de membrana de HA éster de celulose do sulco periodontal do canino superior esquerdo

Dos 59 (100%) animais avaliados, em 30 (50,85%) houve isolamento de leveduras, independente dos locais e/ou forma de coleta utilizada. Na tab. 7 estão descritas as leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas e o número de animais com isolamento daquela levedura.

Tabela 7 – Descrição das leveduras isoladas e número de animais com isolamento para cada um dos gêneros

Leveduras isoladas	Número de animais com isolamento n(%)	Total n(%)
<i>Malassezia pachydermatis</i>	19(32,20)	59(100)
<i>Candida spp.</i>	8(13,56)	59(100)
<i>Trichosporon spp.</i>	6(10,17)	59(100)
<i>Rhodotorula spp.</i>	7(11,86)	59(100)
<i>Cryptococcus albidus</i>	1(1,69)	59(100)

Dos 61 isolados de leveduras de três sítios da cavidade oral de fêmeas caninas foram identificados cinco gêneros, sendo 31 (50,82%) do gênero *Malassezia*, nove (14,75%) *Candida* e nove (14,75%) *Trichosporon*, oito (13,11%) *Rhodotorula* e quatro (6,56%) *Cryptococcus* (Fig. 19).

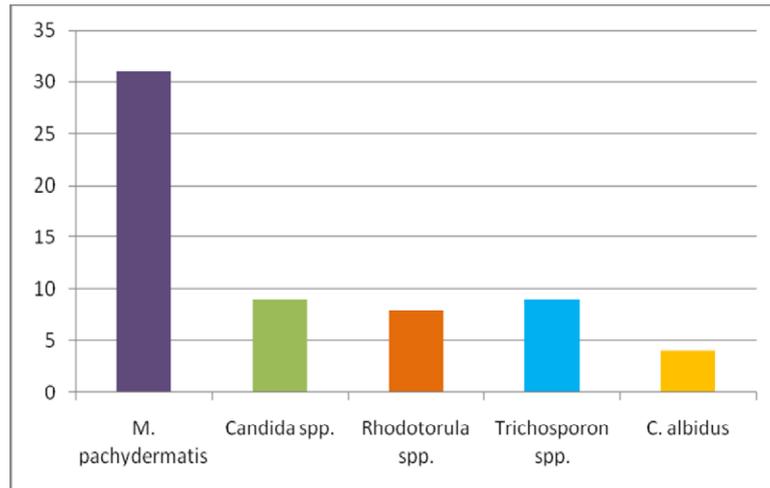


Figura 19 – Frequência de isolamento dos cinco gêneros encontrados na cavidade oral de fêmeas caninas

#### 4.4 Teste de suscetibilidade *in vitro*

As leveduras selecionadas para o teste foram *M. pachydermatis* (n=2), *C. albicans* (n=2), *C. catenulata* (n=2), *C. guilliermondii* (n=1), *C. parapsilosis* (n=1), *C. intermédia* (n=1), *Rhodotorula* spp. (n=2), *T. asahii* (n=3) e *T. mucoide* (n=1).

##### 4.4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados observados através da leitura da Microdiluição em Caldo (MC) (Fig. 20) dos produtos testados (A e B), álcool etílico e os princípios ativos gluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e tintura de própolis, foi a inibição do crescimento de todas as leveduras estudadas, em todas as concentrações, com exceção das concentrações da tintura de própolis que não demonstraram ação em nenhuma das concentrações testadas sobre estas espécies.

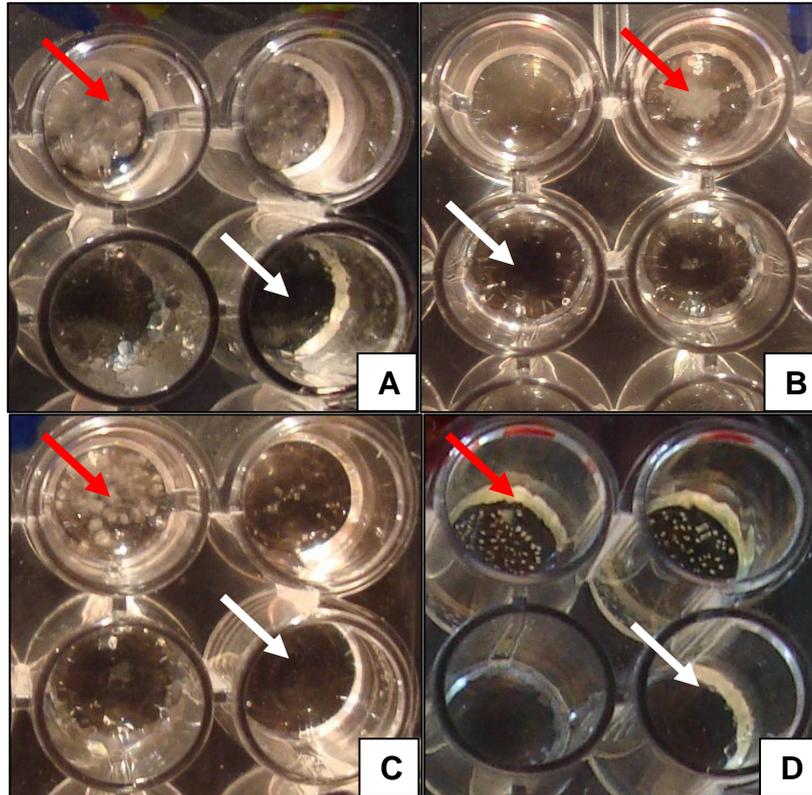


Figura 20 – Antifungigrama através da técnica de Microdiluição em Caldo com anti-sépticos orais frente a *C. albicans* (A), *Rhodotorula* spp. (B), *T. asahii* (C) e *M. pachydermatis* (D) demonstrando poço com crescimento (seta vermelha) e sem crescimento (seta branca)

#### 4.4.2 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

O crescimento das leveduras ocorreu apenas no controle positivo e na concentração mais alta utilizada da tintura de própolis (Fig. 21).

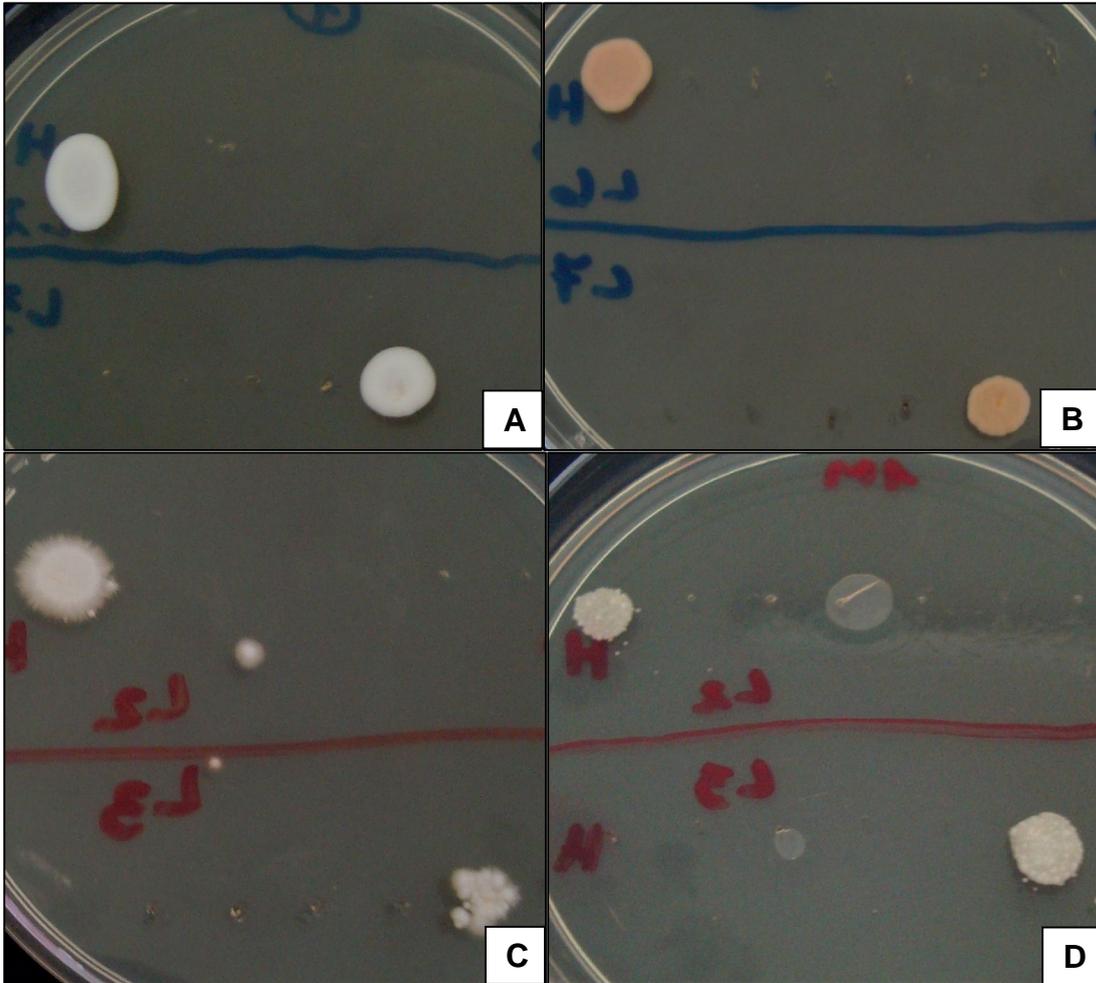


Figura 21 – Demonstração dos resultados da concentração fungicida mínima (CFM) dos isolados de *C. albicans* (A), *Rhodotorula* spp. (B), *T. asahii* (C) e *M. pachydermatis* (D) no controle positivo (canto superior esquerdo) e na tintura de própolis a 2% (canto inferior direito)

## 5 Discussão

Durante o período de estudo foi avaliada a cavidade oral de 59 fêmeas caninas encaminhadas ao HUCV para ovariectomia eletiva. Os animais foram divididos em três grupos com relação à idade, estipuladas de acordo com a dentição, sendo que essa estimativa pode ser influenciada pelo tipo de alimentação, maloclusão, traumatismo e higiene bucal (GIOSO, 2003). Neste caso, como eram cães errantes, nenhum dos animais recebia qualquer tipo de higiene oral. A diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0030$ ) encontrada para a idade com relação a presença de fraturas nos dentes dos animais do grupo 3 (16,94%) quando comparados aos do grupo 2 (10,17%) e ao grupo 1 (3,39%) provavelmente se deve ao tipo de alimentação a qual estes animais estão expostos.

Quanto à presença de cálculo dentário com relação à idade, foi observada diferença estatística significativa ( $p=0,0000$ ) entre os grupo 1 (11,86%) e os grupos 2 (38,98%) e 3 (27,12%), sendo que o grupo 1 apresentou menor frequência de cálculo dentário que os outros dois grupos, resultados também descritos na literatura onde cães adultos tem maior probabilidade de ter cálculo dentário, aumentando com o avançar da idade (TELHADO et al., 2004).

Em relação à diferença estatística significativa ( $p=0,0136$ ) para a presença de sangramento gengival com relação à idade entre o grupo 3 (8,47%) e o grupo 2 (3,39%), esta pode estar relacionada à presença de lesões no periodonto, como descrito por outros autores (DeBOWES, 2004; ROZA, 2004), onde o sangramento gengival pode indicar algum grau de doença periodontal e que esta aumenta com o avançar da idade, sendo que no grupo 1 não foi encontrado sangramento gengival em nenhum animal. Esta enfermidade acomete cerca de 80% de cães e gatos e, estudos indicam que os animais com idade acima de quatro anos apresentam algum grau de doença periodontal, incluindo desde gengivite discreta à severa periodontite

(GOSO, 2003; ROZA, 2004). Neste estudo, somente dois (3,39%) sulcos do 4ºPMSD e um (1,69%) do CSE a profundidade foi superior a 3mm, sendo 2mm a média de profundidade do sulco dos dentes avaliados. Estes resultados demonstram que os animais estudados tinham periodonto saudável com profundidades de sulco dentro da normalidade para a espécie em estudo (ROZA, 2004; MITCHELL, 2005).

O percentual de isolamento de leveduras nos animais com halitose (85,7%) foi significativamente superior ( $p=0,0494$ ) do que nos animais que não tinham (46,2%) esta alteração, demonstrando que, possivelmente a presença de leveduras na cavidade oral pode influenciar na condição da saúde bucal ou a saúde oral influenciar na presença de leveduras. A presença de halitose é uma das alterações encontradas no exame extra-oral de pequenos animais quando esta cavidade é acometida por alguma afecção (DeBOWES; HARVEY, 1999; DeBOWES, 2004; ROZA, 2004).

A colheita realizada de diferentes formas nas 59 (100%) fêmeas caninas em três diferentes sítios da cavidade oral totalizou sete coletas de cada animal. O isolamento de leveduras ocorreu em 30 (50,85%) destes animais. Estudos para determinar a frequência de leveduras na cavidade oral de cães já foram realizados, porém os locais de colheita, geralmente eram a mucosa gengival ou o sulco periodontal (BOND; SAIJONMAA-KOULUMIES; LLOYD, 1995; BOND; LLOYD; 1997; BRAGA et al., 2005; BRITO et al., 2008).

Nas coletas da mucosa gengival realizadas através de duas técnicas, antes com *swab* e depois com cureta estéril ou antes com cureta e depois com *swab*, a coleta prévia com qualquer uma das duas técnicas reduziu significativamente a possibilidade de isolamento com a segunda técnica utilizada, sendo que na maioria dos casos, o animal que foi negativo na primeira coleta, não apresentou isolamento na segunda também. Somente em dois casos, houve recuperação de um microrganismo além daquele obtido na primeira coleta. Quando comparou-se a coleta através de duas técnicas foi observada prevalência de 33,33% ( $n=10$ ) na coleta com *swab* e, 27,59% ( $n=8$ ) na coleta com cureta, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as duas técnicas, diferenciando assim, de Ferreira et al. (2002) que em um projeto piloto para isolamento de leveduras da mucosa oral de felinos compararam os cultivos obtidos através de *swabs* com aqueles obtidos através de cureta estéril, observando que a coleta com cureta proporcionava um número maior de isolamentos. Para Sória et al. (2002) a técnica

de isolamento de leveduras através de cureta estéril também demonstrou melhores resultados nos cultivos.

No presente estudo foram obtidos 61 isolados de leveduras na cavidade oral de fêmeas caninas, sendo de 11 espécies diferentes, distribuídas nos três sítios analisados, na mucosa gengival, no biofilme e no sulco periodontal. Na mucosa gengival, oito espécies diferentes foram isoladas, sendo elas *M. pachydermatis*, *C. albicans*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula* spp., *T. asahii* e *C. albidus*. No entanto, diferindo deste trabalho, para Ferreira et al. (2002) a única levedura isolada da mucosa bucal de felinos com e sem lesão oral foi *C. albicans*. Segundo Brito et al. (2008), que estudaram o isolamento de leveduras da mucosa oral de 203 cães, quatro espécies foram identificadas (69 isolados de *M. pachydermatis*, quatro de *C. parapsilosis*, um de *C. tropicalis* e um de *S. cerevisiae*), valor esse menor que o encontrado neste estudo. No entanto, quando comparamos os achados referentes à *M. pachydermatis* isolada de todos os sítios analisados e nas diferentes formas de coleta, representando 50,82% dos isolados da cavidade bucal de fêmeas caninas encontramos valores semelhantes no trabalho de Brito et al. (2008), onde a levedura *M. pachydermatis* também foi a que obteve maior número de isolados da mucosa oral.

Vários autores já descreveram *M. pachydermatis* como parte da microbiota oral (BOND; SAIJONMAA-KOULUMIES; LLOYD, 1995; BOND; LLOYD; 1997; BRITO et al., 2008), no entanto, a relação de enfermidades orais de cães associadas a essa levedura foi descrita apenas por Pinter e Noble (1998) que isolaram a levedura de um caso de estomatite, faringite e tonsilite em um cão. Contudo, esta levedura é a espécie mais estudada em animais e é considerada parte da microbiota de vários sítios anatômicos em cães e gatos, principalmente do meato acústico externo e tegumento cutâneo, embora também possa ser freqüentemente isolada do reto, sacos anais, vagina e espaço interdigital (NOBRE et al., 1998; BOND; LAMPORT; LLOYD, 2000; NASCENTE et al., 2004; CLEFF et al., 2005; ANDRADE, 2006), podendo tornar-se patógenos em humanos e animais domésticos, como por exemplo, relacionado aos casos de otite externa canina (NOBRE et al., 1998; MACHADO et al., 2003; NASCENTE et al., 2004; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007).

Assim como espécies de *Candida* possuem a capacidade de aderência e produção de biofilme (GASPARETTO et al., 2005; LÓPEZ-RIBOT, 2005), isolados de *M. pachydermatis* provenientes de orelhas de cães foram também capazes de produzir biofilme em materiais como poliestireno e poliuretano (CANIZZO et al., 2007). O isolamento destes microrganismos da cavidade oral, inclusive do biofilme dental em cães demonstra que possivelmente estes podem estar envolvidos em patologias orais.

*Candida* spp. que representou 14,75% dos isolados deste estudo, é considerada parte da microbiota oral de animais (FERREIRO et al., 2002; BRITO et al., 2008) e de humanos (LACAZ et al., 2002; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; AKPAN; MORGAN, 2002). Este gênero também pode ser isolado, em humanos, a partir de um canal radicular de dentes infectados, tanto em cultura pura como em associação com bactérias (WALTIMO et al., 2003), sendo que *C. albicans* já foi isolada de casos de periodontite apical e marginal não responsável à terapia (WALTIMO et al., 2000). Em humanos, a candidíase oral é de grande importância, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000) e as espécies mais comumente isoladas são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea*. *C. albicans* isolada em três (4,92%) coletas é o principal patógeno da candidíase oral em humanos e, juntamente com *C. glabrata* e *C. tropicalis* representam em torno de 80% dos isolados da infecção clínica (AKPAN; MORGAN, 2002), a baixa frequência desta espécie demonstra que possivelmente existem diferenças entre a microbiota leveduriforme oral humana e de cães, como já descrito por Hayashi; Takada; Hirasawa (2008). Contudo, estomatites causadas por *C. albicans* já foram relatadas em quatro cães (JADHAV; PAL, 2006). Na mucosa oral de felinos esta levedura foi a única espécie isolada (FERREIRO et al., 2002), porém nos estudos de Brito et al. (2008) e Hayashi; Takada; Hirasawa (2008) este patógeno não foi isolado da mucosa oral de cães.

*C. albicans* é também patógeno oportunista de regiões mucocutâneas, trato digestório e genital de mamíferos e aves, além de estar envolvida em alguns casos de lesões na pele, unhas e trato respiratório com riscos de desencadear infecção fúngica sistêmica (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Em cães, *Candida* spp. já foi isolada do tegumento e das mucosas (GUILLOT; CHERMETTE; MAILLARD, 1996;

MORETTI et al., 2004; CLEFF et al., 2007a) e em casos de estomatite (JADHAV; PAL, 2006).

No presente estudo outras espécies do gênero *Candida* que foram isoladas como *C. guilliermondii* (1,64%) e *C. parapsilosis* (1,64%) podem estar frequentemente envolvidas na candidíase bucal em humanos (AKPAN; MORGAN, 2002) assim como *C. parapsilosis* que já foi isoladas da mucosa oral de cães por Brito et al. (2008). Porém, outras espécies como *C. catenulata*, *C. famata* e *C. intermedia* ainda não haviam sido descritas como parte da microbiota oral de cães. Entretanto, estas leveduras possuem potencial patogênico para desenvolver infecções sistêmicas, principalmente em paciente imunodeprimidos (RADOSAVLJEVIC et al., 1999).

*C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. famata* assim como, *Trichosporon* spp. também isolado neste trabalho, foram isoladas de cateteres umbilicais de recém-nascidos internados na UTI neonatal do Rio Grande do Norte, alertando para a presença destas leveduras na ocorrência de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes da UTI neonatal (FERNANDES et al., 2007), assim como a presença de leveduras nas mãos de trabalhadores da saúde nestas unidades (NASCENTE et al., 2007).

O gênero *Rhodotorula* identificado em oito (13,11%) dos isolados, já foi descrito como agente oportunista, porém com baixo potencial patogênico, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos. Em animais, já foi isolado como parte da microbiota do meato acústico externo (BORNAND, 1992; AMARAL et al., 1998), cavidade oral de cães (BRAGA et al. 2005), mucosa vaginal gatas (ANDRADE, 2006) e de fêmeas caninas híginas (CLEFF et al., 2007b) e, já foi isolado da urina, fezes, pele e cavidade oral de humanos hospitalizados (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

O gênero *Trichosporon* já foi isolado de lavado broncoalveolar de cães híginos (MELCHERT et al. 2008) e do meato acústico externo de gatos híginos (AMARAL et al., 1998). Contudo, em animais não foram encontrados relatos de infecção por leveduras deste gênero na literatura consultada. *Trichosporon* spp. pode estar envolvido em infecções sistêmicas nos indivíduos imunocomprometidos (SUGITA; NISHIKAWA; SHINODA, 1998) e, em infecções cutâneas superficiais (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). Em 2008, SHAREEF e colaboradores descreveram um caso de glossite, em paciente humano, que teve como agente

etiológico *T. asahii*, espécie essa também encontrada na cavidade oral de cães, identificada em oito (13,11%) dos isolados. Recentemente, esta mesma espécie foi descrita como um emergente patógeno oportunista causando infecções disseminadas, principalmente em pacientes imunocomprometidos (LACAZ et al., 2002; WOODGYER, 2004; WALSH et al., 2004).

Dentro do gênero *Cryptococcus* existem 19 espécies, sendo *C. neoformans* o principal patógeno. Raros relatos envolvendo outras espécies com potencial patogênico são descritos (MITCHELL; PERFECT, 1995). Dentre as espécies oportunistas destacam-se *C. albidus*, *C. curvata*, *C. humicola* e *C. laurentii* (SUGITA et al., 2001). *C. albidus* foi isolado, neste estudo, de todos os sítios analisados da cavidade oral de apenas um (3,22%) animal, este fato demonstra que possivelmente esta levedura estava presente naqueles locais de forma transitória, não pertencendo à microbiota residente da cavidade oral destes animais. Esta espécie é saprófita, encapsulada, porém raramente está associada a casos clínicos. Em cães, já foram descritos dois casos de infecção sistêmica pelo agente e um caso de pielonefrite (NEWMAN; LANGSTON; SCASE, 2003; LABRECQUE; SYLVESTRE; MESSIER, 2005; KANO et al, 2008). Também há relatos de casos esporádicos da infecção por *C. albidus* em humanos, cavalo e felino (GLUCK; MYERS; PASS, 1987; LOISON; BOUCHARA; GUÉHO, 1996), demonstrando assim, que este patógeno oportunista pode estar na cavidade oral de cães, mesmo que de forma transitória e, como em humanos provocar doença, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

Não foram encontrados estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* e/ou em cães utilizando soluções bucais para pequenos animais. Neste estudo o teste *in vitro* com produtos e seus princípios ativos separadamente revelou a inibição do crescimento de leveduras orais em todas as concentrações de todos os produtos, inclusive abaixo das utilizadas nas formulações, exceto para tintura de própolis. Para todos os anti-sépticos bucais utilizados foram encontradas descrições de uso em humanos para redução de leveduras, sendo a única exceção o cloreto de benzalcônio.

O gluconato de clorexina inibiu o crescimento das leveduras nas concentrações de 0,06%, 0,12% e 0,24%, resultados semelhantes foram encontrados em humanos, porém utilizando metodologias diferentes. Waltimo et al. (1999) utilizando a técnica em disco de papel filtro demonstraram a atividade antifúngica *in vitro* frente a *C. albicans* de 0,5% e 0,05% de acetato clorexidina. Em

outro estudo *in vitro* através da macrodiluição, digluconato de clorexidina nas concentrações de 0,12% e 0,2% controlaram a presença de diferentes espécies de *Candida* e reduziram a colonização oral por esses microrganismos (MEILLER et al., 2001).

A utilização da clorexidina como solução de limpeza oral, principalmente em pacientes imunocomprometidos, com o objetivo de reduzir o risco de infecção bucal por agentes oportunistas, também já foi descrita (MACHADO et al., 2007). Estudos *in vivo* demonstram que a clorexidina é capaz de reduzir a gengivite em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico (JAMILIAN, et al., 2008) e a colonização por leveduras do gênero *Candida* e gengivite em crianças HIV positivos (MACHADO et al., 2007). O efeito bactericida *in vivo* frente à microbiota salivar de humanos a duas concentrações de digluconato de clorexina (0,2% *versus* 0,12%), também foi comprovado, sendo observada uma redução do total de bactérias, principalmente anaeróbias obrigatórias, porém esta atividade antibacteriana foi maior na concentração a 0,2% (TOMÁS et al., 2008).

Dentre os anti-sépticos orais utilizados na clínica de pequenos animais, a clorexidina é o produto mais eficaz, pois possui efeito bactericida imediato, poder de retenção, período de ação de 12h, dentre outras vantagens (HENNET, 2002; GIOSO; CARVALHO, 2004).

O cloreto de benzalcônio, foi testado neste estudo, por estar presente nas formulações comerciais utilizadas, embora, na literatura consultada, não foram encontrados estudos científicos demonstrando a eficiência e toxicidade deste composto quando utilizado como anti-séptico bucal. Este produto possui recomendação para desinfecção de utensílios, equipamentos e ambientes veterinários, também está presente em solução oftálmica, deo-colônia e solução bucal para pequenos animais (CPVS, 2009). No estudo, este composto demonstrou resultados satisfatórios em todas as concentrações testadas, 0,06%, 0,12%, 0,24% e 0,48%, resultados semelhantes aos encontrados na utilização deste como desinfetante a 0,5% contra espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (GUPTA, AHMAD; SUMMERBELL, 2002).

Cloreto de benzalcônio também é utilizado em medicina humana como descongestionante nasal, contudo estudos indicam que o uso deste medicamento pode agravar problemas respiratórios (O ESTADO DO PARANÁ, 2008) e, quando avaliados os efeitos genotóxicos e citotóxicos *in vitro* em diferentes concentrações

através de cultivo celular, observou-se que as concentrações empregadas nos produtos comerciais nasais causaram danos no DNA das células epiteliais do trato respiratório (DEUTSCHLE et al., 2006). Também em humanos, já foi relatado caso fatal de envenenamento pela ingestão de cloreto de benzalcônio a 10% utilizado na desinfecção de ambientes (HITOSUGI; MARUYAMA; TAKATSU, 1998).

A tintura de própolis foi a única exceção, que em todas as concentrações utilizadas (2%, 1% e 0,5%) não apresentou atividade antifúngica frente às leveduras testadas, diferindo de outros autores que já demonstraram a atividade antimicrobiana da própolis frente a leveduras, inclusive cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans* sensíveis até mesmo a baixas concentrações de própolis (SFORCIN et al., 2001), porém com diferentes metodologias. Azevedo et al. (1999) indicam a possibilidade de se empregar os anti-sépticos, como a própolis e a clorexidina, na prevenção e terapia da candidose bucal, pois em seu estudo, onde isolaram e identificaram leveduras da cavidade oral de humanos com e sem lesão e também avaliaram a atividade antifúngica de dois produtos comerciais contendo 10g% de extrato alcólico de própolis e o outro 0,12% de clorexidina através da técnica de diluição em meio sólido, observaram que a maioria das leveduras (95,7%) foi sensível aos anti-sépticos. No estudo de Soares et al. (2006) foi avaliada suscetibilidade *in vitro*, através da difusão em ágar, de bactérias bucais contra diferentes tinturas fitoterápicas, demonstrando a atividade antibacteriana da tintura de própolis frente a todos isolados, porém em diferentes diluições.

## 6 Conclusões

Na avaliação da cavidade oral das fêmeas caninas predominaram a presença de cálculo dentário, fraturas dentárias e maloclusões.

As leveduras *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon asahii*, *T. mucoide* e *Cryptococcus albidus* fazem parte da microbiota dos três diferentes sítios da cavidade oral das fêmeas caninas estudadas, estando presentes sem causar alterações.

O isolamento de leveduras foi maior nas fêmeas que tinham halitose na avaliação da cavidade oral do que naquelas que não apresentavam este sinal clínico.

As principais espécies de *Candida* isoladas foram: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. catenulata*, *C. famata* e *C. intermedia*, sendo que as três últimas espécies, ainda não haviam sido descritas como parte da microbiota oral de cães.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as coletas com *swab* estéril e as coletas com cureta estéril das amostras da mucosa gengival provenientes de fêmeas caninas.

Os anti-sépticos orais testados e os compostos gluconato de clorexidina e cloreto de benzalcônio foram eficazes frente às leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas em todas as concentrações testadas, inclusive nas abaixo da recomendada para uso.

Nas condições estudadas, a tintura de própolis não é recomendada para utilização como anti-séptico oral frente a leveduras nas concentrações estudadas.

## Referências

- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v.78, p.455-459, 2002.
- AMARAL, R. C.; IBAÑEZ, J. F.; MAMIZUKA, E. M.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; LARSSON, C. E. Microbiota indígena do meato acústico externo de gatos hípidos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.441-445, 1998.
- ANDRADE, J. B. **Estudo Microbiológico e Citológico do Trato Genital de Gatas Domésticas**. 2006. 43f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária)- Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v.45, n.4, p.287-303, 2007.
- AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C.; CANDIDO, R. C.; SALVETTI, C.; REZENDE, F. H. C. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.335-341, 1999.
- BERNARDO, F. M.; MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.163-165, 1998.
- BISWAS, S. K.; YOKOYAMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Molecular phylogenetics of the genus *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n.51, p.1191-1199, 2001.
- BOND, R.; ANTHONY, R. M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.537-542, 1995.
- BOND, R.; LAMPORT A. I.; LLOYD, D. H. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. **Research in Veterinary Science**, v.68, p.291-293, 2000.
- BOND, R.; LLOYD, D. H. Skin and mucosal populations of *Malassezia pachydermatis* in healthy and seborrhoeic Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.8, p.101-106, 1997.

- BOND, R.; SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E. M.; LLOYD, D. H. Population size and frequência de *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.36, p.147-150, 1995.
- BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz Arch Tierheilk**, v.134, p.1-8, 1992.
- BOUTILIER, P.; CARR, A. Fungal colonization and failure of a long-term gastrostomy tube in a cat. **The Canadian Veterinary Journal**, v.46, p.709-710, 2005.
- BRAGA, C. A. B.; RESENDE, C. M. F.; PESTANA, A. C. N. R.; CARMO, L. S.; COSTA, J. E.; SILVA, L. A. F.; ASSIS, L. N.; LIMA, L. A.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A. R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p. 385-390, 2005.
- BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **The Veterinary Journal** (2008), doi:10.1016/j.tvjl.2008.07.001.
- CABAÑES, F. J.; THEELEN, B.; CASTELLA, G.; BOEKHOUT, T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. **FEMS Yeast Research**, v.7, p.1064-1076, 2007.
- CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the Genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v.166, p.121-132, 2008.
- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V.; ITO, I. Y. Determinação da concentração inibitória mínima de cepacol, malvona e periogard, ante a *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.25, n.1, p.79-84, 1996.
- CANIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A.; VILLAR-VIDAL, M.; BOLLO, E.; CASTELLÀ, G.; CABAÑES, F. J.; VIDOTTO, V. QUINDÓS, G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v.45, p.357-361.
- CARVALHO, V. G. G.; GIOSO, M. A.; CARVALHO, P. E. G. Maloclusões em cães e gatos. **MEDVEP**, v.5, n.16, p. 232-237, 2007.
- CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p.201-204, 2005.
- CLEFF, M. B.; SILVA, G. M.; MEINERZ, A. R. M.; MADRID, I. M.; MARTINS, A. A.; FONSECA, A. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO J. R. B. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.2, p.164-168, 2007.

CLEFF, M. B.; XAVIER, M. O.; MARTINS, A. A.; SANTIN, R.; MEIRELES, M. C. A. Caracterización de la microbiota levaduriforme residente en la vagina de perras en diferentes fases del ciclo estral. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v.39, p.153-158, 2007.

CLEFF, M. B.; SOARES, M. P.; MADRID, I. M.; MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M. O.; ALBANO, A. P.; FONSECA, A.; SILVEIRA, Ê. S.; MEIRELES, M. C. A. Candidíase cutânea em *Cebus apella* (Macaco Pregro). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.791-795, 2008.

CORRÊA, H. L.; VENTURINI, M.; GIOSO, M. A. Registro do exame clínico odontológico – odontograma. **Clínica Veterinária**, n.13, p.23-26, 1998.

COUTINHO, S. D. A. **Malassezia pachydermatis: caracterização fenotípica de amostras isoladas de pelame e meato acústico externo de cães**. 1997. 108f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CPVS, Compêndio de Produtos Veterinários – SINDAN. Disponível em: <<http://www.cpv.com.br/cpv/index.html>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2009.

DEBOWES L. J.; HARVEY, C. E. Cavidade Oral e Odontopatias. In: GOLDTSTON, R. T.; HOSKINS, J. D. **Geriatrics & Geriodontologia- Cão e gato**. 1.ed. São Paulo: Roca, 1999, cap. 9, p.161-183.

DEBOWES, L. J. Odontologia: Aspectos Periodontais. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004, v.2, p. 1189-1197.

DEUTSCHLE, T.; PORKERT, U.; REITER, R.; KECK, T.; RIECHELMANN, H. *In vitro* genotoxicity and cytotoxicity of benzalkonium chloride. **Toxicology in Vitro**, v.20, p.1472–1477, 2006.

DÍAZ, J. C. Q.; RODRÍGUEZ, O. A.; VELÁZQUEZ, M. D.; MILIÁN, M. L. Empleo de la tintura de propóleo al 5 % en la cura de heridas sépticas faciales. **Revista Cubana de Estomatología**, v.34, n.1, Ciudad de La Habana, 1997. Disponível em: <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

DOMINGUES, L. M.; ALESSI, A. C.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; DUTRA, L. S. Microbiota saprófita associada à doença periodontal em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.4, 1999. Disponível em: <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 10 jun. 2007.

DORN, A. S. Introdução para a Odontologia Veterinária. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, 2.ed. São Paulo: Manole, 1998, v.2, cap. 175, p. 2726-2732.

ELLIOTT, D. R.; WILSON, M.; BUCKLEY, C. M. F.; SPRATT, D. A. Cultivable Oral Microbiota of Domestic Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.11, p.5470-5476, 2005.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1642-1644, 1990.

ETO, F. S.; RASLAN, S. A.; CORTELLI, J. R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Revista Biociências Taubaté**, v.9, n.2, p.45-51, 2003.

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

FERNANDES, A. C. S.; SOUSA JUNIOR, F. C.; OLIVEIRA, S. M.; CALICH, L.; MILAN, E. P. Prevalence of *Candida* species in umbilical catheters implanted in newborns in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.104-107, 2007.

FERREIRA, F. B. A.; TORRES, S. A.; ROSA, O. P. S.; FERREIRA, C. M.; GARCIA, R. B.; MARCUCCI, M. C.; GOMES, B. P. F. A. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v.104, p.709-716, 2007.

FERREIRO, L.; MOREIRA JR, J. P. R., APPELT, C. E.; BERG V.; OLIVEIRA, I. A.; MUSCHNER, A. C.; REISCHAK, D.; CHERMETTE, R. Associações entre o isolamento de *candida albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (felv), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.3, p.179- 183, 2002.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F. R.; LEITE, F. P. L.; DUMMER, L. A.; VARGAS, L. D.; HÜBNER, S. O.; DELLAGOSTIN, O. A.; PAULINO, N.; PAULINO, A. S.; VIDOR, T. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. **Vaccine**, v.25, p.1250-1256, 2007.

FRASER, G. Aetiology of otitis externa in the dog. **Journal of Small Animal Practice**, v.6, p.445-452, 1965.

GABAL, M.A. Preliminary studies on the mechanism of infection and characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. **Mycopathologia**, v.104, p.93-98, 1988.

GASPARETTO, A.; NEGRI, M. F. N.; PAULA, C. R.; SVIDZINSKI, T. I. E. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v.27, n.1, p.37-40, 2005.

GIOSO, M. A. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 5.ed. São Paulo: Ieditora, 2003, p. 202.

GIOSO, M. A.; CARVALHO, V. G. G. Métodos preventivos para a manutenção da boa saúde bucal em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n.52, p.68-76, 2004.

GIOSO, M. A.; CARVALHO, V. G. G. Oral Anatomy of the Dog and Cat in Veterinary Dentistry Practice. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.35, p.763–780, 2005.

GLUCK, J. L.; MYERS, J. P.; PASS, L. M., Cryptococemia due to *Cryptococcus albidus*. **Southern Medical Journal**, v.80, p.511–513, 1987.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Micologia Especial e Clínica. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005, parte 3B, p.473-505.

GREENE, C. E. Gastrointestinal and Intraabdominal Infection. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dogs and cats**. 3.ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006, cap.89, p.883-912.

GREENE, C. E.; CHANDLER, F. W. Candidiasis and Rhodotorulosis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dogs and cats**. 3.ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006, cap.65, p.627-633.

GROGAN, S. G.; HART, B. D. Feline Cryptococcosis. A Retrospective Evaluation. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.33, n.2, p.118-122, 1997.

GUÉHO, E.; MIDGLEY, G.; GUILLOT, J. The genus *Malassezia* with description of four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.69, p.337-355, 1996.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v.37, p.295-306, 1999.

GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; MAILLARD, R. Les candidoses des carnivores domestiques actualisation à propos de 10 cas. **Point Vétérinaire**, v.28, n.175, p.51-61, 1996.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; MIDGLEY, G.; CHÉVRIER, G.; DUPONT, B. Identification of *Malassezia* species – A practical approach. **Journal de Mycologie Médicale**, v.6, p.103-110, 1996.

GUILLOT, J.; HADINA, S.; GUÉHO, E. The genus *Malassezia*: old facts and new concepts. **Parassitologia**, v.50, p.77-79, 2008.

GUPTA, A. K.; AHMAD, I.; SUMMERBELL, R. C. Fungicidal activities of commonly used disinfectants and antifungal pharmaceutical spray preparations against clinical strains of *Aspergillus* and *Candida* species. **Medical Mycology**, v.40, p.201-208, 2002.

GUSTAFSON, B.A. **Otitis externa in the dog: A bacteriological and experimental studie**. PhD Thesis. ,1955. Department of bacteriology and epizootology. The Royal Veterinary College of Sweden, Stockolm.

HARVEY, C. E.; SHOFER, F. S.; LASTER, L. Association of age and body weight with periodontal disease in north american dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.11, n.3, p.94-105, 1994.

HAYASHI, K.; TAKADA, K.; HIRASAWA, M. Yeast-Form Fungi from Dog Oral Cavity. Disponível em: <[http://iadr.confex.com/iadr/2008Toronto/techprogram/abstract\\_105472.htm](http://iadr.confex.com/iadr/2008Toronto/techprogram/abstract_105472.htm)>. Acesso em: 04 de janeiro de 2009.

HENNET, P. Effectiveness of a dental gel to reduce plaque in beagle dogs. **Journal of Veterinary Dentistry**, v.19, n.1, p.11-14, 2002.

HIRAI, A.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; DUARTE, E.R.; HAMDAN, J.S.; LACHANCE, M.A.; YAMAGUCHI, H.; HASEGAWA, A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54 (Pt 2), p. 623-627, 2004.

HITOSUGI, M.; MARUYAMA, K.; TAKATSU, A. A case of fatal benzalkonium chloride poisoning. **International Journal of Legal Medicine**, v.111, p.265-266, 1998.

HONSHO, C. S.; MINE, S. Y.; ORIÁ, A. P.; BENATO, N., CAMACHO, A. A.; ALESSI, A. C.; LAUS, J. L. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.2, p.155-159, 2003.

JADHAV, V. J.; PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.23, p.233-234, 2006.

JAMILIAN, A.; GHASEMI, M.; GHOLAMI, D.; KAVEH, B. Clinical effects of 2% chlorhexidine gel on patients undergoing orthodontic treatment. **Orthodontic waves**, v. 67, p.162-166, 2008.

KANO, R.; KATAGAWAT, M.; OOTA, S.; OOSUM, T.; MURAKAMI, Y.; TOKURIKI, M.; HASEGAWA, A. First case of feline systemic *Cryptococcus albidus* infection. **Medical Mycology**, v.46, n.1, p.75-77, 2008.

KORU, O.; TOKSOY, F.; ACIKEL, C. H.; TUNCA, Y. M.; BAYSALLAR, M.; GUCLU, A. U.; AKCA, E.; TUYLU, A. O.; SORKUN, K.; TANYUKSEL, M.; SALIH, B. *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, v.13, p.140-145, 2007.

KREGGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts: a taxonomic study**. 3.ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. 1082p.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology**. Philadelphia, Lea & Febiger, 1992, 866p.

LABRECQUE, O.; SYLVESTRE, D.; MESSIER, S. Systemic *Cryptococcus albidus* infection in a Doberman Pinscher. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.598-600, 2005.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.

- LARSSON, C. E.; OTSUKA, M.; MICHALANY, N. S.; BARROA, P. S. M.; GAMBALE, W.; SAFATLE, A. M. V. Canine ocular cryptococcosis: a case report. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.5, p.533-538, 2003.
- LEVITZ, S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of cryptococcosis. **Reviews Infectious Diseases**, v.13, n.6, p.1163-1169, 1991.
- LIPPOLIS, M.; BENITES, N. R.; MELVILLE, P. A. Avaliação da microbiota bacteriana aeróbica isolada da cavidade oral de cães errantes do município de Guarulhos, estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, (supl.), p.516-518, 2004.
- LO RE, V.; FISHMAN, N. O.; NACHAMKIN, I. Recurrent catheter-related *Rhodotorula rubra* infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.9, n.8, p.897-900, 2003.
- LOBELL, R.; WEINGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite externa canina. **A Hora Veterinária**, v.88, Porto Alegre, p. 29-33, 1995.
- LOISON J, BOUCHARA JP, GUEHO E. First report of *Cryptococcus albidus* septicaemia in an HIV patient. **Journal of Infection**, v.33, p.139-140, 1996.
- LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. **Current Biology**, v.15, n.12, p.R453-R455, 2005.
- LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA. M.; MAZUROVA, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeast Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.54, p.559-563, 2007.
- MACHADO, F. C.; SOUZA, I. P. R.; SOARES, R. M. A.; PORTELA, M. B.; FERNANDES, L. B. F.; CASTRO, G. F. B. A. Eficácia clínica e efeito residual do gel de clorexidina a 0,2% no controle de gengivite e *Candida* spp. em crianças HIV+. **Brazilian Oral Research**, v.21, supplement 1, p.188, 2007.
- MACHADO. M. L. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L.; GUILLOTT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica veterinária**, n.44, p.27-34, 2003.
- MANSFIELD, P.D.; BOOSINGER, T.R.; ATTLEBERGER, M.H. Infectivity of *Malassezia pachydermatis* in the external ear canal of dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.26, p.97-100, 1990.
- MEILLER, T. F.; KELLEY, J. I.; JABRA-RIZK, M. A.; DePAOLA, L. G.; BAQUI, A. A. M. A.; FALKLER Jr, W. A. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v.91, p.663-670, 2001.
- MELCHERT, A.; MOTTA, Y. P.; GIUFFRIDA, R.; LAPOSY, C. B. Avaliação citológica e microbiológica do lavado broncoalveolar em cães hígidos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 157-164, 2008.

MITCHELL, P. Q. **Odontologia de Pequenos Animais**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2005, 175 p.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS– 100 Years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, n.4, p.515-548, 1995.

MOREIRA JR, J. P. R. Estudo da associação entre o isolamento de *Candida albicans* e a detecção do Vírus da Leucemia Felina (FeLV) em gatos da Região da Grande Porto Alegre, 2001, 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS.

MORETTI, A.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; SUZUKI, M.; VIDOTTO, V.; CANNIZZO, F. T.; BONCIO, L.; BOLLO, E. First report of oral colonization by *Debaryomyces nepalensis* in a dog. **Mycopathologia**, v.164, p.189-192, 2007.

MORETTI, A.; POSTERARO, B.; BONCIO, L.; MECHELLI, L.; GASPERIS, E.; AGNETTI, F.; RASPA, M. Diffuse cutaneous in a dog. Diagnostic by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.21, p.139-142, 2004.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **Veterinary Record**, v.150, p.728-730, 2002.

NARDONI, S.; DINI, M.; TACCINI, F.; MANCIANTI, F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.172–177, 2007.

NASCENTE, P. S.; SANTIN, R.; LUND, R. G.; BUENO, M. E.; FEIJO, A. M.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A. Leveduras isoladas em ambiente de UTI - estudo preliminar. In: 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2007, Recife. **Anais do 5º Congresso Brasileiro de Micologia**. 376p.

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.26, n.2, p.79-82, 2004.

NAVARRO, J. T.; LAUZURICA, R.; GIMÉNEZ, M. *Rhodotorula rubra* infection in a kidney transplant patient with pancytopenia. **Haematologica**, v.86, p.111, 2001.

NCCLS - **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. **M27-A2**, 2002.

NETO, P. V. **Ação antifúngica de plantas medicinais e da própolis frente a leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal**. 2004. 98f. Dissertação (Mestrado em Odontologia-Área de concentração em Clínica Integrada)- Universidade Estadual de Ponta grossa, Ponta Grossa.

NEWMAN, S. J.; LANGSTON, C. E.; SCASE, T. J. Cryptococcal pyelonephritis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.222, p.180–183, 2003.

NISHIYAMA, S. A. B.; SENHORINHO, G. N. A.; GIOSSO, M. A.; AVILA-CAMPOS, M. J. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens of dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.23-28, 2007.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L.F.; SOUZA, L.L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p447-452, 1998.

O ESTADO DO PARANÁ. Substância em descongestionantes nasais pode agravar problemas respiratórios, 2008, disponível em: <<http://www.parana-online.com.br/canal/vida-e-saude/news/39793/>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2009.

PACHALY, J. R. Odontoestomatologia. In: CUBAS, Z. S. **Tratado de Animais Selvagens**. 1.ed. São Paulo: Roca, 2006, cap.64, 1068-1091p.

PACHALY, J. R.; GIOSSO, M. A. The Oral Cavity. In: FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. *Biology, Medicine and Surgery of South – American Wild Animals*. Ames, 2001, p. 457-463.

PINTER, L.; NOBLE, W. C. Stomatitis, pharyngitis and tonsillitis caused by *Malassezia pachydermatis* in a dog. **Veterinary Dermatology**, v.9, p.257-261, 1998.

RADOSAVLJEVIC, M.; KOENIG, H.; LETSCHER-BRU, V.; WALLER, J.; MALOISEL, F.; LIOURE, B.; HERBRECHT, R. *Candida catenulata* Fungemia in a Cancer Patient. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.2, p.475–477, 1999.

RAPOSO, B. R.; NOBRE, M. O.; FERNANDES, C. G.; PORTO, M. Candidíase cutânea em um canino. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v.2-3, p.11-14, 1996.

RIPPON, J. N. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In: **Medical Micology**, Saunders, 1988, 797p.

ROZA, M. R. **Odontologia em pequenos animais**. 1.ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros de Veterinária, 2004. 361p.

SAIDLA, J. E. Odontologia: Considerações Genéticas, Ambientais e outras. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária - Doenças do Cão e do Gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. v.2, p. 1189-1197.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A.; BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.1-7, 2002.

SCOTT, D. W.; MILLER JR, W. H.; GRIFFIN, C. E. Doenças do ouvido externo. In: **Muller & Kirk Dermatologia de Pequenos Animais**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. p.907-925.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, C. A. M.; FUNARI, S. R. C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, n.1, Botucatu, 2001. Disponível em: <[www.scielo.br](http://www.scielo.br)>. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

SHAREEF, B. T.; HARUN, A.; ROZIAWATI, Y.; SHAIFUL BAHARI, I.; DERIS, Z. Z.; RAVICHANDRAN, M. Recurrent *Trichosporon asahii* Glossitis: A Case Report. **Journal Contemporary Dental Practice**, v.9, n.3, p.114-120, 2008.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287p.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 408p.

SLOOF, W.C. Genus *Pityrosporum*. In: Lodder, J. ed 1974. **The yeasts: a taxonomic study**, 3, Amsterdam, North-Holland, p.1167-1186, 1974.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B. L. C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Revista Odonto Ciência**, v.21, n.53, 2006.

SONMEZ, S.; KIRILMAZ, L.; YUCESAY, M.; YÜCEL, B.; YILMAZ, B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.371–376, 2005.

SÓRIA, F. B. A.; CLEFF, M. B.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SOUZA, L.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Métodos de colheita para o isolamento de leveduras em cavidade oral e mucosa vaginal de cadelas, 2002, Pelotas. **Anais do XI Congresso de Iniciação Científica e 4º Encontro de Pós-Graduação (ENPOS)**.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, R.; SHINODA, T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1985–1993, 1999.

SUGITA, T.; NISHIKAWA, A.; SHINODA, T. Rapid detection of species of the opportunistic yeast *Trichosporon* by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.5, p.1458–1460, 1998.

- SUGITA, T.; TAJIMA, M.; TAKASHIMA, M.; AMAYA, M. SAITO, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. A new yeast, *Malassezia yamatensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. **Microbiology and Immunology**, v.48, n.8, p.579-583, 2004.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; KODAMA, M.; TSUBOI, R.; NISHIKAWA, A. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.4695-4699, 2003.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; SHINODA, T.; SUTO, H.; UNNO, T.; TSUBOI, R.; OGAWA, H.; NISHIKAWA, A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1363-1367, 2002.
- SUGITA, T.; TAKASHIMA, M.; IKEDA, R.; NAKASE, T.; SHINODA, T. Intraspecies Diversity of *Cryptococcus albidus* Isolated from Humans as Revealed by Sequences of the Internal Transcribed Spacer Regions. **Microbiology and Immunology**, v.45, n.4, p.291-297, 2001.
- TEIXEIRA, M. L.; MEZZARI, A. Prevalência de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* em Próteses Dentárias. **NewsLab**, ed. 70, p.116-122, 2005.
- TELHADO, J.; JUNIOR, A. M.; DIELE, C. A.; MARINHO, M. S. Incidência de cálculo dentário e doença periodontal em cães da raça Pastor Alemão. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.2, p.99-104, 2004.
- THOMSON, P. MIRANDA, G. SILVA, V. Linfadenitis canina produzida por *Cryptococcus neoformans*. Primer caso en Chile. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.23, p.238-240, 2006.
- TOMÁS, I.; COUSIDO, M. C.; TOMÁS, M.; LIMERES, J.; GARCÍA-CABALLERO, L.; DIZ, P. *In vivo* bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes. **Archives of oral biology**, v.53, p.1186-1191, 2008.
- TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. C. Microbiota ou Flora Normal do Corpo Humano. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM. **Microbiologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2005, cap.12, p.101-109.
- TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p.135-140, 2008.
- VENTURINI, M.; FERRO, D. G. CORREA, H. L.; GIOSO, M. A. Doenças da cavidade oral atendidas no Centro Odontológico Veterinário durante 44 meses – estudo retrospectivo. **Nosso Clínico**, n.59, p.6-12, 2007.
- VERSTRAETE, F. J. M. Patologia e Microbiologia Dentárias. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, 2.ed. São Paulo: Manole, 1998, v.2, cap. 176, p. 2733-2743.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENS, J. FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infection due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, supplement 1, p.48-66, 2004.

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 Microbiology And Immunology**, v.15, p. 245–248, 2000.

WALTIMO, T. M. T.; ORSTAVIK, D.; SIRÉN, E. K.; HAAPASALO, M. P. P. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. **International Endodontic Journal**, v.32, p.421-429, 1999.

WALTIMO, T. M. T.; SEN, B. H.; MEURMAN, J. H.; ORSTAVIK, D.; HAAPASALO, M. P. P. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v.14, n.2, p. 128-137, 2003.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R.G **Dermatologia dos pequenos animais - Guia para o diagnóstico-** 2.ed. São Paulo: Manole, 1996, 304p.

WILLIAMS, M. Propolis Cures Yeast Infection in the Mouth. **Bastyr Center for Natural Health**, v.19, 2005. Disponível em: <<http://bastyrcenter.org/content/view/979/&page>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2009.

WOODGYER, A. *Trichosporon* - recent developments. **Mycoses Newsletter**, v.9, n.1, p.18-21, 2004.

YARROW, D.; AHEARN, D.G. Genus 7. *Malassezia* Baillon. In The Yeasts a taxonomic. ZEEP, C.P. (1950). Ear disease of the dog and cat. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.14, p.15-19, 1984.

## **Apêndice**

## Apêndice A – Ficha de identificação dos animais

Nº da ficha: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) M ( ) F ( ) Não castrado(a) ( ) Castrado(a)

Dieta: ( ) Ração  
 ( ) Ração + comida caseira  
 ( ) Comida caseira

### EXAME ODONTOLÓGICO

Conformidade cranial:

- ( ) Braquicefálico  
 ( ) Dolicocefálico  
 ( ) Mesocefálico

Fraturas dentárias:

- ( ) Sim Qual(ais)? \_\_\_\_\_  
 ( ) Não

Presença de cálculo dentário:

- ( ) Sim ( ) Pouco ( ) Muito  
 ( ) Não

Presença de corpo estranho:

- ( ) Sim ( ) Não

Halitose:

- ( ) Sim  
 ( ) Não

Maloclusão:

- ( ) Sim Qual? \_\_\_\_\_  
 ( ) Não

Hemorragia gengival:

- ( ) Sim ( ) Não

Histórico/presença de gengivite, periodontite ou outra afecção na cavidade oral?

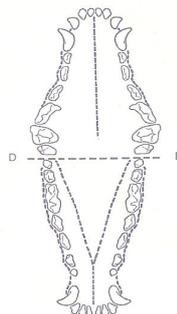
- ( ) Sim Qual? \_\_\_\_\_  
 ( ) Não

Profundidade de sulco (sondagem periodontal):

4º pré-molar superior direito: \_\_\_\_\_ mm

Canino superior esquerdo: \_\_\_\_\_ mm

Obs.: \_\_\_\_\_



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)