

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ AMAZÔNIA
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. NA CAVIDADE ORAL DE
PACIENTES COM E SEM PRÓTESE DENTÁRIA
ATENDIDOS NAS UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DA
CIDADE DE MANAUS-AM**

SHIRLEY MARIA DE ARAÚJO PASSOS

MANAUS – AM

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ – UFPA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ AMAZÔNIA
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,
SOCIEDADE E ENDEMIAS NA AMAZÔNIA**

SHIRLEY MARIA DE ARAÚJO PASSOS

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. NA CAVIDADE ORAL DE
PACIENTES COM E SEM PRÓTESE DENTÁRIA
ATENDIDOS NAS UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DA
CIDADE DE MANAUS-AM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da UFAM, UFPA e ILMD/FIOCRUZ–Amazônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

Orientadora: Adriana Sotero Martins, Dra.

Co-Orientadora: Ani Beatriz Jackisch Matsuura, Dra.

MANAUS – AM

2009

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Araújo-Passos, Shirley Maria de

A663p Prevalência de *Candida* spp. na cavidade oral de pacientes com e sem prótese dentária atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus-Am / Shirley Maria de Araújo Passos. - Manaus: UFAM, 2009.

100 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Sotero Martins

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

1. *Candida* 2. Candidíase oral 3. Doenças infecciosas I. Sotero-Martins, Adriana II. Jackisch-Matsuura, Ani Beatriz III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 616.934:616.314(811.3)(043.3)

SHIRLEY MARIA DE ARAÚJO PASSOS

**PREVALÊNCIA DE *Candida* spp. NA CAVIDADE ORAL DE
PACIENTES COM E SEM PRÓTESE DENTÁRIA
ATENDIDOS NAS UNIDADES BÁSICAS DE SAÚDE DA
CIDADE DE MANAUS-AM**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da UFAM, UFPA e ILMD/FIOCRUZ–Amazônia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia.

Aprovado em 31 de Março de 2009

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: Dra. Adriana Sotero Martins (ENSP/FIOCRUZ-RJ)

TITULAR: Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (ILMD/FIOCRUZ/AM)

TITULAR: Dr. João Vicente Braga de Souza (FMT/AM)

DEDICATÓRIAS

Ao meu pai *Camilo Augusto de Araújo (in memorian)*

Exemplo de vida.

À minha mãe *Maria Sila Diniz de Araújo,*

Que muito se esforçou para o meu crescimento e formação.

Aos meus irmãos: *Paulo César, Paula Sheila e Sirleana,*

Que sempre estiveram ao meu lado nos momentos que mais necessitei.

Ao meu esposo *Raimundo Ribeiro Passos*

Por seu amor, compreensão, carinho e dedicação.

Ao meu filho *Victor de Araújo Passos*

Que me encanta a cada dia, tornando os meus dias mais felizes.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Universidade Federal de Pará (UFPA) e Instituto Leonidas e Maria Deane (ILMD)/FIOCRUZ–Amazônia,

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane, da FIOCRUZ –Amazônia na pessoa do Sr. Diretor Roberto Sena Rocha, por permitir a utilização do Laboratório de Biodiversidade, para o desenvolvimento dos experimentos.

À Secretaria Municipal de Saúde – Manaus-AM, na pessoa do Sr. Secretário Municipal de Saúde em exercício, médico Jesus Pinheiro, que autorizou a realização da Pesquisa na Secretaria Municipal de Saúde.

A toda a minha família, mãe, irmãos, marido e filho, que de inúmeras maneiras contribuíram para as minhas realizações e sucesso.

A minha orientadora Dra. Adriana Sotero Martins, por ter me dado o primeiro voto de confiança no início do meu mestrado, pois com o seu incentivo e crédito pude adentrar no caminho da pesquisa. Obrigada pelo seu entusiasmo!

A minha co-orientadora, Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura, por me ensinado a trabalhar na área da micologia, a todos os seus incentivos, toques, correções, aquisição de materiais e principalmente à sua amizade, carinho e conversas sobre “filhos”. Amei!

A minha mais “nova” amiga Renata Gualberto que com sua simpatia e simplicidade tornaram os dias no laboratório menos estressantes. Obrigada pela ajuda!

Ao colega e amigo, Hugo Valério que desde o início deste trabalho me ajudou com artigos, idéias, preparo de reagentes e soluções da biologia molecular e uso de equipamentos, principalmente na fase de identificação molecular. Obrigada pela mão!

Aos colegas e amigos de laboratório: Juracy, Patrícia, Angelita, Ivana, Gustavo, Mota, Nete, Wilson, Greice, Leidiane, Josy, André e principalmente a Michele. Agradeço por suas companhias, amizades, conversas e prestatividade, durante os dias de trabalho no laboratório.

À Marizete, secretária da Biodiversidade, que desde o início do mestrado se mostrou muito prestativa e colaboradora, principalmente com pedidos de material e telefones.

A Dra. Ormezinda Celeste C. Fernandes, que me ajudou com seus toques, idéias e materiais. Foi muito bom tê-la reencontrado nesta etapa tão importante da minha vida.

Ao Dr. Sérgio Luz, pelos materiais de biologia molecular que disponibilizou para que eu pudesse continuar minha pesquisa.

A toda a equipe e infra-estrutura do Instituto Leônidas e Maria Deane, da FIOCRUZ - Amazônia, às pessoas que trabalham na recepção, na biblioteca, no Laboratório de Biodiversidade em Saúde, no restaurante e aqueles que mantêm tudo sempre limpo e organizado para o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

Aos meus colegas de Mestrado: Ivana, Lorena, Evangeline, Gustavo, Maurício, Jerferson, Ada, Adenilda, Tarciana, Alexandra, Loyana, Rossana e Selma. Obrigada pelos toques, foi muito bom tê-los conhecido.

Aos professores da Pós-Graduação Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia da UFAM, UFPA e ILMD/FIOCRUZ–Amazônia. Em especial à Dra. Luiza Garnelo por ser exemplo de dedicação no ensino e na pesquisa. Aprendi muito com vocês!

A toda a equipe da Secretaria Acadêmica, principalmente Laura e Elen, que sempre estiveram atentas aos prazos e disciplinas. Vocês são muito especiais!

Aos diretores, dentistas e auxiliares de consultório dentário das Unidades Básicas de Saúde nas quais foram realizadas as coletas de *Candida* nos pacientes. Sem a colaboração de vocês esta pesquisa não seria possível.

A todos os pacientes que cordialmente e gratuitamente contribuíram para mais um avanço na área da pesquisa.

E, principalmente,

A Deus, Pai e ao Senhor Jesus Cristo que está no céu e ao mesmo tempo habita em meu coração, que possibilita o meu andar, o meu caminhar e todas as minhas conquistas, a Ele toda glória agora e para sempre, Amém.

Os jovens correm e se cansam e os moços de exaustos caem, mas os que esperam no Senhor renovam as suas forças, sobem com asas como águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam.

Isaías 40: 30-31

RESUMO

A candidíase oral é uma doença infecciosa causada geralmente pela *Candida albicans*, habitante comum da cavidade bucal de pessoas saudáveis. O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das diferentes espécies de *Candida* em pacientes atendidos nas Unidades Básicas de Saúde/SEMSA na cidade de Manaus/AM, usuários ou não de prótese dentária. Foi realizado um estudo transversal pela análise de amostras de *Candida* da cavidade oral. As amostras foram coletadas de 594 pacientes atendidos em 10 UBS's e cultivadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose com clorafenicol e feito exame direto (método de Gram). As leveduras foram submetidas à identificação bioquímica utilizando-se o Kit Candifast® e estudo morfológico com microcultivo em ágar fubá com Tween 80. A identificação de *C. dubliniensis* foi feita com *primer* espécie-específico. A análise dos resultados foi realizada através de medidas de frequências, média, mediana, desvio-padrão e intervalo de confiança e utilizados os testes t de *Student*, ANOVA, qui-quadrado de *Pearson* e exato de *Fisher*. Os dados foram armazenados e analisados utilizando o *software* Epi-Info versão 3.5. Das 594 pessoas participantes, 436 são do gênero feminino e 158 do gênero masculino, com média de idade de $32,5 \pm 11,6$. Culturas positivas para *Candida* foram observadas em 50% dos pacientes. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente seguida pela *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. glabrata*. Fatores como gênero, idade, tratamento médico e uso de medicamentos foram diretamente associados com a presença de *Candida* na cavidade oral. Do total de pacientes, 188 usavam prótese dentária, com prevalência de *Candida* de 75%, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Foi confirmada por PCR a identidade de 113 amostras de *C. albicans* e identificados 28 isolados de *C. dubliniensis*. Podemos concluir que a prevalência das espécies de *Candida* tanto em pacientes usuários de prótese como em indivíduos com dentição natural foi semelhante a prevalência encontrada em outras regiões do Brasil e outros países. Os dados sugerem, ainda, que oligonucleotídeos específicos CdF/CdR e CaF/CdR, utilizados neste estudo, foram efetivos para confirmar isolados de *C. albicans* e eficientes para identificar *C. dubliniensis* a partir desses isolados.

Palavras-chave: *Candida*; prevalência; candidíase; prótese dentária; cavidade oral.

ABSTRACT

Oral candidosis is an infection disease caused mainly by *Candida albicans*, normal commensal yeast in oral cavity of healthy individuals. The aim of this study was determine the prevalence of different species of *Candida* in patients of Basic Unit of Healthy (UBS)/SEMSA in Manaus city/Amazon state/Brazil, that wearing denture or present natural teeth. This transversal study was performed by analysis of oral mucosa samples. The samples were collected of 594 patients in ten UBS's and were cultured in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar with chloramphenicol and direct analysis (Gram method). The yeasts were submitted to biochemical identification with Candifast® (International Microbio) and morphological study on Corn Meal Tween 80 Agar. *C. dubliniensis* identification was carried out by primer-specific amplification. The analysis of the results was made by measurements of frequencies, average, median, standard deviation and confidence limits and also was used Student's t method, ANOVA tests, Pearson chi-square and Fischer Exact test. The data were analyzed by Epi-Info software, version 3.5. In the total 594 patients taken, 436 were women and 158 were men of ten UBS-SEMSA, with the average age of 32.5 ± 11.6 years old. *Candida* species occurred in 50% of patients. *C. albicans* was the most prevalent species followed by *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. glabrata*. Factors like gender, age, medical treatment and use of medication were directly associated with the presence of *Candida* in oral cavity. In the patients taken, 188 wearing denture, with 75% of prevalence of *Candida* and present a significant statistical difference ($p < 0.05$). It was confirmed, by PCR, the identity of 113 samples for *C. albicans* and 28 samples were identified as *C. dubliniensis*. We concluded that the prevalence of species of *Candida* in patients wearing denture, as well as individuals with natural teeth, was the same that observed in other regions of Brazil and other countries. The data suggested the specific oligonucleotides CdF/CdR and CaF/CdR, used in this work, were effective to confirm *C. albicans* species and efficient to identification of *C. dubliniensis* species from theses isolates.

Key-words: *Candida*; oral cavity; candidosis; denture; prevalence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Candidíase bucal atrófica aguda (A) e Candidíase bucal pseudomebranosa aguda (B).....	5
Figura 2. Candidíase bucal hiperplásica crônica.	6
Figura 3. Candidíase atrófica crônica (A) e Queilite angular (B).	7
Figura 4. Exemplo de prótese total superior em péssimo estado de conservação e má higienização (A) superfície oclusal e (B) superfície palatina.....	8
Figura 5. Técnica de coleta do material clínico e de semeadura.	26
Figura 6. Exemplo de análise morfológica das colônias em placas de petri contendo Ágar Sabouraud.	27
Figura 7. Identificação Bioquímica no Kit Candifast®.....	28
Figura 8. Microscopia óptica de microcultivos de culturas semeadas em lâminas contendo Ágar Fubá com Tween 80, coradas com uma gota de azul de lactofenol. <i>C. albicans</i> (200X). Visualização de estruturas características de <i>C. albicans</i> neste tipo de teste: clamidosporos (1); pseudohifas (2).....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho da amostra geral e amostra no estrato.....	22
Tabela 2. Algumas propriedades dos oligonucleotídeos espécie-específicos para <i>C. albicans</i> e <i>C. dubliniensis</i>	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Unidades Básicas de Saúde da SEMSA sorteadas para coleta de amostra.	24
Quadro 2. Amostras de <i>C. albicans</i> utilizadas para identificação molecular.	30
Quadro 3. Concentrações e respectivos volumes usados na PCR dos <i>primers</i> de oligonucleotídeos espécie-específicos. [] = concentração.	34
Quadro 4. Condições de termociclagem para a amplificação de fragmentos gerados pelos <i>primers</i> de oligonucleotídeos espécie-específicos.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

dATP	2' desoxirriboadenosina trifosfato
dCTP	2' desoxirribocitidina trifosfato
dTTP	2' desoxirribotimidina trifosfato
dGTP	2' desoxirriboguanidina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídio trifosfatado
DO	densidade óptica
DVO	Dimensão vertical de oclusão
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
ETS	Espaço transcrito externo
Ig	Imunoglobulina
IGS	Espaço intergênico
ITS	Espaço transcrito interno
Kb	Quilobases
LGM	Leste/Gilson Moreira
LLC	Leste/Luiza do Carmo
Mb	Mega bases
NAV	Norte/Arthur Virgílio
NFV	Norte/Frei Valério
NTS	Espaço não transcrito
OBP	Oeste/Bairro da Paz
ORS	Oeste/Rayol dos Santos
P	Prótese
Pb	pares de base
PCR	reação da polimerase em cadeia
RNA	ácido ribonucléico
S	coeficiente de Svedberg
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFC	Sul/Frank Calderon
SLB	Sul/Lourenço Borgui

SLF	Sul/ Lúcio Flávio
SML	Sul/Morro da Liberdade
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
YPD	extrato de levedura-peptona-glicose

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE QUADROS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Etiologia e patogenia da Candidíase Oral	3
2.2 Classificação da candidíase	4
2.3 O uso de prótese dentária como fator predisponente à estomatite protética	7
2.4 Epidemiologia das espécies de <i>Candida</i> na cavidade oral	10
2.5 Diagnóstico laboratorial	11
2.6 <i>Candida albicans</i> e <i>Candida dubliniensis</i>	14
2.7 Drogas antifúngicas	16
3. OBJETIVOS	20
3.1- Geral	20
3.2- Específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 Delineamento do Estudo.....	21
4.2 População de Estudo/ tempo de investigação	21
4.2.1 Amostragem	21
4.2.2 Composição da amostra	23
4.2.3 Critérios de Inclusão:	23
4.2.4 Critérios de Exclusão:	24
4.3 Aplicação do questionário, exame do paciente e coleta do material clínico.....	24
4.4 Processamento das Amostras:	26
4.4.1 Exame direto e isolamentos primários das leveduras:	26
4.4.2 Identificação das Espécies	27
4.4.3 Identificação Molecular	29
4.5 Preservação das leveduras em Coleção Biológica	34
4.6 Análise Estatística	35
Artigo 1 – Espécies de <i>Candida</i> prevalentes na cavidade oral de pacientes com e sem prótese dentária atendidos em Unidades Básicas de Saúde na cidade de Manaus/AM-Brasil	36

Artigo 2 – Detecção de <i>Candida dubliniensis</i> a partir de amostras previamente identificadas como <i>Candida albicans</i> isoladas da cavidade oral de pessoas da cidade de Manaus-AM, Brasil	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO I – Carta de Autorização da Secretaria Municipal de Saúde	87
ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	88
ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	89
ANEXO IV – Questionário	91
ANEXO V – Equipamentos	93
ANEXO VI – Meios de Cultura	95
ANEXO VII – Soluções	97
ANEXO VIII – Enzima e Produtos para Biologia Molecular	99
ANEXO IX – Modelo da Carta ao Diretor da Unidade.....	100

1. INTRODUÇÃO

A candidíase, também denominada candidose ou monilíase, é uma doença infecciosa causada geralmente pela levedura *Candida albicans*. Entretanto, outras espécies podem estar envolvidas, tais como *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii* e *C. lusitanae*. A *Candida* é um habitante comum da cavidade bucal, trato gastrintestinal e da vagina de pessoas saudáveis. Para causar a doença é preciso ocorrer a penetração do microrganismo nos tecidos, o qual depende de fatores ligados ao hospedeiro (locais e gerais, mecânicos, nutricionais, fisiológicos, sistêmicos e iatrogênicos) e ao microrganismo (patogenicidade) (SHAFFER, 1987; SIDRIM; ROCHA, 2004; LORENZO, 2004; NEVILLE et al., 2004).

As leveduras estabelecem um equilíbrio com o hospedeiro, no entanto, quando este equilíbrio é rompido, devido a mudanças no mecanismo de defesa e no ambiente oral (quimioterapia, radioterapia, HIV-positivo, etc.), estas leveduras podem causar infecções orais oportunistas que se não tratadas podem se tornar generalizadas e/ou disseminarem sistemicamente provocando fungemia (GREENSPAN et al., 1994; FARIAS et al., 2003). A transição das leveduras de comensal inócuo à parasita prejudicial depende tanto de fatores de virulência do microrganismo como da susceptibilidade do hospedeiro (GASPARETTO et al., 2005).

Somente a presença de *Candida* na boca não é suficiente para produzir clinicamente a doença. Gasparetto et al. (2005), aponta vários fatores que favorecem a predisposição para candidíases que são classificados como fatores intrínsecos ou próprios do hospedeiro, como neoplasias, diabetes, hemopatias diversas, síndrome da imunodeficiência humana e todas as doenças que alteram a imunidade celular, velhice, gravidez, prematuridade, entre outros; e

fatores extrínsecos, como antibioticoterapia, quimioterapia, radioterapia, antiblásticos, cirurgia de transplantes e ambientes hospitalares contaminados.

Além dos fatores gerais do indivíduo devem ser considerados os fatores locais como uso de próteses dentárias, a colonização prévia da mucosa por microrganismos com potencial de virulência e a sua capacidade de aderência às células do hospedeiro (DORKO et al., 2001; GASPARETTO et al., 2005).

Nas últimas décadas, o número de espécies de *Candida* de importância médica tem crescido constantemente e constitui o grupo dominante de infecções fúngicas (MATSUMOTO et al., 2001; COLOMBO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004). A candidíase orofaríngea, comum em pacientes imunodeprimidos, é normalmente precedida de colonização das superfícies das mucosas orais, e a candidíase sistêmica, que está relacionada a altos índices de mortalidade, pode ocorrer devido à prévia colonização da cavidade oral ou da orofaringe por cepas de alta resistência, por isso, a análise dos tipos e frequência de *Candida* na cavidade oral é de fundamental importância (FARIAS et al., 2003).

A evolução da resistência a drogas antifúngicas traduz, neste momento, uma crescente preocupação com a saúde pública devido ao rápido aumento na incidência das infecções fúngicas em pacientes imunodeprimidos e em ambientes hospitalares (COWEN, et al., 2002; RIBEIRO et al., 2004). Para conduzir medidas eficazes de tratamento à candidíase oral é necessário que se façam estudos de identificação, prevalência e suscetibilidade para a inferência em análises epidemiológicas da infecção. No estado do Amazonas, mais especificamente para a cidade de Manaus, não constam, até o presente momento, estudos a respeito da prevalência das espécies de *Candida* na cavidade oral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Etiologia e patogenia da Candidíase Oral

O desenvolvimento da candidíase oral é favorecido por uma combinação de fatores ligados ao indivíduo e ao microrganismo. A infecção tem início quando há uma modificação no mecanismo de defesa do hospedeiro e o microrganismo passa de comensal a parasita. Como mudanças locais na mucosa e/ou pele do indivíduo pode-se destacar: mudanças na hidratação, no pH, nas concentrações de nutrientes e alterações na microbiota (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As espécies de leveduras capazes de produzir patogenicidade para o homem, podem apresentar as seguintes características: (1) crescer a 37°C; (2) formar estruturas filamentosas como hifas e pseudohifas com mais de 200 µm, apresentando um obstáculo à fagocitose; (3) produzir metabólitos, como por algumas espécies de *Candida*, capazes de manifestar reações alérgicas do tipo imediato e tardio; (4) presença de grande quantidade de leveduras podendo levar a depressão da imunidade celular; (5) produzir enzimas como lipase e proteinase; (6) variação fenotípica e aderência (SIDRIM; ROCHA, 2004; RIBEIRO et al., 2004; THIELE, 2005).

Penha et al. (2000), em São Paulo, avaliaram pacientes edêntulos com e sem estomatite protética e identificaram as leveduras presentes e os níveis de proteinase e fosfolipase produzidos por *Candida albicans*. Como resultados obtiveram que *C. albicans*, a espécie mais freqüente, prevaleceu em pacientes com estomatite protética, sendo esses isolados fortemente positivos para proteinase (100%), porém não houve correlação da atividade enzimática com a severidade das lesões presentes nos pacientes com estomatite protética.

Thiele (2005), em Curitiba, realizou um estudo com o objetivo de avaliar a relação entre a produção de enzimas histolíticas (condroitinase e aspartil-protease) de *Candida* e fatores predisponentes de pacientes usuários de prótese total como etilismo, tabagismo, uso de antidepressivos, anti-hipertensivos, diabetes mellitus e estado de conservação e idade das próteses. Encontrou que não existe uma participação significativa das enzimas histolíticas estudadas no processo de desenvolvimento da estomatite protética e que os hábitos de higiene da prótese total e o estado de conservação da mesma tem maior significância clínica.

2.2 Classificação da candidíase

Candidíase é classificada em duas categorias principais: candidíase mucocutânea e candidíase sistêmica. A candidíase bucal ou orofaríngea constitui uma das formas de candidíase mucocutânea. A candidíase bucal, uma das formas de candidíase mucocutânea, é classificada segundo Lehner (1972) *apud* Shafer (1987) como:

Aguda

a) **Candidíase bucal pseudomembranosa aguda** (sapinho) - caracterizada por placas brancas que quando removidas deixam uma área erosionada eritematosa, observada com maior frequência em crianças, idosos, diabéticos e imunodeprimidos (Figura 1).

b) **Candidíase bucal atrófica aguda** - mostra uma área de ulceração rasa e extensa, sem presença de membrana aparente, muito dolorosa e com sensação de queimação (Figura 1).



Figura 1. Candidíase bucal atrófica aguda (A) e Candidíase bucal pseudomebranosa aguda (B).
Fonte: MARCUCCI; CRIVELLO JR., 2005 (A) e NEVILLE et al., 2004 (B).

Crônica

a) **Candidíase bucal hiperplásica crônica** - também denominada leucoplásica por apresentar placas brancas que não se destacam, semelhantes à leucoplasia, observada com certa frequência em pacientes usuários do tabaco, quando tem sido associado com a redução de IgA salivar (Figura 2).

b) **Candidíase mucocutânea crônica** – caracterizada por quadros que acometem simultaneamente a pele, unhas e mucosas e possui uma longa evolução clínica, com resistência a tratamentos, geralmente relacionadas a problemas auto-imunes.

c) **Candidíase bucal atrófica crônica** - é caracterizada por eritema crônico, comumente vista no palato sob base de prótese dentária e na comissura labial em consequência da perda da dimensão vertical de oclusão (DVO), da idade avançada denominada de queilite angular por candidíase (Figura 3).



Figura 2. Candidíase bucal hiperplásica crônica.

Fonte: MARCUCCI; CRIVELLO JR., 2005

A candidíase atrófica crônica, também denominada estomatite protética, é uma condição caracterizada por vários graus de eritema localizados na mucosa, estando esta em contato direto com as bordas de uma prótese superior removível. O trauma de prótese mal adaptada associado à má higienização da prótese age como fator predisponente ao aparecimento de lesões como a candidíase. O diagnóstico diferencial de outras etiologias consta de esfregaços do local e cultivo, que revelam a presença de hifas de *Candida* (LEMOS et al., 2003; LORENZO, 2004; GOIATO et al., 2005; MARCUCCI; CRIVELLO JR., 2005).

A estomatite protética, geralmente, é classificada de acordo com a aparência clínica da mucosa inflamada, sendo utilizada a classificação de Newton (1962), a qual compreende três tipos clínicos:

Hiperemia puntiforme - (classe I), limitada aos ductos das glândulas salivares palatinas menores;

Hiperemia difusa - (classe II), a inflamação é generalizada, a mucosa apresenta-se lisa e atrófica, abrangendo toda a região recoberta pela prótese;

Hiperemia granular - (classe III), caracterizada por uma mucosa hiperêmica, com aparência nodular, a qual pode estar presente em toda a região recoberta pela prótese, porém,

mais comumente restrita à região central do palato, sendo, particularmente, encontrada em áreas sob câmara de sucção das próteses totais (NEVILLE et al., 2004; LEMOS, 2003).

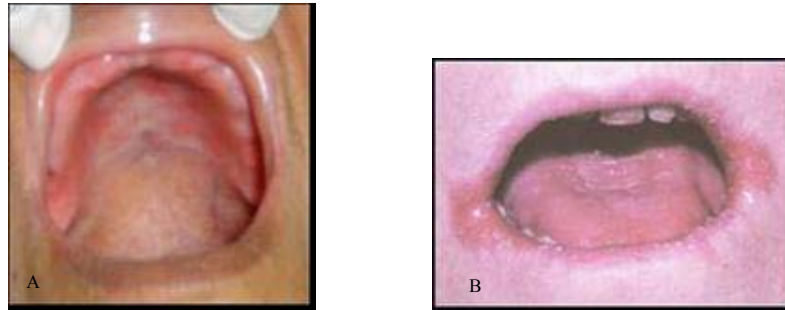


Figura 3. Candidíase atrófica crônica (A) e Queilite angular (B).

Fonte: (A) o autor e (B) NEVILLE et al., 2004.

O diagnóstico definitivo da estomatite protética é dado pelo somatório de sinais e sintomas clínicos e de exames micológicos como exame direto, cultura, exame histopatológico ou sorologia. Para Lemos et al., (2003), o diagnóstico deve ser embasado nos achados micológicos, associados aos sinais e sintomas clínicos, devendo ser ressaltado que os exames clínico e laboratorial não podem ser considerados isoladamente, mas estarem intimamente correlacionados.

2.3 O uso de prótese dentária como fator predisponente à estomatite protética

A superfície da prótese dentária se constitui em um sítio favorável para a colonização das leveduras, devido às porosidades da resina acrílica. A superfície palatal das dentaduras colonizadas por leveduras e outros microrganismos atua como um reservatório de infecção (COSTA et al., 1997; JORGE et al., 1997; DORKO et al., 2001; GRECCA et al., 2002; SILVA et al., 2002; GASPARETO et al., 2005).

As próteses dentárias podem contribuir para o início de determinadas patologias bucais. Isso depende dos cuidados quanto à confecção pelo laboratório de prótese e do planejamento e instalação das mesmas pelos dentistas (COSTA et al., 1997; GOIATO et al., 2005). Os hábitos de higiene bucal e limpeza de próteses pelos pacientes também estão estritamente relacionados à presença de leveduras e estomatite protética (KULAK-OZKAN, 2002). A Figura 4 mostra exemplo de superfície de prótese má higienizada e em péssimo estado de conservação.

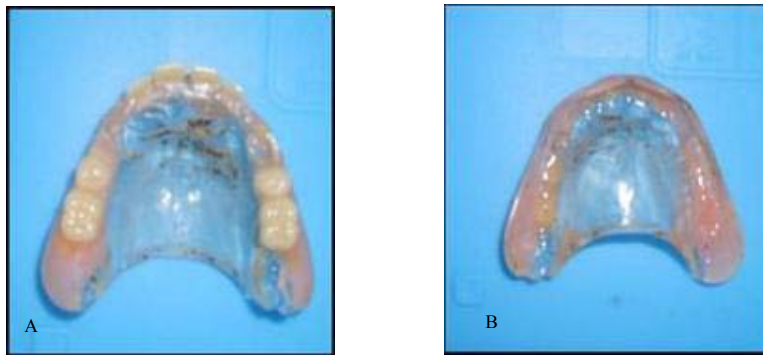


Figura 4. Exemplo de prótese total superior em péssimo estado de conservação e má higienização (A) superfície oclusal e (B) superfície palatina.

Fonte: o autor

Carvalho de Oliveira et al. (2000), realizaram estudo em portadores de prótese total e avaliaram vários fatores para esclarecer a relação dos aspectos funcionais e protéticos com a estomatite protética e concluíram que os fatores funcionais e qualitativos das próteses, avaliados isoladamente, não foram considerados responsáveis pela ocorrência dessa patologia, apesar de representarem uma tendência para ocorrência. E, concordam que a etiologia da estomatite protética é multifatorial.

A presença de *Candida* spp. no biofilme da prótese dentária é um fator importante para o desenvolvimento da estomatite protética. A produção de tubos germinativos por *Candida albicans* facilita a aderência às células epiteliais e a materiais plásticos (THIELE, 2005).

Jorge et al. (1997), em São Paulo, avaliaram 493 pacientes, os quais foram divididos em dois grupos: um com vários fatores predisponentes orais como: prótese total, prótese parcial removível, periodontite crônica em adultos, respiração bucal, aparelho ortodôntico fixo, removível e extra-bucal e o grupo controle que não apresentava nenhum desses fatores. O grupo controle apresentou 38,42% de indivíduos positivos para *Candida* e do grupo que apresentava fatores predisponentes, o de prótese total foi o que ocorreu uma maior porcentagem de pacientes positivos para *Candida* (82,66%). *C. albicans* foi a espécie mais prevalente nos dois grupos.

Quando a prótese dentária é instalada, como tratamento reabilitador, o paciente deve ser orientado quanto a não dormir com a prótese, a fim de se promover relaxamento e descanso dos tecidos, ao mesmo tempo em que a língua, a saliva, as bochechas e os lábios exercem ação de limpeza (GONÇALVES et al., 1995; LEMOS et al., 2003; GOIATO et al., 2005). Comumente os pacientes acometidos por candidíase atrófica crônica admitem utilizar as dentaduras de modo contínuo, removendo-as de vez em quando (NEVILLE et al., 2004).

Pires et al. (2002), afirmam que para o tratamento da estomatite protética, o uso local e/ou sistêmico de antifúngicos não são suficientes, faz-se necessário a substituição das próteses e a implementação de hábitos de higiene pelo paciente. Já, Oliveira et al. (2000), complementam que somente a renovação de próteses totais não tenha efeito direto na terapêutica da estomatite protética, mas também fatores como a presença de leveduras e estado geral do paciente devem ser avaliados. Kulak-Ozkan (2002), concorda com Pires et al. (2002), que hábitos como a higiene da prótese pelo paciente é fundamental para a prevenção da estomatite protética.

2.4 Epidemiologia das espécies de *Candida* na cavidade oral

Espécies de *Candida* têm sido encontradas na cavidade oral entre 20 a 50 % de indivíduos sadios, sendo a *C. albicans* a espécie mais comum, representando entre 60 a 90% das espécies isoladas. *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* também são encontradas com frequência (DORKO et al., 2001; SANTOS et al., 2002; DAR-ODEH, SHEHABI, 2002; PEREIRA et al., 2004; GASPARETO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

Grecca et al. (2002), em Curitiba, relacionaram o uso de próteses com o aparecimento de lesões orais em 30 pacientes usuários de prótese total e constataram a existência de candidíase, hiperplasias mucogengivais e úlceras traumáticas em 84% dos indivíduos que possuíam próteses com adaptação insatisfatória.

Dar-Odeh e Shehabi (2002), realizaram um estudo com 167 pacientes jordanianos usuários de prótese, com e sem estomatite protética, o qual revelou que 28% dos pacientes com estomatite protética foram colonizados por espécies de *Candida* e *C. albicans* foi a espécie responsável pela maioria dos casos de estomatite protética (72%) e a única espécie capaz de produzir aspartil-protease. As outras espécies de *Candida* isoladas foram *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

Lyon et al. (2006), em Minas Gerais, avaliaram condições predisponentes para a presença de *Candida* spp. na cavidade oral de 112 usuários de prótese e 103 indivíduos com dentição natural, concluíram que fatores como gênero, idade acima de 60 anos, baixa educação e xerostomia foram diretamente associados com a presença de *Candida* na cavidade oral, e o uso de prótese foi considerado o maior fator predisponente para a presença de *Candida* ($p = 0,001$). *Candida albicans* foi a espécie mais isolada (65,1%), outras espécies como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* foram encontradas com frequência. Fluconazol e Itraconazol mostraram-se eficazes contra a maioria dos isolados.

Dagistan et al. (2008), na Turquia, realizaram estudo em 70 pacientes sem imunossupressão, usuários de prótese total. Estomatite protética estava presente em 49 (70%) dos pacientes examinados. Espécies de *Candida* foram isoladas de 39 dos 49 pacientes com estomatite protética e 9 de 21 pacientes sem estomatite protética. A análise estatística mostrou que *Candida* spp. encontrada no palato do paciente está significativamente associada com a severidade da inflamação. *C. albicans* foi a espécie prevalente, tanto na mucosa do palato (68,8%) como da superfície da prótese (60,4%). Outras espécies de *Candida* foram isoladas, depois de *C. albicans* sendo *C. glabrata* a mais freqüente, seguida da *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*.

Há uma crescente preocupação com as leveduras do gênero *Candida*. Colombo e Guimarães (2003) citam que nos Estados Unidos *Candida* é a quarta causa mais comum de infecções de corrente sanguínea (7,2%) e que a candidemia é um problema de saúde pública. Afirmam também que espécies *Candida* não *albicans* respondem por pelo menos 50% das infecções invasivas por *Candida*. Este fato pode ser atribuído aos seguintes fatores: à importante ocorrência de outras espécies de *Candida*, à maior capacidade de aderência e à maior resistência observada entre as espécies de *Candida* não *albicans* aos antifúngicos; (EL AZIZI et al., 2004; GASPARETO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

2.5 Diagnóstico laboratorial

Para compreender o prognóstico, a epidemiologia e a terapêutica do gênero *Candida* é essencial identificar corretamente as diferentes espécies etiológicas e avaliar a capacidade de resistência as drogas. A rotina para identificação das leveduras envolve, além do exame da colônia e morfologia microscópica, várias reações bioquímicas. *C. albicans*, a espécie mais freqüente em materiais biológicos, tem sido identificada presuntivamente apenas pela

produção de tubo germinativo em soro e produção de clamidosporos em ágar fubá acrescido de *Tween 80* (prova do microcultivo) (LACAZ et al., 1991).

A prova do microcultivo possibilita o estudo micromorfológico das leveduras em meio ágar fubá com *Tween 80*. A técnica baseia-se no princípio de que a incubação das leveduras em meio com *Tween 80* e sob baixa tensão de oxigênio há a estimulação da produção de clamidosporos e filamentação possibilitando sugerir o gênero e, até mesmo a espécie através do estudo da presença e disposição dos blastosporos, artrosporos, hifas verdadeiras e pseudohifas. A presença de clamidosporos é característico de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A formação de clamidosporos tem servido para identificação de *C. albicans* por um longo tempo. Os clamidosporos são células largas, esféricas de paredes densas no final das pseudohifas que são produzidos por duas espécies, *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O papel desta estrutura na patogenicidade destas leveduras ainda é desconhecido. O desenvolvimento de novas ferramentas moleculares tem estimulado investigações para entender a morfologia e função dos clamidosporos (STAIB; MORSCHHAUSER, 2006).

Recentemente, a formação dos clamidosporos tem também sido usado como um método para distinguir *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Enquanto *C. albicans* geralmente produz um clamidosporo terminal nas pontas de longas hifas ou pseudo-hifas no teste do microcultivo, *C. dubliniensis* forma precocemente dois ou três clamidosporos em pontas de pseudohifas curtas nas mesmas condições de crescimento. Apesar dessa distinção na formação dos clamidosporos, a discriminação destas duas espécies requer vários testes adicionais (STAIB; MORSCHHAUSER, 2006).

As espécies de *Candida* não-*albicans* necessitam de provas de assimilação e fermentação de carbono que por sua vez consomem tempo, são trabalhosos, complexos e levam tempo para chegar ao resultado final. Atualmente, são comercializados painéis manuais

e automatizados para identificação de leveduras, cujo fundamento consiste em diagnosticar a capacidade assimilativa de substratos e determinar a atividade enzimática. Trata-se de testes que são de realização e interpretação fáceis, e oferecem o resultado em tempo menor devido à facilidade na interpretação (SILVA; CANDIDO, 2005; SIDRIM; ROCHA, 2004).

No mercado mundial, os kits manuais mais conhecidos são o API 20C AUX® (BioMérieux-Vitek), o API Candida® (bioMérieux), ID 32C (bioMérieux- Marcy-l'Etoile), o Auxacolor® (Sanofi Diagnostics Pasteur), o Uni-Yeast-Tek kit® (Remel Laboratories), e o CandiFast® (International Microbio). Esses testes usam um aumento na turbidez ou a produção de cor em cada um de uma série de poços contendo diferentes substratos para produzir um perfil bioquímico particular.

Com relação aos sistemas automatizados, os mais utilizados são o AutoMicrobic® (BioMérieux-Vitek) e o Microscan Rapid Yeast Ident® (Baxter), os quais utilizam painéis onde a incubação e leitura são feitas por sistema automatizado (SIDRIM; MOREIRA, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os sistemas utilizados para identificação bioquímica apresentam vantagens e desvantagens entre si, entre elas: o alto custo no mercado, limitação para a identificação de somente umas poucas espécies e identificação de poucas amostras em cada kit, não condizendo com a grande quantidade de material que entra diariamente na rotina de um laboratório de micologia da rede pública de saúde (SIDRIM; ROCHA, 2004; ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

A biologia molecular também tem sido utilizada para identificar espécies de leveduras, onde são empregados vários métodos para o diagnóstico clínico da candidíase, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Estes sistemas podem oferecer potencial para uma identificação rápida e específica das espécies causadoras da candidíase, comparado aos métodos fenotípicos tradicionais. Apesar de serem apontados como uma forma segura de

diagnóstico, ainda não está disponível na maioria dos laboratórios clínicos (RATÓN, 2004; ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

A maioria dos sistemas baseados em ácido nucléico usa a técnica da PCR para amplificar o ácido desoxirribonucléico (DNA) do fungo como o primeiro passo no processo de identificação. E na reação de amplificação por PCR alvos de ácidos nucléicos são utilizados. Antes que a amplificação por PCR possa ocorrer, alvos apropriados de DNA devem ser selecionados. Muitas regiões conservadas do DNA ribossomal têm sido os alvos mais populares para amplificação por PCR e tem incluído os genes do ácido ribonucléico ribossômico (rRNA), decritos por 5.8S, 18S e 28S. Outros alvos têm incluído regiões do espaço transcrito interno (ITS) do inglês, Internal Transcribed Spacer ou regiões do espaço intergênico (IGS) do inglês, Intergenic Spacer (CIRACK et al., 2003; SANDHU et al., 1995; RATÓN, 2004).

A principal vantagem de usar a amplificação de alvos de regiões do DNA para a qual são conservadas entre todas as espécies de *Candida* é que um produto da PCR pode ser obtido de todas as espécies usando um simples conjunto de iniciadores (*primers*) (ELLEPOLA; MORRISON, 2005).

2.6 *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*

A *Candida dubliniensis* é uma levedura descrita recentemente por Sullivan et al. (1995) como patógeno associado a pacientes imunocomprometidos. Isolada mais comumente de infecções da cavidade oral de pacientes positivos para HIV, também pode ocorrer em outros órgãos e sistemas de pacientes imunocomprometidos, positivos e negativos para HIV (SULLIVAN et al., 1995; SAHAND et al., 2006).

C. dubliniensis possui muitas características fenotípicas semelhantes a *C. albicans* e o diagnóstico diferencial entre as duas espécies pode ser confundido nos testes laboratoriais de rotina. Ambas crescem a 30 e 37°C, produzem colônias de cor creme em ágar Sabouraud

dextrose, produzem tubo germinativo e clamidosporos e apresentam perfil bioquímico semelhante (SIDRIM; ROCHA, 2004; SULLIVAN et al., 2005).

Vários métodos fenotípicos têm sido utilizados para identificar *C. dubliniensis* e diferenciá-la de *C. albicans*, como a inabilidade de *C. dubliniensis* em crescer a 45°C, exames morfológicos em vários meios, formação de clamidosporos (microcultivo) e alguns testes bioquímicos. Porém, estes testes não são suficientes para distinguir as duas espécies. Por exemplo, o teste da inabilidade de *C. dubliniensis* em crescer a 45°C não é 100%, visto que, algumas espécies de *C. albicans* também podem não crescer a esta temperatura. Embora possam ser utilizados métodos fenotípicos para sugerir *C. dubliniensis*, a discriminação entre as duas espécies se baseia, com mais certeza, utilizando-se técnicas de biologia molecular como a PCR (SULLIVAN et al., 1995; KHLIF et al., 2009).

Khelif et al. (2009), na Tunísia, isolou 14 cepas de *C. dubliniensis* proveniente de 12 pacientes HIV negativos, internados em UTI (ICU). Foram realizados vários testes como, crescimento a 45°C, produção de clamidosporos, cultura em Candiselect 4 (Biorad) e no teste comercial Bichro-Dubli fumouze®, com identificação específica para *C. dubliniensis*. Finalmente, para distinguir *C. albicans* de *C. dubliniensis* realizaram PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para identificar *C. dubliniensis* a partir de isolados de *C. albicans*, utilizando-se, para isto, polimorfismos do gene que codifica a proteína HWP1 (hyphal wall protein), expressas na fase micelial da levedura, o qual se mostrou ser muito específico. Estes autores recomendam a melhora no diagnóstico laboratorial de rotina para *C. dubliniensis* para elucidação da epidemiologia deste patógeno.

Sahand et al. (2006), analisaram a eficiência do kit Bichro-Dubli fumouze® que se baseia em teste de aglutinação antígeno/anticorpo para diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* utilizando quatro tipos de meio para o isolamento das leveduras. Foram testados 106 isolados de *C. dubliniensis*, dos quais 103 tiveram reação positiva com o Bichro-Dubli

fumouze®. Outras espécies de *Candida* (37) foram testadas com o kit e apresentaram reação negativa. A sensibilidade do teste foi de 97,1% e a especificidade de 100% e concluíram que o teste foi muito rápido, simples e viável para dar os mesmos resultados, independente dos meios para crescimento dos isolados, utilizados neste estudo.

Manfredi et al. (2002), na Inglaterra, isolaram *C. dubliniensis* da cavidade oral de cinco (3,6%) de 137 pacientes diabéticos, quatro do gênero feminino e um masculino, dois usavam prótese parcial e três usavam dentaduras completas. Willis et al. (2000), no norte da Irlanda, isolou 58 *C. dubliniensis* do total de 318 (18,2%) da cavidade oral de pacientes diabéticos insulino-dependentes, porém estes isolados foram encontrados co-colonizando a cavidade oral com *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, excluindo 13 isolados, ou seja, somente 4,1% dos pacientes foram colonizados somente por *C. dubliniensis*, com prevalência semelhante ao encontrado no estudo de Manfredi (2002), 3,6%.

A prevalência de *C. dubliniensis* na cavidade oral de pacientes HIV positivos pode ser encontrada entre 1,5 a 32%. Tem sido citada na literatura a infecção por *C. dubliniensis* na cavidade oral de pacientes HIV negativos, porém a prevalência desta levedura ainda está sendo pesquisada (Sullivan et al, 2005). Khlif et al. (2009), na Tunísia, encontraram 14 *C. dubliniensis* de 367 leveduras isoladas (3,8%) de 12 pacientes HIV negativos, internados em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) com várias doenças graves. Já, Al-Karaawi et al. (2002), realizaram caracterização de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de diversos setores clínicos de pacientes com diversos problemas bucais e encontraram *C. dubliniensis* presente em 5,8% (15/257) dos pacientes deste estudo.

2.7 Drogas antifúngicas

As principais drogas antifúngicas utilizadas na terapêutica contemporânea podem ser divididas nas seguintes categorias: (1) agentes originados de microrganismos: derivados poliênicos (nistatina e anfotericina B) e a griseofulvina; (2) agentes químicos: iodeto de

potássio, flucitosina, derivados azólicos (clotrimazol, miconazol, econazol, isoconazol, fluconazol, itraconazol, etc.), derivados morfolínicos (amorolfina) e equinocandinas (caspofungina) (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Para o tratamento da candidíase orofaríngea as drogas mais utilizadas são os derivados poliênicos como a nistatina e os derivados azólicos como o miconazol (tópico) e o fluconazol (oral). Em pacientes imunodeprimidos (quimioterapia, HIV, uso de corticóides, hospitalizados e outros) podem ser utilizadas algumas substâncias para prevenção da candidíase oral como solução salina e bicarbonato de sódio, que provocam ação adstringente e reguladoras do pH bucal (ANDRADE, 1998).

A nistatina é um antifúngico macrolídeo poliênico, isolado do *Streptomyces noursei* e apresenta atividade antifúngica sobre as várias espécies de *Candida*. Derivados poliênicos como a nistatina, ligam-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica, produzindo poros que aumentam a permeabilidade da membrana, ocorrendo perda de eletrólitos intracelular, alterando a homeostase da célula fúngica. A nistatina pode ser administrada oralmente para tratar lesões da cavidade oral ou do aparelho digestivo e pele pelo contato direto com o microrganismo (SIDRIM; ROCHA, 2004; FARIAS et al., 2003).

Os derivados azólicos possuem atividade antifúngica de amplo espectro, interferem na permeabilidade da membrana celular da célula fúngica. Atuam bloqueando a enzima 14- α -demetilase, presente no citocromo p-450, impedindo a demetilação do precursor lanosterol em ergosterol. Os derivados imidazólicos e triazólicos são os antifúngicos mais empregados na micologia médica. O miconazol e o fluconazol são a primeira escolha em lesões de candidíase da mucosa oral (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A clorexidina é um detergente catiônico, preparado sob a forma de diversos sais (acetato, cloridrato e o digluconato de clorexidina), apresenta ação antibacteriana e antimicótica, onde em estomatite por dentaduras inibe a aderência dos fungos ao aparelho

protético. É utilizada principalmente para o controle da placa bacteriana em ambiente oral (ANDRADE, 1998).

O tratamento da candidíase orofaríngea em pacientes imunodeprimidos (HIV - positivo, transplantados, quimioterapia, radioterapia, doenças auto-imunes) é realizado de diversas maneiras, por diferentes antifúngicos e dependendo do grau da lesão é usado por tempo prolongado. Este fato contribui para o aparecimento de espécies de leveduras resistentes. Vários estudos sobre a susceptibilidade *in vitro* de leveduras que causam infecção frente aos antifúngicos têm sido desenvolvidos (HENRY et al., 2000; WINGETER et al., 2007).

Azoles antifúngicos tais como o fluconazol (oral e intravenoso) e miconazol (tópico) usados para o tratamento ou profilaxia de infecções por *Candida*, em muitos casos, requerem uso prolongado. Essa prática, combinada com o uso indiscriminado e aumento do uso de azoles nos últimos anos, é o responsável mais provável pelo aumento de *C. albicans* resistentes a esses fármacos e de forma básica, outras espécies resistentes, tais como, *C. glabrata* e *C. krusei* (HENRY, et al., 2000, SIDRIM; ROCHA, 2004).

Farias et al. (2003), em Curitiba, avaliaram comparativamente as propriedades antifúngicas da nistatina 100.000 UI (Unidade Internacional) em relação à solução de digluconato de clorexidina a 0,2%. Em um estudo *in vitro* encontraram que a clorexidina 0,2% é superior no combate antifúngico das cepas de leveduras em relação a nistatina e sugerem o uso de solução de digluconato de clorexidina como substância terapêutica na prevenção, tratamento e alternativa complementar no combate antifúngico da candidíase oral.

Foi analisada a suscetibilidade de espécies de *Candida* a anfotericina B e fluconazol em pacientes jordanianos usuários de prótese, com e sem estomatite protética. Todos os isolados de *C. albicans*, *C.krusei*, *C.tropicalis* e *C. glabrata* foram suscetíveis a Anfotericina

B e enquanto 92% de *C. albicans*, 75% de *C. glabrata*, 50% *C. tropicalis*, 25% de *C. krusei* foram suscetíveis ao fluconazol (DAR-ODEH; SHEHABI, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1- Geral

- Determinar a prevalência das espécies de *Candida* na cavidade oral de pacientes, com e sem prótese dentária, atendidos em Unidades Básicas de Saúde da SEMSA (Secretaria Municipal de Saúde) na cidade de Manaus- AM.

3.2- Específicos

- Coletar e proceder ao isolamento de leveduras da mucosa oral de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde na cidade de Manaus- AM;
- Identificar, por métodos bioquímicos e morfológicos as espécies de *Candida* coletadas da cavidade oral e determinar as espécies de *Candida* prevalentes na cavidade bucal;
- Determinar a prevalência de *Candida* em pacientes portadores de prótese dentária removível parcial e total e correlacionar com a infecção estomatite protética;
- Confirmar, por método molecular, a real identidade de isolados caracterizados micromorfolologicamente e bioquimicamente como *C. albicans*, aventando a hipótese de que estas poderiam ser, em alguns casos, *C. dubliniensis*.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento do Estudo

Estudo transversal com coleta de amostras de saliva da mucosa da cavidade oral de pessoas atendidas em Unidades Básicas de Saúde da SEMSA (Secretaria Municipal de Saúde) na cidade de Manaus- AM.

4.2 População de Estudo/ tempo de investigação

Foram realizados exames micológicos (exame do material biológico a fresco e cultivo) de amostras da mucosa oral obtidas de pacientes sintomáticos e/ou assintomáticos para candidíase, portadores de prótese dentária ou não, atendidos em 10 Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus-AM da SEMSA, por um período de 4 meses, conforme autorização pelo Secretário de Saúde da SEMSA e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UFAM com CAAE nº.0057.0.115.115-07 (Anexo I e II).

Para cada pessoa participante deste estudo foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aplicado um questionário com questões que deram informações sobre o histórico médico e odontológico da pessoa (Anexo III e IV).

Todo o material utilizado na coleta de saliva e exame do paciente foi descartável, esterilizado e seguro, obedecendo às normas de vigilância sanitária e de biossegurança.

4.2.1 Amostragem

O cálculo da amostra foi baseado na estimativa de 45.316 pacientes maiores de 18 anos que foram atendidos de agosto a dezembro de 2006, período correspondente a realização da coleta em 2007, nas Unidades Básicas de Saúde – SEMSA na cidade de Manaus, com prevalência de *Candida* esperada de 50% de acordo com SANTOS et al. (2002), que realizou

estudo semelhante em Ponta Grossa e encontrou uma prevalência de 51,5%. O erro amostral estipulado foi de 4% e confiança de 95% (significância de 5%), totalizando 592 pacientes, utilizando o programa epi-info versão 3.4.1, conforme equação 1 (WAYNE, 1987):

$$\text{Equação 1: } n = \frac{N \cdot z^2 \cdot p(1-p)}{d^2 \cdot (N-1) + z^2 \cdot p(1-p)}$$

onde:

n = tamanho da amostra

N = população alvo

p = proporção estimada

d = precisão

z = valor da normal padronizada

A estratificação da amostra em cada distrito foi feito através da equação 2 ($nh=n/N*Nh$), ficando distribuído conforme a Tabela 1.

Zona	N	n
Sul	18223	238
Oeste	8886	116
Norte	10239	134
Leste	7968	104
Total	45316	592

Tabela 1. Tamanho da amostra geral e amostra no estrato.
Fonte: o autor

$$\text{Equação 2: } nh = \frac{n}{N * Nh}$$

Onde:

nh = amostra no estrato

n = amostra

N = população

Nh = população no estrato

4.2.2 Composição da amostra

A SEMSA dividiu a cidade de Manaus em quatro distritos. Para representar os distritos Norte, Leste e Oeste foram selecionadas duas Unidades Básicas de Saúde em cada distrito. Para o distrito Sul foram sorteadas quatro unidades, pois aproximadamente a metade do total da amostra estava concentrada nesse distrito (Tabela 1). O processo de sorteio se deu de forma ponderada, em que cada unidade possuía as mesmas probabilidades de participar da amostra relativa à sua contribuição para o total de pacientes atendidos em cada distrito. Foi enviada uma carta ao diretor (a) de cada unidade (anexo IX). As dez unidades sorteadas estão listadas na Quadro 1.

4.2.3 Critérios de Inclusão:

Foram incluídos na pesquisa pacientes com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, com ou sem sintomatologia compatível para candidíase oral, portadores ou não de prótese dentária parcial ou total removível, mediante a concordância e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Com o objetivo de comparação, a coleta da saliva da cavidade oral foi realizada em pacientes que não utilizam prótese dentária removível em oposição aos que utilizam prótese, para assim identificar se a prótese dentária é um fator que favorece a colonização por *Candida* na cavidade oral e obter as espécies e a frequência de *Candida* na cavidade bucal desses pacientes.

Outros fatores como gênero, idade, higiene da prótese dentária, gravidez, uso de contraceptivos orais, uso de medicamentos, antibióticos e situações de imunossupressão e fatores relacionados ao uso de prótese dentária, foram analisados em associação a presença de *Candida* na cavidade oral.

Distrito/Nome Unidade	Rua	Bairro
Distrito: 01 - Leste		
UBS Dra. Luiza do Carmo Ribeiro Fernandes	Av. Ministro João Gonçalves S/N	Distrito Industrial
UBS Dr. Gilson Moreira	Rua Dr. Pegoraro S/N	Zumbi dos Palmares I
Distrito: 02 - Norte		
UBSPA Arthur Virgilio Filho	Travessa 10 3045 Com Amadeu Bote	Cidade Nova V
UBSPA Frei Valério de Carlo	Rua Bom Jesus S/N	Novo Israel
Distrito: 03 – Oeste		
UBS do Bairro da Paz	Avenida Esperança, 51	Bairro da Paz
UBS Dr. Rayol dos Santos	Rua 18 de Setembro S/N	São Jorge
Distrito: 04 – Sul		
UBS Morro da Liberdade	Rua São Benedito S/N	Morro da Liberdade
UBS Lúcio Flávio V. Dias	Rua Comandante Ferraz, 15	Betânia
UBS Frank Calderon	Rua Boa Esperança S/N Aterro do Quare	Crespo
UBS Lourenço Borghi	Travessa S6 S/N	Japiimlândia

Quadro 1. Unidades Básicas de Saúde da SEMSA sorteadas para coleta de amostra.

Fonte: o autor

4.2.4 Critérios de Exclusão:

Foram excluídos da pesquisa os pacientes que estivessem fazendo uso de antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos.

4.3 Aplicação do questionário, exame do paciente e coleta do material clínico

As amostras de mucosa oral foram coletadas pela pesquisadora nas unidades de saúde selecionadas do município. Um questionário com perguntas básicas sobre o quadro de saúde e história odontológica dos pacientes foi preenchido (Anexo IV). Foi realizado exame clínico no paciente na cadeira odontológica, com espelho bucal observando o quadro de saúde bucal: cárie, gengivite, periodontite, presença ou ausência de lesão branca ou eritematosa na boca, característico de candidíase (Figura 8).

Para registrar o grau de higiene oral dos pacientes examinados, foram adotados três escores: boa (tecido gengival saudável), regular (com gengivite e/ou cálculo dental) e ruim (com periodontite em consequência de inflamação gengival) (GENCO; et. al, 1997; LINDHE et. al, 1999).

Nos pacientes que não utilizavam prótese dentária as amostras da mucosa bucal (gengiva, palato duro, bochechas, dorso da língua) do paciente foram coletadas por meio de duas zaragatoas (*swab*) estéreis, uma para fazer o exame direto, preparando-se um esfregaço para ser corado pelo Gram e a outra foi armazenada em tubo de ensaio contendo 2 mL de solução salina (0,9% NaCl) e foi destinada à semeadura em meio de cultivo até 24 horas após a coleta.

Nos pacientes que utilizavam prótese dentária as amostras foram coletadas por meio de três zaragatoas, duas foram utilizadas para realizar coleta da superfície interna da prótese (palatal) uma para fazer o exame direto, preparando-se um esfregaço para ser corado pelo Gram e a outra foi utilizada para armazenado em tubo de ensaio contendo 2 mL de solução salina (0,9% NaCl) e foi destinada à semeadura em meio de cultivo até 24 horas após a coleta. A terceira zaragatoa foi utilizada para coletar amostra do palato do paciente (superfície que fica em contato com a superfície interna da prótese) e armazenada em tubo de ensaio contendo 2 mL de solução salina (0,9% NaCl) e foi destinada à semeadura em meio de cultivo até 24 horas após a coleta (Figura 5).

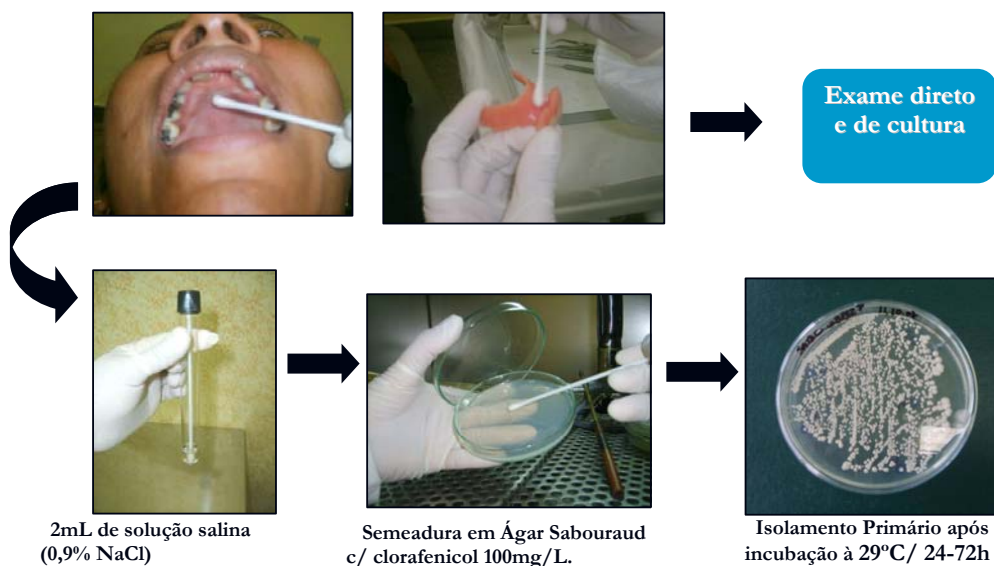


Figura 5. Técnica de coleta do material clínico e de sementeira.
Fonte: o autor

4.4 Processamento das Amostras:

O processamento das amostras e todos os estudos subsequentes foram realizados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em Manaus – Amazonas.

A fase laboratorial foi realizada obedecendo às normas de biossegurança laboratorial.

4.4.1 Exame direto e isolamentos primários das leveduras:

A sementeira do material biológico foi realizada em estria na superfície do meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (100 mg/L) (PAIXÃO, SIDRIM, 1999). Os cultivos foram mantidos à 29°C, por 72 horas (anexo VI). Após este período foram selecionadas 3 ou mais colônias de cada placa e sementeira em uma nova placa contendo meio ágar Sabouraud e observada a morfologia e pureza das colônias (Figura 6).



Figura 6. Exemplo de análise morfológica das colônias em placas de petri contendo Ágar Sabouraud.
Fonte: o autor

Para determinação da presença de leveduras puras (ausência de bactérias e fungos filamentosos) foram feitas lâminas dos fragmentos da cultura e as células coradas com uma gota de azul de lactofenol, as quais foram avaliadas no microscópio. Após confirmação, os microrganismos foram repicados para tubos com Ágar Sabouraud inclinado.

4.4.2 Identificação das Espécies

Para a identificação das espécies de *Candida* foram utilizadas duas metodologias: testes bioquímicos, sendo usado o kit de identificação Candifast® (International Microbio), e o morfológico, em Ágar Fubá com Tween 80 (microcultivo). Os testes para diferenciar espécies de *C. albicans* e de *C. dubliniensis* foram feitos por biologia molecular, sendo utilizado o Kit de Biologia Molecular que esta em processo de patenteamento, desenvolvido pelo grupo coordenado pela Dra. Adriana Sotero Martins da FIOCRUZ.

4.4.2.1 Identificação bioquímica - Kit Candifast®

O Kit Candifast® possui galerias contendo açúcares e antifúngicos, permitindo a identificação bioquímica baseada na fermentação ou não de sete açúcares, constatado pela

mudança de cor do meio devido à sua acidificação ou alcalinização (para espécies com atividade urease positiva), e também um indicativo relacionado à resistência a antifúngicos. Porém o Kit se restringe à identificação de 8 leveduras: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Saccharomyces*, citadas como as principais encontradas em amostras clínicas, e possui grau de sensibilidade e confiança em torno de 98,5%. Foi feito o acompanhamento da leitura das galerias após 24, 48 e até 72 horas de cultivo (Figura 7).

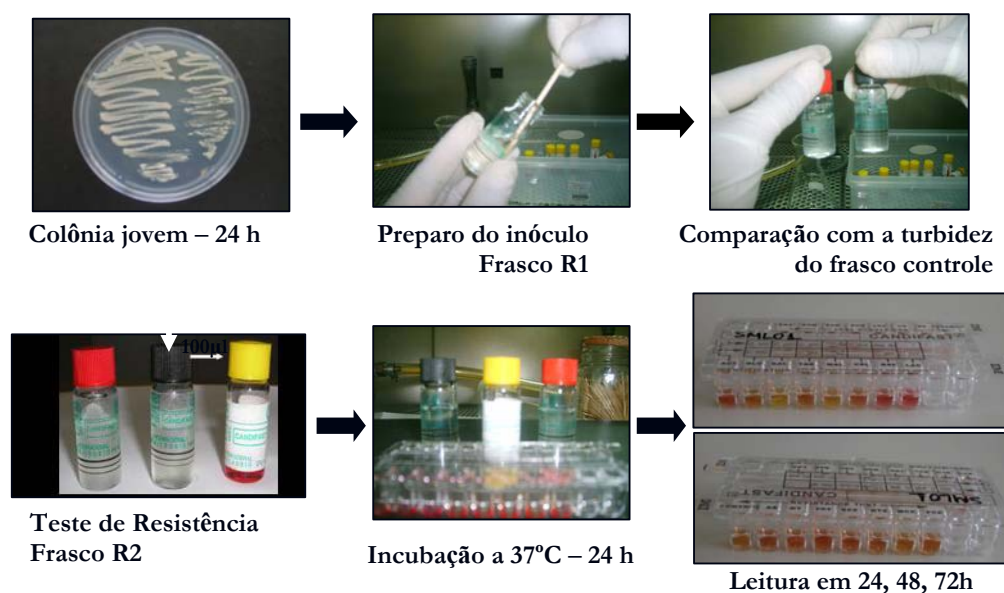


Figura 7. Identificação Bioquímica no Kit Candifast®.
Fonte: o autor

4.4.2.2 Prova do Microcultivo

A prova do microcultivo possibilita o estudo micromorfológico das leveduras em meio Ágar Fubá com Tween 80 (Anexo VI). Foram colocadas duas lâminas de microscopia uma sobre a outra, com disposição em cruz, em placa de Petri contendo chumaço de algodão e duas lamínulas. Foi feita esterilização em autoclave por 30 min. Com auxílio de uma pipeta 1 a 2 mL de meio de cultura liquefeito foi colocado em cima de uma das lâminas. Após a solidificação do meio de cultura foi inoculada em estria a levedura a ser estudada. Uma parte

da estria foi coberta com uma das lamínulas, deixando a outra parte em aerobiose. Com a pipeta foi adicionada água destilada esterilizada ao chumaço de algodão com o objetivo de manter a umidade. O microcultivo foi incubado a 30°C durante 3 dias. Para a visualização das estruturas ao microscópio, as leveduras foram coradas com uma gota de azul de lactofenol e a parte da estria descoberta foi coberta com uma lamínula (TEIXEIRA et al, 1992) (Figura 8).

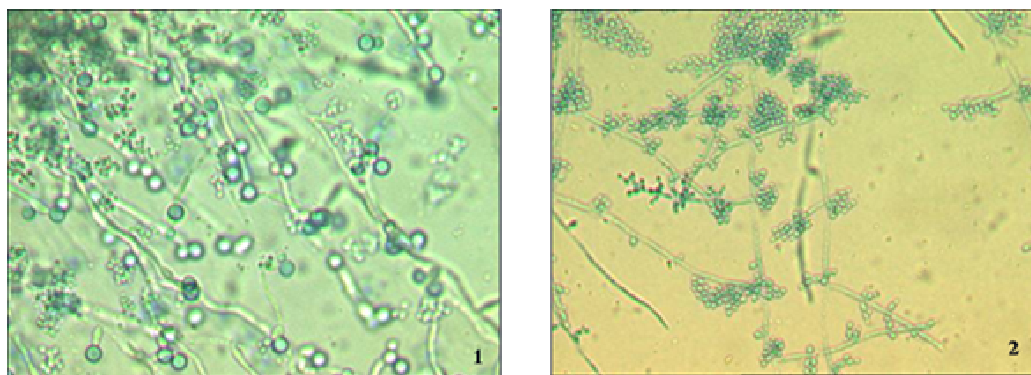


Figura 8. Microscopia óptica de microcultivos de culturas semeadas em lâminas contendo Ágar Fubá com Tween 80, coradas com uma gota de azul de lactofenol. *C. albicans* (200X). Visualização de estruturas características de *C. albicans* neste tipo de teste: clamidosporos (1); pseudohifas (2).
Fonte: o autor

4.4.3 Identificação Molecular

A identificação molecular foi utilizada para confirmar isolados de *Candida albicans* e identificar cepas de *C. dubliniensis* que foram previamente identificadas por meio do kit Candifast® (International Microbio) como *C. albicans*, e confirmadas pela análise das lâminas resultante do teste morfológico, em Ágar Fubá com Tween 80 (microcultivo), onde se pôde observar a presença de clamidosporos, que são estruturas características de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A presença de abundantes clamidosporos pode sugerir *C. dubliniensis* conforme dados da literatura (SULLIVAN et al., 2005; STAIB; MORSCHHAUSER, 2006; KHLIF et al.,

2009). Portanto, todas as cepas com esta característica seguiram para a identificação molecular.

Para a confirmação molecular dos isolados de *C. albicans* e identificação de *C. dubliniensis* foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos espécie-específicos, um para *C. albicans* e outro para *C. dubliniensis*, conforme protocolo desenvolvido na dissertação de mestrado de Oliveira (2007). A técnica utilizada foi a PCR.

4.4.3.1 Seleção das amostras

Foram selecionados, para identificação molecular, 141 isolados de *C. albicans*, que apresentavam abundantes clamidósporos (Quadro 2).

Espécie	Número de registro das amostras de <i>C. albicans</i>
<i>Candida albicans</i> n = 141	NAV 01, NAV03, NAV09-1, NAV12-1, NAV12-2, NAV12P-1, NAV19, NAV19P-3, NAV23-3, NAV42-1, NAV44P-1, NAV44P-2, NAV49-2, NAV56, NAV61P-3, NAV62-3, NAV70P-2, OBP21-2, OBP21-5, OBP23-2, OBP23-4, OBP23-5, OBP26-1, LLC04, LLC08, LLC12-2, LLC17-3, LLC20-3, LLC25-1, LLC25-2, LLC25-3, LLC25P-2, LLC34P-1, LLC34P-6, LLC37-1, LLC39-2, LLC48P-1, LLC56-1, LLC56-2, SML15P-1, SML15P-2, SML15P-6, SML21-4, SML25-1, SML44-2, SML45-3, SML51P, SML51-2, SFC01-1, SFC01P-1, SFC01P-3, SFC11-3, SFC14-1, SFC19-2, SFC20-2, SFC21-3, SFC55P-2, SFC60-3, NFV15-1, NFV15-2, NFV24-1, NFV24-2, NFV24-3, NFV25-1, NFV25-2, NFV25P-1, NFV25P-2, NFV30-1, NFV34P-4, NFV39-1, NFV39P-2, NFV41P-1, NFV60-1, NFV60P-1, NFV60P-3, NFV60-3, NFV63P-1, NFV63P-2, NFV64-3, ORS14-2, ORS14P-3, ORS22P-2, ORS22P-3, ORS25P-1, ORS37, ORS49P-1, ORS49P-2, ORS52-1, ORS53-1, ORS57-1, ORS57-2, ORS57-3, ORS57P-1, ORS57P-2, ORS64-1, ORS64P-3, LGM02-1, LGM08-1, LGM08-2, LGM10-2, LGM11P-2, LGM11P-3, LGM25-2, LGM25P-1, LGM25P-2, LGM28-1, LGM28-2, LGM28P-2, LGM41-1, LGM41-3, LGM50-2, SLB13-2, SLB17P-1, SLB17P-2, SLB17P-3, SLB21-2, SLB21P-2, SLB37P, SLB46, SLB60P-3, SLB61-1, SLB61-2, SLB61-3, SLB61P-1, SLB61P-2, SLB61P-3, SLF05-2, SLF05P-2, SLF05P-3, SLF08-1, SLF08-2, SLF08P-1, SLF09-1, SLF09-2, SLF11-1, SLF11-2, SLF14-2, SLF18-1, SLF28-1, SLF28-3, SLF34-3.

Quadro 2. Amostras de *C. albicans* utilizadas para identificação molecular.

Fonte: o autor

As letras em maiúscula correspondem à zona e as iniciais do nome das Unidades de Saúde de onde foram coletadas as amostras: NAV – Norte/Arthur Virgílio; OBP – Oeste/Bairro da Paz; LLC – Leste/Luiza do Carmo; SML – Sul/Morro da Liberdade; SFC – Sul/Frank Calderon; NFV – Norte/Frei Valério; ORS – Oeste/Rayol dos Santos; LGM – Leste/Gilson Moreira; SLB – Sul/Lourenço Borghi; SLF – Sul/Lúcio Flávio. Os números correspondem aos pacientes e a letra P significa prótese.

4.4.3.2 Extração do DNA Genômico

Para a extração do DNA total cromossomal, as leveduras foram cultivadas em 15 mL no meio líquido YPD (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona), incubada a 29°C, com agitação de 160 rpm, durante 16 horas (anexo VI). Após esse período, as células foram centrifugadas com velocidade 4000 rpm por 5 minutos a 25 °C. A biomassa celular adquirida foi utilizada para extração de DNA total, com fenol saturado, segundo metodologia, descrita por Sambrook et al. (1989) (AUSUBEL et al., 1994).

Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1 mL de água destilada estéril. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições e desprezou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de lise (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0). Adicionou-se à suspensão, 0,3 gramas de pérolas de vidro Pérolas de Vidro 212-300 µm (Sigma – Aldrich), previamente tratadas com HCl, e 200 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) (Anexo VII).

A mistura foi agitada mecanicamente em agitador por 3 minutos, em seguida foi aquecida por 15 minutos à 75/90°C. Foi adicionado 200 µL de solução TE (Tris-HCl 1M pH7,8; EDTA 0,5M pH 8,0) às amostras e agitou-se brevemente (anexo VII). O tubo foi centrifugado a 25°C com velocidade de 10.000 rpm por 5 minutos e a fase aquosa transferida para um tubo novo. Adicionou-se 1 mL de etanol absoluto (-20°C), homogeneizou-se a mistura e o tubo foi centrifugado a 25°C com velocidade de 10.000 rpm por 3 minutos (Anexo VIII).

Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e a seguir centrifugado nas mesmas condições anteriores. Descartou-se o sobrenadante, esperou-se que o precipitado ficasse seco para então adicionar 400 µL de solução TE. A mistura foi completamente dissolvida e a seguir adicionada 3 µL de uma solução de RNase A 10 mg/mL. O tubo foi incubado a 37°C por 5 minutos. Adicionou-se 10 µL de acetato de amônio 4 M e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C). A mistura foi homogeneizada manualmente e

centrifugada a 25°C com velocidade de 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70%, repetindo-se a centrifugação nas mesmas condições. Descartou-se o sobrenadante e esperou-se que o precipitado fosse seco para então ressuspendê-lo em 50 µL de água deionizada estéril e estocado à -20°C.

4.4.3.2 Pureza e quantificação das amostras de DNA

As concentrações e purezas de DNA foram estimadas através de análise espectrofotométrica em comprimento de onda ultravioleta ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$), como preconizado por Sambrook et al. (1989). A leitura espectrofotométrica em 260nm foi usada para determinar a concentração de DNA (1OD = 50µg de DNA dupla fita/µL), enquanto a razão entre as absorvâncias de 260nm e 280nm foi usada para avaliar a pureza do ácido nucléico.

Foram utilizadas extrações de DNA que apresentaram grau de pureza igual ou maior a 1,6 e igual ou menor a 1,8 de densidade óptica (D.O.) (SAMBROOK et al., 1989).

4.4.3.3 Identificação molecular com uso de oligonucleotídeos espécie-específicos

Amostras identificadas preliminarmente como *C. albicans* na análise bioquímica de assimilação de carboidratos realizada por meio do kit Candifast® (International Microbio) e microcultivo, sugestivas para *C. dubliniensis*, foram testadas por biologia molecular. Para identificação molecular das amostras de *C. albicans* foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos espécie-específicos de *C. albicans* e para *C. dubliniensis*. A Tabela 2 destaca algumas informações dos pares de oligonucleotídeos utilizados, cada par é específico para identificação à nível de espécie de *Candida* (OLIVEIRA, 2007).

Espécie	Oligonucleotídeos	Comprimento	Tm	Amplicom
<i>C. albicans</i>	<i>CaF</i>	20pb	52°C	~335pb
	<i>CaR</i>	19pb	52°C	
<i>C. dubliniensis</i>	<i>CdF</i>	21pb	54°C	~427pb
	<i>CdR</i>	20pb	54°C	

Tabela 2. Algumas propriedades dos oligonucleotídeos espécie-específicos para *C. albicans* e *C. dubliniensis*.
Fonte: OLIVEIRA, 2007 e Pedido de Patente em formulação por SOTERO-MARTINS et al.

O método utilizado para amplificação dos amplicons espécie-específicos foi o da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Foi feito PCR de cada amostra de *Candida albicans* tanto com oligonucleotídeos espécie-específico para *C. albicans* como para oligonucleotídeos espécie-específico de *C. dubliniensis*.

4.4.3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram realizadas em microtubos com capacidade para 200µL; o volume da reação foi de 20µL. As concentrações dos reagentes utilizados foram: tampão 1X; dNTP mix 0,18mM; MgCl₂ 1,5mM; “iniciador senso” (*CaF*, *CdF*) 10pmoles; “iniciador anti-senso” (*CaR*, *CdR*) 10pmoles; Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 1,5U; 2µL de amostra de DNA genômico. As condições de termociclagem foram: um ciclo de 94°C por 4 min; 30 ciclos, cada, de 94°C por 30 s, 52°C (*C.albicans*) e 54 °C (*C. dubliniensis*) por 30 s e 72°C por um minuto; um ciclo de 72°C por 10min; e 4°C ∞ (OLIVEIRA, 2007).

Após a termociclagem, as amostras de PCR foram aplicadas em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídeo 0,5µg/mL, e submetidas a voltagem de 4,0V/cm por aproximadamente 1 hora (SAMBROOK et al., 1989). O gel foi visualizado em um transiluminador com luz UVA, UVB e UVC (260nm, 270nm e 280nm, respectivamente). A imagem foi analisada comparando com o padrão de bandas definido para cada espécie, para

C. albicans o amplicon possui ~335pb e para *C. dubliniensis* ~427pb, de acordo com Oliveira (2007). O quadro 3 descreve em detalhes as concentrações dos reagentes empregados e seus respectivos volumes reacionais. As condições de termociclagem seguiram a programação descrita no quadro 4.

Reagente [] do estoque	[] final do tubo da reação	Volume do tubo da reação (μL)
Tampão PCR 10X	1X	2μL
dNTP mix 10mM	0.1mM	0,2μL
MgCl ₂ 50mM	1,5mM	0,6μL
Iniciador senso* 20μM	10 pmoles	0,5μL
Iniciador anti-senso** 20μM	10 pmoles	0,5μL
Taq DNA Pol. 5U/μL	1,5 U	0,3μL
DNA template	~	2μL
	H ₂ O (q.s.p.)	13,8μL
	TOTAL	20μL

Quadro 3. Concentrações e respectivos volumes usados na PCR dos *primers* de oligonucleotídeos espécie-específicos. [] = concentração.

Fonte: OLIVEIRA, 2007 (dados ainda não publicados)

* *CaF*, ou *CdF*

** *CaR*, ou *CdR*

Ciclos	Temperatura °C	Tempo	Repetições
Desnaturação inicial	94°C	4 min	1x
Desnaturação	94°C	30 s	30x
Anelamento	* ou **	30 s	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	10 min	1x
	4°C	∞	-

Quadro 4. Condições de termociclagem para a amplificação de fragmentos gerados pelos *primers* de oligonucleotídeos espécie-específicos.

Fonte: OLIVEIRA, 2007 (dados ainda não publicados)

* 52°C para *C.albicans*

** 54°C para *C.dubliniensis*.

4.5 Preservação das leveduras em Coleção Biológica

As amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* com identificação molecular e bioquímica estão preservadas na Coleção Biológica do ILMD/FIOCRUZ em glicerol 40% à -70°C, em gelose e liofilizadas, bem como amostras das demais *Candida* não-*albicans*.

4.6 Análise Estatística

A análise dos resultados foi realizada através de medidas de frequências para os dados categorizados, apresentados por meio de tabelas e gráficos. Na análise das variáveis quantitativas calculou-se a média e o desvio-padrão (DP). Para prevalência de *Candida* spp. calculou-se além da frequência pontual o intervalo de confiança ao nível de 95% (IC95%). Na comparação dos dados categóricos, utilizou-se o teste do qui-quadrado de *Pearson*. Na impossibilidade da aplicação do teste de *Pearson*, utilizou-se o teste com correção de *Yates* ou o teste exato de *Fisher* (VIEIRA, 2004). Na comparação das médias, foi utilizado o teste t de *Student*, sendo que o nível de significância fixado para os testes foi de 5% (ARANGO, 2001). Na análise dos dados foi utilizado o *software* Epi-Info versão 3.5 para *Windows* desenvolvido e distribuído pelo *Centers for Disease Control e Prevention* - CDC (www.cdc.gov/epiinfo) (EPI-INFO, 1997; ARANGO, 2001; PAGANO et al., 2004; VIEIRA, 2004; LUIZ et al., 2005).

Artigo 1

**Espécies de *Candida* prevalentes na cavidade oral de pacientes com e sem
prótese dentária atendidos em Unidades Básicas de Saúde na cidade de
Manaus/AM-Brasil**

Shirley Araújo-Passos¹; Renata Gualberto²; Adriana Sotero Martins³; Ani Jackisch-Matsuura⁴

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia – UFAM/UFPA/Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia.

² Aluna de PIBIC do Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ;

³ Orientadora no Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia – UFAM/UFPA/ILMD-FIOCRUZ-Amazônia e Pesquisadora da ENSP/FIOCRUZ-Rio de Janeiro.

⁴ Co-orientadora no Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia – UFAM/UFPA/ILMD-FIOCRUZ-Amazônia e Pesquisadora do Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia.

Espécies de *Candida* prevalentes na cavidade oral de pacientes com e sem prótese dentária atendidos em Unidades Básicas de Saúde na cidade de Manaus/AM-Brasil

Resumo

Espécies de *Candida* tem ocorrido na cavidade oral de indivíduos sadios com frequência, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente. O objetivo deste estudo foi determinar as espécies de *Candida* presentes na cavidade oral de pacientes com e sem prótese dentária atendidos em 10 Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus- AM e correlacionar com a estomatite protética. As amostras de *Candida* foram coletadas da mucosa oral por meio de uma zaragatoa (swab), fazendo-se exame direto (método de Gram) e semeadura em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud com cloranfenicol. As placas foram incubadas à 29°C num período de 24-72 horas. Nas culturas positivas para leveduras foram feitos a identificação bioquímica realizada por meio do Kit Candifast® (International Microbio) e estudo morfológico realizado em Ágar Fubá com Tween 80 (microcultivo). Os dados foram armazenados e analisados no programa Epi-Info versões 3.5. De 594 pacientes, 436 do gênero feminino e 158 do gênero masculino de 10 UBS-SEMSA, com média de idade de $32,5 \pm 11,6$. Culturas positivas para *Candida* foram observadas em 50% dos pacientes. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente, seguida pela *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. glabrata*. Fatores como gênero, idade, tratamento médico, uso de medicamentos e uso de prótese dentária foram diretamente associados com a presença de *Candida* na cavidade oral.

Palavras-chave: *Candida*; cavidade oral; candidíase; prótese dentária; prevalência.

Prevalence of *Candida* species in oral cavity of patients with and without denture from Basic Unit of Health in Manaus city, Amazon State, Brazil

Abstract

Candida species are frequent in oral cavity of healthy individual and *C. albicans* is the most prevalent species. This work presents a study of the prevalence of different species of *Candida* in patients from ten Basic Unit of Health (UBS)/SEMSA in Manaus city (Amazon state, Brazil) that use denture or not to correlate with prothetic stomatite. The samples of *Candida* were collected from oral mucosa with swab, were cultured in Petri dishes containing Sabouraud Dextrose Agar with chloramphenicol and direct analysis (Gram method). The dishes were incubated at 29°C for 24-72 hours. The yeasts were submitted to biochemical identification with Candifast[®] (International Microbio) and morphological study on Corn Meal Tween 80 Agar. The data were analyzed by Epi-Info software, version 3.5. In the total 594 patients taken, 436 were women and 158 were men of ten UBS-SEMSA, with the average age of 32.5 ±11.6 years old. *Candida* species occurred in 50% of patients. *C. albicans* is the most prevalent species, followed by *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. glabrata*. Factors like gender, age, medical treatment, use of medication and use of dentures were directly associated with the presence of *Candida* in oral cavity.

Key-words: *Candida*; oral cavity; candidosis; denture; prevalence.

Introdução

A candidíase oral é uma doença infecciosa causada geralmente por *Candida albicans*, no entanto, outras espécies podem estar envolvidas, tais como *Candida tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* e *C. dubliniensis*. A levedura *Candida* é um habitante comum da cavidade bucal, trato gastrointestinal e da vagina de pessoas saudáveis, porém para causar a doença é preciso ocorrer a penetração do microrganismo nos tecidos, o qual depende de fatores ligados ao hospedeiro (locais e gerais, mecânicos, nutricionais, fisiológicos, sistêmicos e iatrogênicos) e ao microrganismo (patogenicidade) (SHAFER, 1987; SIDRIM; ROCHA, 2004; LORENZO, 2004; NEVILLE et al., 2004).

A presença da levedura *Candida* na boca não é suficiente para produzir clinicamente a doença. Vários fatores podem favorecer predisposição da candidíase oral que podem ser classificados como fatores intrínsecos: neoplasias, diabetes, hemopatias diversas, síndrome da imunodeficiência humana e todas as doenças que alteram a imunidade celular, velhice, gravidez, prematuridade, entre outros; e fatores extrínsecos, como antibioticoterapia, quimioterapia, radioterapia, antitumorais, cirurgia de transplantes e ambientes hospitalares contaminados (GASPARETTO et al., 2005). Além desses, devem ser considerados os fatores locais como, a colonização prévia da mucosa por microrganismos com potencial de virulência e a sua capacidade de aderência às células do hospedeiro, uso de próteses dentárias e higiene oral do indivíduo (DORKO et al., 2001; GASPARETTO et al., 2005; DAGISTAN et al., 2008).

A estomatite protética é uma lesão caracterizada por vários graus de eritema localizados na mucosa, estando esta em contato direto com as bordas de uma prótese superior removível e é classificada de acordo com a aparência clínica da mucosa inflamada, a qual compreende três tipos clínicos: estomatite protética tipo I, II e III (NEWTON, 1962 *apud*

NEVILLE et al., 2004). A presença de *Candida* no biofilme da prótese dentária, associada a má higiene oral e da prótese pode determinar o desenvolvimento da estomatite protética. O diagnóstico definitivo é dado pelo somatório de sinais e sintomas clínicos e de exames micológicos como exame direto e de cultura (LEMOS et al., 2003).

As pesquisas atuais têm mostrado que o número de espécies de *Candida* de importância médica tem crescido (MATSUMOTO et al., 2001; COLOMBO et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004). A candidíase orofaríngea, comum em pacientes imunodeprimidos, é normalmente precedida de colonização das superfícies mucosas orais e a candidíase sistêmica, que está relacionada a altos índices de mortalidade, pode ocorrer devido à prévia colonização da cavidade oral ou da orofaringe por cepas de alta resistência, por isso, a análise das espécies e frequência de *Candida* na cavidade oral é de fundamental importância (FARIAS et al., 2003).

Para compreender o prognóstico, a epidemiologia e a terapêutica do gênero *Candida* é essencial identificar corretamente as diferentes espécies etiológicas. Para cidade de Manaus- Amazonas não existem dados sobre a prevalência de espécies de *Candida* na cavidade oral da população. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência das espécies de *Candida* na cavidade oral de pacientes usuários ou não de prótese dentária atendidos em Unidades Básicas de Saúde da SEMSA (Secretaria Municipal de Saúde) na cidade de Manaus- AM e correlacionar com a estomatite protética.

Material e Métodos

Este é um estudo transversal com coleta de amostras de saliva da mucosa da cavidade oral. Foram realizadas coletas de 594 pacientes de 10 UBS-SEMSA na cidade de Manaus- AM, pela autora, por um período de 4 meses, no ano de 2008, sob anuência da Secretaria de Saúde do Município – SEMSA e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/UFAM com

CAAE nº.0057.0.115.115-07. Para cada pessoa participante do estudo foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aplicado um questionário com questões sobre o histórico médico e odontológico da pessoa. Foram incluídas, no estudo, as pessoas com dentição natural e usuários de prótese dentária, sintomáticos e assintomáticos para candidíase, maiores de 18 anos, do sexo masculino e feminino, atendidos nestas unidades.

Foi realizado um exame clínico no paciente na cadeira odontológica, com espelho bucal observando o quadro de saúde bucal: cárie, gengivite, periodontite e se o paciente possuía alguma lesão branca ou eritematosa na boca, característico de candidíase. Foram excluídos da pesquisa os pacientes que estavam fazendo uso de antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos. Todo o material utilizado na coleta de saliva e exame de paciente foi descartável, esterilizado e seguro, obedecendo às normas da vigilância sanitária e de biossegurança.

Foram realizados os exames micológicos (exame do material biológico a fresco e cultivo) de amostras da mucosa oral obtidas dos pacientes. As amostras foram coletadas por meio de uma zaragatoa (*swab*) estéril. Um *swab* foi utilizado para fazer o exame direto, preparando-se um esfregaço para ser corado pelo método de Gram e, o outro foi armazenado em tubo de ensaio contendo 2 mL de solução salina (0,9% NaCl) e foi destinado à semeadura em meio de cultivo até 24 horas após a coleta (NEUFELD, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004). A semeadura do material biológico foi realizada em estria na superfície do meio Ágar Sabouraud com cloranfenicol (100 mg/L) (SIDRIM; ROCHA, 2004). Os cultivos foram mantidos à 29°C, por 72 horas. Após este período foram isoladas três colônias ou mais de cada placa e semeadas em uma nova placa contendo ágar Sabouraud e observado a morfologia e pureza das colônias. Para a identificação das espécies de *Candida* foram utilizadas duas metodologias: bioquímico, sendo usado o kit de identificação Candifast® (International Microbio), e o morfológico, em ágar Fubá com Tween 80 (microcultivo).

O cálculo da amostra foi baseado na estimativa de 45.316 pacientes maiores de 18 anos que foram atendidos de agosto a dezembro de 2006, período correspondente a realização da coleta em 2007/2008, nas Unidades Básicas de Saúde – SEMSA na cidade de Manaus, com prevalência de *Candida* esperada de 50% de acordo com Santos et al. (2002) (prevalência de 51,5%), o erro amostral estipulado foi 4% e confiança 95% (significância de 5%), totalizando 592 pacientes, utilizado o *software* Epi-Info versão 3.5. (WAYNE, 1987; EPI-INFO, 1997).

A análise dos resultados foi realizada através de medidas de freqüências para os dados categorizados. Na análise das variáveis quantitativas calculou-se a média e o desvio-padrão (DP). Para prevalência de *Candida* calculou-se além da freqüência pontual o intervalo de confiança ao nível de 95% (IC 95%). Na comparação dos dados categóricos, utilizou-se o teste do qui-quadrado de *Pearson*, *Pearson* com correção de *Yates* ou o teste exato de *Fisher* (VIEIRA, 2004). Na comparação das médias, foi utilizado o teste t de *Student*, com nível de significância fixado para os testes de 5% (ARANGO, 2001). Os dados foram armazenados e analisados utilizando o *software* Epi-Info versão 3.5. para *Windows* desenvolvido e distribuído pelo CDC (EPI-INFO, 1997; ARANGO, 2001; PAGANO et al., 2004; VIEIRA, 2004; LUIZ et al., 2005).

Resultados

Foram realizadas coletas de saliva da mucosa oral de 594 pacientes, 436 do gênero feminino e 158 do gênero masculino de 10 UBS-SEMSA, com média de idade de $32,5 \pm 11,6$. A maioria é de cor parda (84,2%), nascidos no Estado do Amazonas (77,1%), com predominância de solteiros (46%). Do total de mulheres, 26 (6,0%) estavam grávidas e 82 (18,5%) estavam usando anticoncepcional oral ou injetável. Houve diferença estatística

significante nas variáveis gênero e idade quando relacionados com a presença de *Candida* na cavidade oral desses pacientes, com p-valor = 0,016 e 0,001, respectivamente (Tabela 1).

Variáveis (n = 594)	<i>Candida spp.</i>				Total	p*
	Sim		Não			
	f _i	%	f _i	%		
Sexo						<i>0,016</i>
Masculino	66	41,8	92	58,2	158	
Feminino	231	53,0	205	47,0	436	
Idade (anos)						<i><0,001**</i>
Média ± DP	34,3 ± 12,6		30,1 ± 10,2			
Amplitude	18 – 71		18 – 73			
Cor da pele						0,363
Branca	36	58,1	26	41,9	62	
Parda	244	48,8	256	51,2	500	
Negra	17	53,1	29	46,9	32	
Estado civil (n = 587)						***
Solteiro	126	46,7	144	53,3	270	
Casado	107	51,0	103	49,0	210	
Comunhão estável	47	55,3	38	44,7	85	
Divorciado	8	53,3	7	46,7	15	
Viúvo	7	100,0	0	0,0	7	

Tabela 1. Presença de *Candida* em relação aos dados Sócio-Demográficos dos pacientes participantes da pesquisa atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus – AM.

* Qui-quadrado de *Pearson*; ** Teste t de *Student*.

*** Não foi possível aplicar o qui-quadrado devido as restrições do teste (VIEIRA, 2004).

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

Quanto ao uso de medicamentos, 133 (22,4%) afirmaram utilizar algum tipo de medicamento, desses 91 (68,4%) estavam usando antibióticos e em 77 (57,9%) houve presença de *Candida* em exames laboratoriais, havendo diferença estatisticamente significativa (p-valor = 0,039). Quanto a tratamento médico, 111 (18,7%) estavam recebendo algum tipo de tratamento médico, desses houve crescimento de leveduras em 69 (62,2%), apresentando

diferença estatística significativa, (p-valor = 0,004). Todos os pacientes que estavam usando antifúngicos foram excluídos da pesquisa (Tabela 2).

Quando foi questionado ao paciente sobre algum tipo de imunossupressão, 47 (15,8%) afirmaram possuir alguma, entre elas, quimioterapia, transplante, câncer, diabetes, lúpus, uso de corticóides e outros. Do total de pacientes, 127 (21,4%) afirmaram ingerir bebida alcoólica e 18 (3%) relataram que apenas às vezes ingerem bebida alcoólica. Quanto ao tabagismo, 78 (13,1%) afirmaram ser tabagistas. Em relação a DST, somente 6 (1,1%) afirmaram que tinham algum tipo de DST. Quando questionados se já haviam tido algum tipo de candidíase 334 (56,2%) afirmaram que sim. Não foi encontrada associação estatística significativa ao nível de 5% das variáveis citadas quando relacionadas com a presença de *Candida* na cavidade oral (Tabela 2).

Quanto ao histórico odontológico, somente 31 (5,2%) referiram ter sensação de ardência na boca e apenas 47 (7,9%) afirmaram sentir a boca seca. Quanto à frequência de ida ao dentista 242 (40,7%) freqüentavam 1 vez ao ano. Quando o paciente foi questionado sobre a frequência de escovação dos dentes, a maioria, 326 (54,9%) afirmou escovar três vezes ao dia. Entre as variáveis citadas em relação ao histórico odontológico não foi encontrada associação estatística significativa ao nível de 5% quando relacionadas com a presença de *Candida* na cavidade oral (Tabela 3).

No exame oral foi verificado que do total de pacientes atendidos, 52 (8,8%) apresentavam periodontite, 458 (77,6%) possuíam lesões de cárie e 56 (9,4%) tinham lesões características de candidíase oral, dessas apenas três (1 pseudomembranosa e 2 queilite angular) estavam presentes em pacientes não usuários de prótese dentária. Foram encontrados 350 (58,9%) com higiene oral regular, porém não foi possível aplicar o qui-quadrado na variável higiene oral em relação a presença de *Candida*, devido as restrições do teste (VIEIRA, 2004) (Tabela 3).

Variáveis (n = 594)	<i>Candida</i> spp.				Total	p*
	Sim		Não			
	f _i	%	f _i	%		
Uso de antibióticos						0,139
Sim	52	57,1	39	42,9	91	
Não	245	48,7	258	51,3	503	
Imunossupressão						0,648
Sim	25	53,2	22	46,8	47	
Não	272	49,7	275	50,3	547	
Tratamento Médico						0,004
Sim	69	62,2	42	37,8	111	
Não	228	47,2	255	52,8	483	
Tomando algum medicamento						0,039
Sim	77	57,9	56	42,1	133	
Não	220	47,7	241	52,3	461	
Aumento/Diminuição de peso						0,622
Sim	151	49,0	157	51,0	308	
Não	146	51,0	140	49,0	286	
Fumante						0,089
Sim	46	59,0	32	41,0	78	
Não	251	48,6	265	51,4	516	
Ingere bebida alcoólica						0,881
Sim	66	52,0	61	48,0	127	
Não	222	49,4	227	50,6	449	
As vezes	9	50,0	9	50,0	18	
Portador de DST (n = 568)						0,397**
Sim	4	66,7	2	33,3	6	
Não	277	49,3	285	50,7	562	
Teve candidíase oral/vaginal						***
Sim	177	53,0	157	47,0	334	
Não	118	46,3	137	53,7	255	
Não sabe	2	40,0	3	60,0	5	

Tabela 2. Presença de *Candida* em relação aos dados da História Médica relatada pelos pacientes participantes da pesquisa, atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus – AM.

* Qui-quadrado de *Pearson*; ** Teste do qui-quadrado com correção de *Yates*.

*** Não foi possível aplicar o qui-quadrado devido as restrições do teste (VIEIRA, 2004).

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatisticamente significante ao nível de 5%.

Variáveis (n = 594)	<i>Candida</i> spp.				Total	p*
	Sim (n=56)		Não (n=538)			
	f _i	%	f _i	%		
Ardência na boca						**
Sim	13	41,9	18	58,1	31	
Não	281	50,4	277	49,6	558	
As vezes	3	60,0	2	40,0	5	
Boca seca						0,065
Sim	28	59,6	19	40,4	47	
Não	258	48,5	274	51,5	532	
Às vezes	11	73,3	4	26,7	15	
Visita ao dentista						**
Nunca foi	2	100,0	0	0,0	2	
Seis em seis meses	95	51,1	91	48,9	186	
Uma vez por ano	106	43,8	136	56,2	242	
Mais de um ano	37	52,1	34	47,9	71	
Mais de dois anos	56	61,5	35	38,5	91	
Quando sente dor	1	50,0	1	50,0	2	
Escovação dos dentes/ dia						0,845
Uma vez	6	60,0	4	40,0	10	
Duas vezes	71	50,4	70	49,6	141	
Três vezes	159	48,8	167	51,2	326	
Mais de três vezes	61	52,1	56	47,9	117	
Periodontite						0,384
Sim	23	44,2	29	55,8	52	
Não	274	50,6	268	49,4	542	
Presença de cárie						0,614
Sim	230	50,2	228	49,8	458	
Não	63	47,7	69	52,3	132	
Higiene oral						0,502
Boa	72	46,5	83	53,5	155	
Regular	177	50,6	173	49,4	350	
Ruim	48	53,9	41	46,1	89	

Tabela 3. Presença de *Candida* em relação ao Histórico Odontológico e Resultado do Exame Oral dos pacientes atendidos em UBS's da cidade de Manaus – AM.

* Qui-quadrado de *Pearson*, ** Não foi possível aplicar o qui-quadrado devido as restrições do teste.

Dos 594 pacientes, foram observadas 297 (50%) culturas positivas para leveduras. Dos que não utilizam prótese (406 pacientes) 156 (38,4%) foram positivos para leveduras. Dos 188 (31,6%) pacientes usuários de prótese dentária, 141 (75%) foram positivos para leveduras, apresentando diferença estatística significativa com p-valor < que 0,001 (Figura 1).

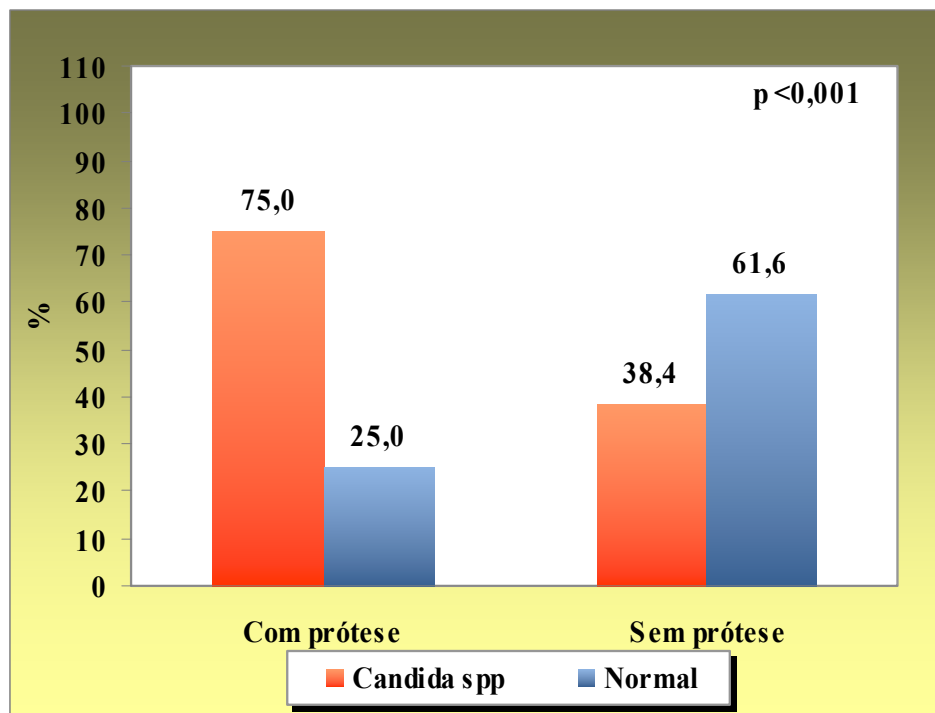


Figura 1. Presença de *Candida* em relação aos pacientes, com prótese e sem prótese, atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus – AM.

Nos pacientes usuários de prótese dentária foram encontradas os seguintes tipos: 33,5% total, 61,7% parcial removível e 4,8% fixa. Quanto ao tempo de uso foi encontrado uma média de 8 a 10 anos. Quanto à confecção da prótese 114 (60,3%) afirmaram que a prótese foi confeccionada pelo dentista e 75 (39,7%) foi confeccionada diretamente com o protético. Dos usuários de prótese, apenas 38 (20,6%) retiram a prótese para dormir, a maioria 185 (98,4%) tem o hábito de higienizá-la e 38 (20,2%) afirmaram sentir algum desconforto

em relação a prótese. Não foi encontrada associação estatística significativa relacionada a presença de *Candida*, na análise dessas variáveis (Tabela 4).

Ao examinar os pacientes usuários de prótese, foi verificado que 62 (33%) tinham lesão no palato sob a base da prótese. Quando relacionado a lesão no palato com a presença de *Candida* foi observada diferença estatística significativa ($p= 0,007$), conforme Tabela 4. Dos usuários de prótese, 53 (28,2%) estavam com lesão característica de estomatite protética (32 com estomatite protética tipo I, 19 com estomatite protética tipo II e 2 com queilite e estomatite). Dos pacientes com estomatite protética, 86,8% apresentaram presença de *Candida* na cavidade oral, nesse caso houve diferença estatística significativa com $p\text{-valor} = 0,019$ (Tabela 4).

Variáveis (n = 188)	<i>Candida spp.</i>				Total	p*
	Sim		Não			
	f _i	%	f _i	%		
Tipo de prótese						0,354
PPR	87	75,0	29	25,0	116	
PPF	5	55,6	4	44,4	9	
PT	49	77,8	14	22,2	63	
Tempo de uso (meses)						
Média ± DP	99,2 ± 88,0		82,4 ± 94,3			0,269
Amplitude	2 – 360		1 – 396			
Lesão no palato						0,007
Sim	52	83,9	10	16,1	62	
Não	89	70,1	38	29,9	127	
Confecção da prótese						0,863
Dentista	85	74,6	29	25,4	114	
Protético	56	75,7	18	24,3	74	
Retira a prótese para dormir						0,603
Sim	28	71,8	11	28,2	39	
Não	113	75,8	36	24,2	149	
Higieniza a prótese						****
Sim	138	74,6	47	25,4	185	
Não	3	100,0	0	0,0	3	
Sente desconforto						0,142
Sim	32	84,2	6	15,8	38	
Não	109	72,7	41	27,3	150	
Estomatite protética						
Sim	46	86,8	7	13,2	53	0,019
Não	95	70,4	40	29,6	135	

Tabela 4. Presença de *Candida* em relação aos Fatores Relacionados ao Uso de Prótese Dentária na cavidade oral dos pacientes usuários de prótese dentária atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus – AM.

* Qui-quadrado de *Pearson*; ** Teste t de *Student*; *** Teste do qui-quadrado com correção de *Yates*.

**** Não foi possível aplicar o qui-quadrado devido as restrições do teste (VIEIRA, 2004).

Valor de p em negrito itálico indica diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

Dos 297 pacientes positivos para levedura foram isoladas 908 amostras. Dessas amostras, 890 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Candida*. A Figura 2 demonstra a prevalência das espécies de *Candida* encontradas nesta pesquisa. Para 4,9% das amostras não foi possível determinar a espécie de *Candida*. A presença de outras leveduras ocorreu em 2% das culturas isoladas, entre elas, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Saccharomyces*.

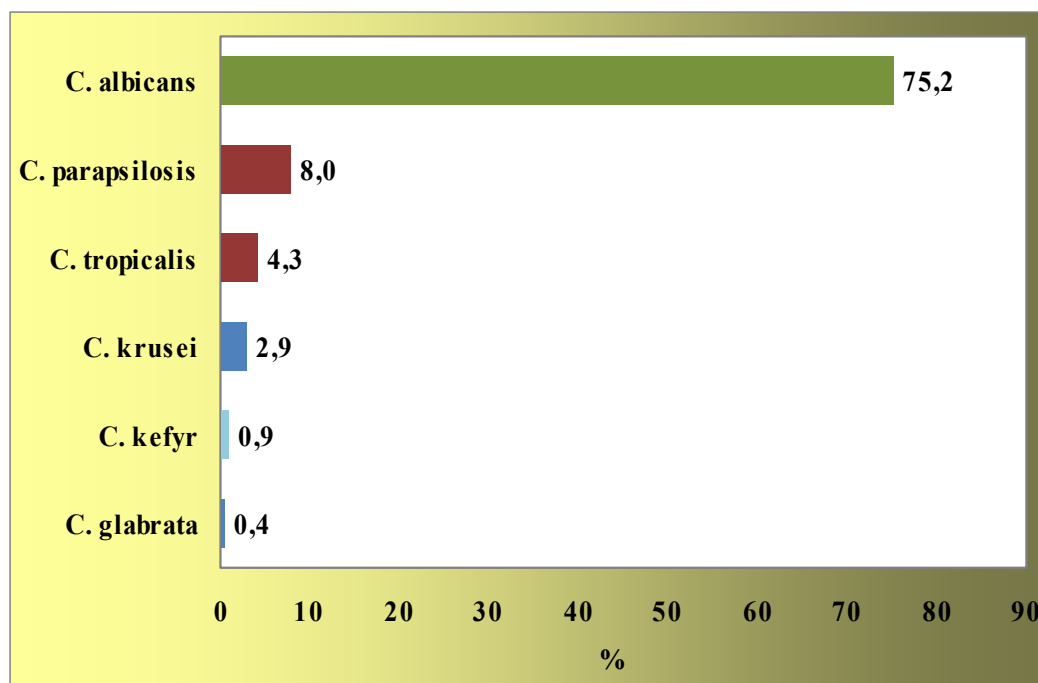


Figura 2. Prevalência das espécies de *Candida* encontrada em pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus – AM.

Discussão

No levantamento realizado nesta pesquisa foi encontrada uma prevalência de *Candida* de 50% para o total de pacientes com diferentes condições bucais usuários ou não de prótese dentária. Outros estudos sobre a presença de *Candida* na cavidade oral têm encontrado uma

prevalência entre 20 a 50% em indivíduos saudáveis (SANTOS et al., 2002; PEREIRA et al., 2004; GASPARETO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006, LYON et al., 2006).

Em relação ao gênero, se destaca uma prevalência de *Candida* nas mulheres com 11% a mais do que nos homens. Na comparação dos gêneros em relação a presença de *Candida* na cavidade oral observou-se diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% (p-valor = 0,016). Pires et al. (2002), analisando um grupo de pacientes edêntulos, em Piracicaba, usuários de prótese total, relataram que a presença de *Candida* na cavidade oral foi maior no gênero feminino. Barros (2005), também fazendo um estudo em Piracicaba, encontrou presença de *Candida* maior no gênero feminino do que no masculino, porém não encontrou diferença estatística significativa entre os gêneros quanto a presença de *Candida* em um ou mais sítios da cavidade oral. Outros estudos relatam uma maior colonização dessas leveduras em mulheres, relacionada a vários fatores (SANTOS et al., 2002; DAGSTAN et al., 2008).

Quando comparada a média de idade desses pacientes em relação a presença de *Candida* na cavidade oral, foi observada diferença estatística significativa ao nível de 5%, (p-valor = 0,001). Percebeu-se que a frequência da colonização por *Candida* teve um aumento proporcional com o aumento da idade. Lyon et al. (2006), em Minas Gerais, relataram uma porcentagem de colonização por *Candida* maior em pacientes idosos quando comparado com outras faixas etárias, podendo ser atribuído ao uso de alguns medicamentos, xerostomia e até mesmo a substituição da dentição natural por próteses.

O uso de alguns medicamentos, principalmente de antibióticos, pode favorecer a colonização das leveduras na cavidade oral, devido a mudanças na microbiota normal (LYON et al., 2006). Neste estudo o uso de medicamentos e a variável tratamento médico tiveram associação estatística significativa com a presença de *Candida* na cavidade oral.

Segundo Dagstan et al. (2008), nos pacientes usuários de prótese dentária a prevalência de *Candida* na cavidade oral é maior quando comparado com os que não utilizam

prótese dentária, ficando entre 60 a 100% dos pacientes. Neste estudo, nos indivíduos que não utilizam prótese dentária ocorreu uma prevalência de *Candida* de 38,4%. Quando consideramos somente os usuários de prótese dentária a prevalência de *Candida* aumentou para 75%, onde na comparação entre os dois grupos com e sem prótese dentária foi encontrado diferença estatisticamente significante com p-valor < 0,001. Estes resultados vão ao encontro dos achados de Al-Karaawi et al. (2002), que também encontraram diferença estatística significante quando compararam os dois grupos. Lyon et al. (2006), também encontraram uma prevalência de *Candida* na cavidade oral diferente nos dois grupos 64,2% para os usuários de prótese e 19,2% em indivíduos com dentição natural.

Neste estudo foi verificado que 53 (28,2%) dos usuários de prótese estavam com lesão característica de estomatite protética. Desses, em 46 (86,8%) foi confirmada a presença de *Candida*. Esses resultados diferem dos obtidos por Dar-Odeh e Shehabi (2002), realizado em pacientes jordanianos, o qual revelou que apenas 28% dos pacientes com estomatite protética foram colonizados por espécies de *Candida*. Já, Jorge et al. (1997), em São Paulo, comparando vários grupos, encontraram que o grupo de portadores de prótese total apresentou maior porcentagem de pacientes positivos para *Candida* (82,66%), porém não foi avaliada a relação com a estomatite protética.

Dagistan et al. (2008), na Turquia, avaliaram somente pacientes usuários de prótese, encontraram a estomatite protética presente em 70% dos pacientes examinados e 68% do total dos pacientes foram positivos para cultura. Essa diferença de porcentagem na presença de estomatite protética associada com a presença de *Candida* na cavidade oral, nos diferentes trabalhos, pode estar relacionada com as características da população de pacientes envolvida no estudo, podendo também ser devido a diferenças na virulência das cepas de cada local.

A estomatite protética pode afetar o palato em média 70% em usuários de prótese, para isto vários fatores podem estar envolvidos, como, a má higiene da prótese e da cavidade oral,

as porosidades encontradas na superfície das dentaduras, a colonização da superfície das próteses com microrganismos patogênicos, redução do fluxo salivar, alterações do pH e traumas causados pelo uso da prótese (LEMOS, 2003; GOIATO, 2005; KULAK-OZKAN, 2002). Para que ocorra a lesão é necessária a participação não só dos fatores locais como também o estado de saúde geral do indivíduo, a presença de alterações hormonais, diabetes, uso de corticóides e imunossupressores (COSTA et al., 1997; JORGE et al., 1997; DORKO et al., 2001; GRECCA et al., 2002; SILVA et al., 2002; GASPARETO et al., 2005; DAGISTAN et al., 2008).

Para confirmar se a presença de *Candida* está desencadeando a estomatite protética ou outros tipos de candidíase é necessário obter um diagnóstico baseado em testes laboratoriais. A rotina para identificação das leveduras envolve exame microscópico direto, exame da colônia, morfologia microscópica e várias reações bioquímicas. Além disso, devem ser observados os sinais e sintomas clínicos dos pacientes (NEUFELD, 1999; LEMOS et al., 2003; LORENZO, 2004; GOIATO, 2005; MARCUCCI, 2005).

Quanto às variáveis: tipos de prótese, tempo de uso, confecção, retirar a prótese para dormir, higiene e desconforto em relação a prótese não foi encontrada associação significativa ao nível de 5% quando relacionadas a presença de *Candida*. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística significante nos pacientes que não retiram a prótese para dormir foi alto o crescimento de *Candida* nesses pacientes (75,8%) e nos que sentem algum desconforto em relação a prótese também foi alta a colonização por *Candida* (84,2). Kulak-Ozkan (2002) e Thiele (2005) concordam que hábitos de higiene bucal, limpeza de próteses e o estado de conservação das mesmas têm importante significância clínica.

Na relação tipo de prótese e colonização por *Candida* na cavidade oral, apesar de não apresentar diferença estatística significante ao nível de 5%, merece um destaque em relação a colonização por *Candida* nos usuários de próteses parciais removíveis, que foi em 75% dos

usuários. O que se observa na literatura é que a maioria das pesquisas envolvendo estomatite protética e colonização por *Candida* se dá em pacientes usuários de próteses totais (AL-KARAAWI et al., 2002; LYON et al., 2006; DAGSTAN et al., 2008) e poucos trabalhos envolvem próteses parciais removíveis (JORGE et al., 1997; DAR-ODEH e SHEHABI, 2002). Jorge et al. (1997), encontrou positividade para *Candida* em 68% dos pacientes usuários de próteses parciais removíveis, dado semelhante ao encontrado neste estudo. São necessárias mais pesquisas que envolvam estes tipos de pacientes.

Foi observado neste estudo que 30% das próteses parciais removíveis foram confeccionadas por protéticos e não pelo cirurgião-dentista. Os protéticos não são habilitados para instalar prótese dentária nos pacientes, seu trabalho é apenas realizar a fase laboratorial da confecção da prótese que é planejada e orientada pelo cirurgião-dentista (COSTA et al., 1997; GOIATO et al., 2005). Mas a realidade mostra que esses profissionais estão realizando esta função sem habilitação. As próteses instaladas nos pacientes, por estes profissionais, não seguem os princípios biomecânicos para confecção com conseqüente má adaptação, sendo reservatório de infecções e causando lesões na mucosa adjacente (SILVA et al., 2002; GASPARETO et al., 2005).

O tempo de uso da prótese é um fator determinante para a colonização de microrganismos, devido às porosidades que aumentam com a idade da prótese favorecendo o aumento do biofilme da prótese. Comumente os pacientes acometidos por estomatite protética admitem utilizar as dentaduras de modo contínuo, removendo-as apenas para a limpeza (NEVILLE et al., 2004). A presença de *Candida* no biofilme da prótese dentária e outros fatores relacionados ao uso de prótese podem contribuir para o desenvolvimento da estomatite protética (DAGISTAN et al., 2008).

Neste estudo foram isoladas 890 espécies de *Candida*, sendo *C. albicans* a espécie mais freqüente, ocorrendo em 76,7% do total de isolados, indo de encontro com os resultados

obtidos na literatura (DORKO et al., 2001; SANTOS et al., 2002; DAR-ODEH, SHEHABI, 2002; PEREIRA et al., 2004; GASPARETO et al., 2005; BARROS, 2005; COLOMBO et al., 2006; LYON et al. 2006; DAGSTAN et al., 2008).

A alta frequência de *C. albicans* na cavidade oral pode ser atribuída à capacidade que estas leveduras têm de produzir tubos germinativos, e conseqüentemente pseudohifas, facilitando a aderência dessas leveduras às células epiteliais e a materiais plásticos (THIELE, 2005). Já a produção de enzimas histolíticas como fosfolipase e aspartil-protease, importantes fatores de virulência de *C. albicans*, podem estar envolvidas diretamente na produção de infecções na cavidade oral (DAR-ODEH e SHEHABI, 2002).

A frequência de espécies de *Candida* não *albicans* na cavidade oral, tem aumentado em conseqüência à sua maior capacidade de aderência e à maior resistência aos antifúngicos, conforme afirmam alguns autores (AL-KARAAWI et al., 2002; EL AZIZI et al., 2004; GASPARETO et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; DAGISTAN et al., 2008). Vários estudos têm relatado uma maior resistência de *C. glabrata* e *C. krusei* ao fluconazol. Isso pode ser atribuído ao uso prolongado e indiscriminado de azoles, nos últimos anos (HENRY, et al., 2000; DAR-ODEH e SHEHABI, 2002; SIDRIM, ROCHA, 2004; LYON et al. 2006).

Algumas pesquisas envolvendo isolados clínicos da cavidade oral têm encontrado *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* como as espécies não *albicans* mais frequentes (PENHA et al., 2000; DAR-ODEH e SHEHABI, 2002; GASPARETTO et al., 2005; LYON et al., 2006; DAGISTAN et al., 2008).

A frequência de *Candida* não *albicans* encontrada neste estudo foi 23,3%. Dentre estas espécies *C. parapsilosis* (8,2%,) foi a mais prevalente, seguida da *C. tropicalis* (3,9%), *C. krusei* (2,2%), *C. kefyr* (0,8%) e *C. glabrata* (0,2%). Penha et al. (2000), em São Paulo, em sua pesquisa envolvendo pacientes edêntulos usuários de prótese total com estomatite

protética, encontraram, depois de *C. albicans*, *C. parapsilosis* como a espécie mais freqüente (8,1%).

Dar-Odeh e Shehabi (2002), dentre as espécies não *albicans* isoladas, identificaram *C.krusei*, *C.tropicalis* e *C. glabrata* em proporções iguais. Dagistan et al (2008) e Lyon et al. (2006), encontraram em seus isolados de *Candida*, *C. glabrata* como a segunda espécie mais freqüente. Gasparetto et al. (2005), citaram *C. tropicalis* como a espécie não *albicans* mais freqüente, destacando uma maior aderência dessa espécie a polímeros plásticos em relação as outras espécies.

A colonização das leveduras na cavidade oral, bem como o conseqüente desencadeamento de infecções, depende de vários fatores. O fato de ocorrer divergência da prevalência de *Candida* na literatura pode ser decorrente dos fatores que estão influenciando o início da lesão, como também da forma como foi realizada a coleta do material a ser analisado e também dos meios de identificação dos microrganismos e sua patogenicidade (SANTOS et al., 2002; LYON et al. 2006). Estudos genéticos e de avaliação da resistência a antifúngicos e também quanto à virulência das cepas poderão ajudar a elucidar essas questões.

Em estudos recentes, na América Latina, *C. parapsilosis* tem sido reconhecida como a segunda principal causa de infecção invasiva. Depois de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são as mais freqüentes em infecções sistêmicas na América do Sul e *C. glabrata* é mais freqüente na América do Norte (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). Todos os isolados de *Candida* encontrados neste trabalho estão entre as principais espécies de interesse clínico.

Conclusão

A partir dos dados obtidos neste estudo podemos concluir que a prevalência das espécies de *Candida* tanto em pacientes usuários de prótese como em indivíduos com

dentição natural foi semelhante a prevalência encontrada em outras regiões do Brasil e outros países.

O uso de prótese dentária e os fatores individuais como, gênero, idade, uso de medicamentos e tratamento médico, mostraram ser importantes na prevalência de espécies de *Candida* na cavidade oral, no entanto, são necessárias pesquisas de caso-controle para determinar qual a influência de cada um desses fatores nas infecções por *Candida*.

Referências Bibliográficas

AL-KARAAWI, Z. M.; MANFREDI, M.; WAUGH, A. C. W.; MCCULLOUGH, M. J.; JORGE, J.; SCULLY, C.; PORTER, S. R. **Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings.** Oral Microbiol Immunol, n. 17, p. 44–49, 2002.

ARANGO, H. G. **Bioestatística Teórica e Computacional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

BARROS, L. M. **Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases.** 2005. (s.n.) Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental - Área de Microbiologia e Imunologia Oral) Universidade Estadual de Campinas - SP, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba.

DAR-ODEH, N. S; SHEHABI A. **Oral candidosis in patients with removable dentures.** Mycoses, n. 46, p. 187-191, 2002.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 36(5), p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J., NOUE'R, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A., WARNOCK, D.; MORGAN, J. **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.** Journal of Clinical Microbiology, vol. 44, n. 8, p. 2816–2823, aug., 2006.

COSTA, M. M.; OLIVEIRA, J. E. C.; PRADO, C. J.; et al. **As próteses removíveis e as iatrogenias evitáveis.** Robrac, Goiânia, v. 6, n. 21, p. 11-13, mar., 1997.

DAGISTAN, S.; AKTAS, A. E.; CAGLAYAN, F.; AYYILDIZ, A. e BILGE, M. **Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, Candida, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study.** Mycoses v. 52, p. 266-271, 2008.

DORKO, E.; JENCA, A.; PILIPCINEC, E.; DANKO, J.; SVICKY, E.; TKACIKOVA, L. **Candida – associated denture stomatitis.** Folia Microbiol, n. 46, p. 443-446, 2001.

EL-AZIZI, M.A. et al. **Interations of Candida albicans with other Candida spp. and bacteria in the biofilms.** J. Appl. Microbiol. West Yorkshire, v. 96, n. 5, p. 1067-1073, 2004.

EPI-INFO, Versão 3.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, Califórnia, janeiro de 1997.

FARIAS, N. C. de; BUFFON, M. M.; CINI, R. **Avaliação in vitro da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de Candida albicans.** Visão Acadêmica, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 83-88, jul.-dez., 2003.

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

GOIATO, M. C. et al. **Lesões orais provocadas pelo uso de próteses removíveis** in: Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa, v. 5, n. 1, p. 85-90, jan./abr., 2005.

HENRY, K. W.; NICKELS, J.T.; EDLIND, T.D. **Upregulation of ERG genes in Candida species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 44, n. 10, p. 2693-2700, oct., 2000.

JORGE, A.O.C.; KOGA-ITO C. Y.; GONÇALVES, C. R.; FANTINATO, V.; UNTERKIECHER, C. S. **Presença de leveduras do gênero Candida na saliva de pacientes de diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle.** Revista Odontológica da USP, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-285, out-dez., 1997.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. **Oral hygiene habits, denture clealiness, presence of yasts and stomatitis in alderly people.** J. Oral Rehabil, n. 29, p. 300-3004, 2002.

LEMONS, M. M. C.; MIRANDA, J. L de; SOUZA, M S. G. dos S. **Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura.** Revista Brasileira de Patologia Oral, v. 2, n. 1, p.3-10, jan./mar., 2003.

LORENZO, J. L. D. **Microbiologia para o estudante de odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. 274p.

LUIZ, R. R.; COSTA, A. J. L.; NADANOVSKY, P. et al. **Epidemiologia e bioestatística na pesquisa odontológica.** São Paulo: Atheneu, 2005. 473p.

LYON, J. P.; COSTA, S. C. da; TOTTI, V. M. G.; MUNHOZ, M. F. V. E RESENDE, M. A. de. **Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth.** J. Microbiol., n. 52, p. 462-467, 2006.

MARCUCI, G.; CRIVELLO Jr., O. **Fundamentos de Odontologia: Estomatologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 243p.

MATSUMOTO, F. E. et al. **Yeasts isolated from blood and catéter in children from a public hospital of São Paulo, Brasil.** Mycopathologia, v. 154, p. 63-69, 2001.

NEUFELD, P. M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico.** Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999. 230p.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 798p.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística.** 2ª.ed. São Paulo: Thomson, 2004. 506p.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X. da; PAULA, C. R. de. **Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis.** Pesq Odont Bras, v. 14, n. 2, p. 119-122, abr./jun., 2000.

PEREIRA, C. M.; PIRES, F. R.; CORRÊA, M. E. P.; DI HIPÓLITO JÚNIOR, O.; ALMEIDA, O. P. de ***Candida* in saliva of brazilian hemophilic patients.** J Appl Oral Sci., n. 12 (4), p. 301-6, 2004.

PIRES, F. R.; SANTOS, E. B. D.; BONAN, P. R. F.; ALMEIDA, O. P. de; LOPES, M. A. **Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients.** Journal of Oral Rehabilitation, n. 29, p. 1115-1119, 2002.

RIBEIRO, E. L. et al. **Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais.** NewsLab, Edição 64, p. 106-128, 2004.

SANTOS, E. B. dos; SCHWARTZ FILHO, H. O.; SCHWARTZ, E. A.; RAMOS JÚNIOR, E. S. **Perfil da saúde bucal e presença de *Candida* na cavidade bucal de pacientes atendidos nas clínicas odontológicas da UEPG.** PUBLICATIO UEPG – Biological and Health Sciences, n. 8 (1), p. 57-73, 2002.

SHAFFER, W. G., HINE, M. K., LEVY, B. **Tratado de patologia bucal.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 837p.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, C. H. L. et al. **Evidenciadores de biofilme em prótese total: avaliação clínica e antimicrobiana.** Pesq Odontol. Bras. São Paulo, v. 16, n. 3, p. 270-275, 2002.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. **Avaliação do sistema API 20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38(3), p. 261-263, mai./jun., 2005.

THIELE, M. C. de M. **Estomatite protética: estudo dos fatores predisponentes, graus de colonização por *Candida* spp. e fatores de virulência fúngica.** 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Estomatologia) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.

VIEIRA, S. **Bioestatística, Tópicos Avançados.** 2.ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

WAYNE, W. D. **Biostatistics: a foundation for analysis in the Health Sciences.** 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-52514-6, 1987. 157p.

Artigo 2

**Detecção de *Candida dubliniensis* a partir de amostras previamente
identificadas como *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de pessoas da
cidade de Manaus-AM, Brasil**

Shirley Araújo-Passos¹, Hugo Valério Corrêa de Oliveira², Ani Jackisch-Matsuura³ e Adriana Sotero-Martins⁴

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia – UFAM/UFPA/Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia.

² Dourorando do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - UFAM – Universidade Federal do Amazonas

³ Co-orientadora do Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia – UFAM/UFPA/ILMD-FIOCRUZ-Amazônia e Pesquisadora do Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-Amazônia.

⁴ Orientadora do Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia – UFAM/UFPA/ILMD-FIOCRUZ-Amazônia e Pesquisadora da ENSP/FIOCRUZ-Rio de Janeiro.

**Detecção de *Candida dubliniensis* a partir de amostras previamente
identificadas como *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de pessoas da
cidade de Manaus-AM, Brasil**

Resumo

A candidíase oral é uma infecção causada por espécies do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequentemente envolvida nessas infecções. *Candida dubliniensis* está geralmente associada a pacientes imunocomprometidos e é isolada de lesões da cavidade oral de pacientes HIV positivos. Possui características fenotípicas semelhantes com *C. albicans*, podendo o diagnóstico diferencial entre as duas espécies ser confundido. Este estudo teve como objetivo determinar a presença de *C. dubliniensis* a partir de amostras, previamente identificadas como *C. albicans*, isoladas da cavidade oral de pacientes que freqüentam as Unidades Básicas de Saúde da cidade de Manaus-AM. Foram utilizados um total de 683 isolados clínicos de *C. albicans*, todas identificadas por meio do Kit Candifast® (International Microbio) e microcultivo em lâmina, em meio ágar Fubá e Tween 80. De um total de 683 isolados de *C. albicans*, foram selecionadas 141 amostras que apresentaram abundantes clamidosporos, indiciosas para *C. dubliniensis*. Foi realizada a reação em cadeia da polimerase para a confirmação molecular desses isolados utilizando dois pares de oligonucleotídeos espécie-específicos, um para a própria *C. albicans* e outro para *C. dubliniensis*. Foi confirmada, por PCR, a identidade de 113 amostras para *C. albicans* e identificados 28 isolados de *C. dubliniensis*. Pode-se concluir que os oligonucleotídeos específicos CdF/CdR e CaF/CaR, utilizados neste estudo, foram efetivos para confirmar isolados de *C. albicans* e eficiente para detectar espécies emergentes como *Candida dubliniensis*. E que, *C. dubliniensis* é uma das espécies de *Candida* não-*albicans* mais freqüentes da microbiota oral de pessoas da cidade de Manaus.

Palavras-chave: *Candida*; Candidíase oral; Caracterização fenotípica; identificação molecular.

Detection of *Candida dubliniensis* among samples previously identified as *Candida albicans* and isolated from oral cavity of patients from Manaus, Amazon State, Brazil

Abstract

Oral candidosis is an infection caused by *Candida* species. *Candida albicans* is the most frequent species involved in these infections. *Candida dubliniensis* is normally associated with immunocompetent patients and was identified in cases of oral candidosis in HIV-infected individuals. The aim of this study was to determine *C. dubliniensis* among samples previously identified as *C. albicans* and isolated from the oral cavity of patients from the Basic Unit of Health (UBS)/SEMSA in Manaus city (Amazon state, Brazil). From 683 samples of *C. albicans* previously identified, 141 isolates presented abundant chlamydo-spores suggesting that they were *C. dubliniensis*. It was performed the polymerase chain reaction to molecular confirmation of these isolates by using two pairs of species-specific oligonucleotides, one to *C. albicans* itself and the other to *C. dubliniensis*. The identification was confirmed by primer-specific amplification. It was confirmed, by PCR, the identity of 113 samples for *C. albicans* and 28 samples were identified as *C. dubliniensis*. The data suggested that the species-specific oligonucleotides CdF/CdR and CaF/CdR, used in this work, were effective to confirm *C. albicans* isolates and efficient to identification of *C. dubliniensis* species from these isolates. We concluded that *C. dubliniensis* is one of *Candida* species more frequent of oral microbiota from patients of Manaus.

Key-words: *Candida*; oral candidosis; phenotypic characterization, molecular identification

Introdução

Espécies de *Candida* têm sido encontradas com frequência na cavidade oral de indivíduos saudáveis. A candidíase oral, doença infecciosa causada por espécies do gênero *Candida*, ocorre quando o equilíbrio no ambiente oral se modifica, estando relacionados, para isto, fatores locais e sistêmicos do indivíduo. *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente envolvida nessas infecções (DAR-ODEH E SHEHABI, 2002; PEREIRA et al., 2004; DAGISTAN et al., 2008).

Candida dubliniensis foi descrita por Sullivan e colaboradores em 1995 como um patógeno associado a pacientes imunocomprometidos (SULLIVAN et al. 2005). É o isolado mais comum de infecções da cavidade oral de pacientes HIV positivos, porém, pode ocorrer também em outros órgãos e sistemas de pacientes imunodebilitados, positivos ou negativos para HIV (AL-KARAAWI et al., 2002; SAHAND et al., 2006; KHLIF et al., 2009).

A prevalência de *C. dubliniensis* na cavidade oral de pacientes HIV positivos é de 1,5 a 32% (SULLIVAN et al., 2005). Apesar desta espécie já ter sido relatada na cavidade oral de pacientes HIV negativos, sua prevalência para este caso ainda está sendo pesquisada. A prevalência de *C. dubliniensis* foi 3%, isoladas da cavidade oral de 4 pacientes HIV negativos, internados em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) na Tunísia, com várias doenças graves (KHLIF et al., 2008). Al-Karaawi et al. (2002), realizaram a caracterização de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral com diversos problemas bucais e encontraram *C. dubliniensis* presente em 5,8% (15/257) dos casos. Na cavidade oral de pacientes diabéticos, Willis et al. (2000) e Manfredi et al. (2002), encontraram uma prevalência de 4,1% e 3,6%, respectivamente.

C. dubliniensis possui muitas características fenotípicas semelhantes à *C. albicans*, podendo o diagnóstico diferencial entre as duas espécies ser confundido em testes laboratoriais de rotina. São características de ambas o crescimento entre 30 e 37°C,

apresentam colônias de cor creme em ágar Sabouraud dextrose, produzem tubo germinativo, clamidosporos e possuem perfil bioquímico semelhante (SIDRIM; ROCHA, 2004; SULLIVAN et al., 2005). É válido ressaltar que há pouco mais de uma década, *C. dubliniensis* era considerada como sendo um subgrupo de *C. albicans* (SULLIVAN et al. 1995 *apud* SULLIVAN et al., 2005). De acordo com Al-Karaawi et al. (2002) e Barros (2005), estudos de genotipagem têm demonstrado distintos subgrupos de *C. albicans*, indicado perfis de resistência à antifúngicos e fatores de virulência variáveis.

Métodos fenotípicos e imunológicos têm sido utilizados na tentativa de identificar *C. dubliniensis* e diferenciá-la de *C. albicans*, estando entre eles, a inabilidade de *C. dubliniensis* em crescer a 45°C em diferentes meios; formação de abundantes clamidosporos (microcultivo) em diferentes meios, inclusive no Candiselect 4 (Bio-Rad, França); assimilação de sacarose e não de xilose; produção de colônias em meio Chromagar Candida (CHROMagar Microbiology, Paris, França), aglutinação positiva em teste comercial Bichro-Dubli fumouze® (Fumouze Diagnostico, França); e identificação por imunofluorescência indireta e imunocromatografia (ALVES et al., 2001; STAIB; MORSCHHAUSER, 2006; MAROT-LEBLOND et al., 2006; SAHAND et al., 2006; SAHAND et al., 2007; CHRYSSANTHOU et al., 2007; KHLIF et al., 2009). Embora possam se utilizar os métodos citados para sugerir *C. dubliniensis* e diferenciá-los de *C. albicans* estes não são suficientes.

Para alguns autores a discriminação confiável entre as duas espécies está baseada na análise por biologia molecular, como o emprego da PCR (reação em cadeia da polimerase) como via mais simplificada para a análise dos marcadores diagnosticáveis (SULLIVAN et al., 1995 *apud* SULLIVAN et al., 2005). Por exemplo, Khlif et al. (2009), utilizaram oligonucleotídeos específicos para identificar *C. dubliniensis* a partir de isolados de *C. albicans*, utilizando-se, para isto, polimorfismos do gene que codifica a proteína HWP1 (hyphal wall protein), expressas na fase micelial da levedura.

Foi feito um estudo com a proposta inicial de isolamento e identificação das espécies de *Candida* provenientes da cavidade oral de pacientes que freqüentam as Unidades Básicas de Saúde, da rede municipal de saúde, na cidade de Manaus-AM, Brasil. Para a identificação das espécies foram utilizados métodos clássicos de identificação (testes micromorfológicos e bioquímicos, com assimilação de carboidratos). O intuito de se utilizar uma abordagem molecular surgiu da observação de abundantes clamidosporos, detectados em microcultivo, indicando um possível direcionamento para identificação de espécies de *C. dubliniensis*. O método utilizado para essa identificação molecular foi a PCR (reação em cadeia da polimerase), com uso de marcadores moleculares para identificação específica de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (OLIVEIRA, 2007; Pedido de Patente em formulação por SOTERO-MARTINS et al., 2008). O presente estudo teve como objetivo, portanto, determinar a presença de *C. dubliniensis* entre as leveduras, caracterizadas micromorfológicamente e bioquimicamente como *C. albicans*, isoladas da cavidade oral de pacientes que frequentam as Unidade Básicas de Saúde da cidade de Manaus-AM, Brasil.

Material e Métodos

Microrganismos

Neste trabalho foram utilizados 683 isolados de *C. albicans*, coletados da cavidade bucal de pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde, da cidade de Manaus-AM, Brasil. Todos foram previamente identificados através de provas de assimilação de carboidratos pelo kit comercial Candifast® (International Microbio) e análise de microcultivo em lâmina, contendo meio ágar fubá com Tween 80. Para a observação microscópica, as lâminas foram coradas com azul de lactofenol. Todas as amostras que apresentaram abundantes clamidosporos foram julgadas indiciosas para *C. dubliniensis* (SULLIVAN et al., 2005) (Figura 1).

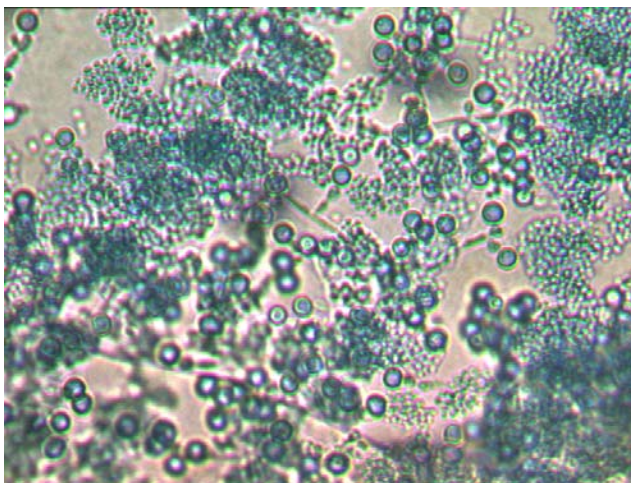


Figura 1. Amostra SLF28-3 (aumento 200x) com abundantes clamidosporos.
Fonte: o autor

Todos os isolados coletados encontram-se armazenados no Laboratório de Biodiversidade em Saúde, do Instituto Leônidas e Maria Deanne, da Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/FIOCRUZ).

Extração de DNA total

Colônias jovens de *Candida* (~1mm) foram inoculadas em 10mL de YPD (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona). Após 16h de crescimento em temperatura de 29°C o DNA genômico das leveduras foi extraído seguindo-se a metodologia descrita por Ausubel et al. (1994). Após a extração, o DNA foi ressuspenso em 50 μ L de água deionizada estéril e estocado a -20°C. As concentrações e purezas do DNA foram determinadas através de espectrofotometria, em comprimento de onda ultravioleta A_{260nm}/A_{280nm} (Sambrook et al., 1989).

PCR

Para a confirmação molecular dos isolados de *C. albicans* foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos espécie-específicos, um para a própria *C. albicans* e outro para *C. dubliniensis*. Estes oligonucleotídeos foram desenvolvidos em trabalho anterior e encontram-se sob júdice de Patente por SOTERO-MARTINS et al. (OLIVEIRA, et al. 2007 - dados ainda não publicados). A Tabela 1 destaca algumas informações dos pares de oligonucleotídeos utilizados, cada par é específico para identificação em nível de espécie de *Candida*.

Espécie	Oligonucleotídeo	Comprimento	Tm	Amplicom
<i>C. albicans</i>	<i>CaF</i>	20pb	52°C	~335pb
	<i>CaR</i>	19pb	52°C	
<i>C. dubliniensis</i>	<i>CdF</i>	21pb	54°C	~427pb
	<i>CdR</i>	20pb	54°C	

Tabela 1. Algumas propriedades dos oligonucleotídeos espécie-específicos para *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Fonte: OLIVEIRA, 2007 e Pedido de Patente em formulação por SOTERO-MARTINS et al.

Para cada amostra foram realizadas duas reações distintas, uma contendo o par de oligonucleotídeos para *C. albicans* (*CaF/CaR*) e a outra, o par de *C. dubliniensis* (*CdF/CdR*). As reações de PCR ocorreram em microtubos com capacidade para 200µL; o volume final de cada reação foi de 20µL. As concentrações dos reagentes utilizados foram: tampão de PCR 1X; solução equimolar de dNTPs 0,1mM; MgCl₂ 1,5mM; Taq DNA Polimerase (Invitrogen) 1,5U; o par de oligonucleotídeos correspondente, *CaF/CaR* ou *CdF/CdR*, na concentração de 10pmoles para cada um deles; e 2µL de amostra de DNA. As condições de termociclagem foram: 94°C por 4 min; 94°C, por 45 s; 52°C para a reação contendo *CaF/CaR* e 54 °C para a reação contendo *CdF/CdR*, ambos por 30 s; 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min, sendo 30

ciclos de amplificação (OLIVEIRA, 2007 – dados ainda não publicados; Pedido de Patente em formulação por SOTERO-MARTINS et al.)

As amostras foram aplicadas em gel de agarose 2%, contendo brometo de etídio 0,5µg/mL, e submetidas a voltagem de 3,5V/cm (Sambrook et al., 1989). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em um transiluminador.

Resultados

De um total de 683 isolados de *C. albicans* inicialmente analisados foram selecionados 141 amostras (20,6%), que apresentavam abundantes clamidosporos, o que é sugestivo de *C. dubliniensis*. A Figura 2 exemplifica as diferenças na disposição de clamidosporos em lâminas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

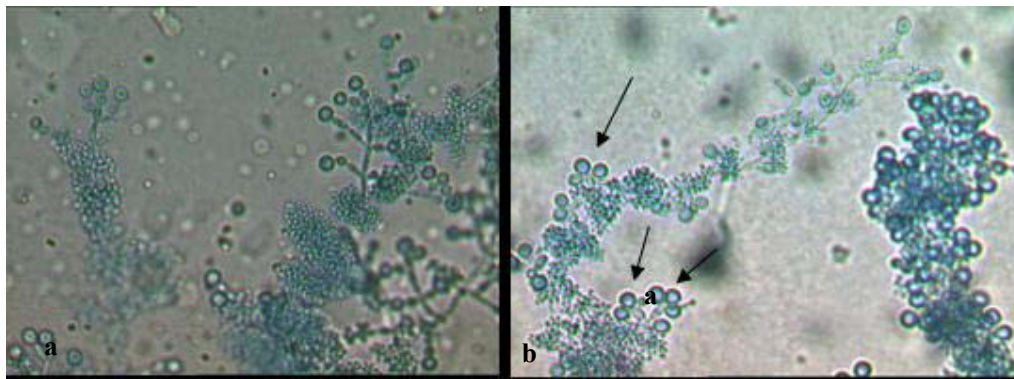


Figura 2. **a.** *C. albicans* SLF28-3, observa-se clamidosporos únicos nas pontas das hifas. **b** *C. dubliniensis* SLF 14, observa-se 3 ou 2 clamidosporos na ponta de pseudohifas (aumento de 200X).

Os resultados de PCR demonstraram que, dos 141 isolados identificados previamente como sendo *C. albicans*, 113 tiveram sua identidade confirmada com o uso do par de oligonucleotídeo específico para esta espécie (CaF/CaR). Estes 113 isolados foram provenientes de 72 pacientes. Foram identificados 28 isolados como sendo de *C. dubliniensis*, amplificados por seu respectivo par de oligonucleotídeos (CdF/CdR). Estes 28 isolados são

provenientes de 19 pacientes. Em 14 isolados constatou a presença tanto de *C. albicans* como de *C. dubliniensis*, com seus amplicons característicos, ~335pb e ~427pb, respectivamente (Quadro 2).

Isolado	A	D	Isolado	A	D	Isolado	A	D	Isolado	A	D
NAV01	+	-	LLC48P-1	+	-	NFV60-1	+	-	LGM41-1	+	-
NAV03	-	+	LLC56-1	+	-	NFV60-3	+	-	LGM41-3	+	+
NAV09-1	+	-	LLC56-2	+	-	NFV60P-1	+	-	LGM50-2	+	-
NAV12-1	+	-	SML15P-1	+	-	NFV60P-3	+	-	SLB13-2	+	-
NAV12-2	+	-	SML15P-2	+	-	NFV63P-1	+	-	SLB17P-1	+	-
NAV12P-1	+	-	SML15P-6	+	-	NFV63P-2	+	-	SLB17P-2	+	-
NAV19	+	-	SML21-4	+	-	NFV64-3	+	-	SLB17P-3	+	-
NAV19P-3	+	-	SML25-1	+	-	ORS14-2	+	-	SLB21-2	+	-
NAV23-3	+	-	SML44-2	+	-	ORS14P-3	+	-	SLB21P-2	+	-
NAV42-1	+	-	SML45-3	-	+	ORS22P-2	+	-	SLB37P	+	+
NAV44P-1	+	-	SML51-2	+	-	ORS22P-3	+	-	SLB46	+	+
NAV44P-2	+	-	SML51P	+	-	ORS25P-1	-	+	SLB60P-3	+	-
NAV49-2	+	-	SFC01-1	+	-	ORS37	+	-	SLB61-1	+	-
NAV56	+	-	SFC01P-1	+	-	ORS49P-1	+	-	SLB61-2	+	-
NAV61P-3	+	+	SFC01P-3	+	-	ORS49P-2	+	-	SLB61-3	+	-
NAV62-3	+	-	SFC11-3	+	-	ORS52-1	+	-	SLB61P-1	+	-
NAV70P-2	+	-	SFC14-1	+	-	ORS53-1	+	-	SLB61P-2	+	-
OBP21-2	+	-	SFC19-2	+	-	ORS57-1	-	+	SLB61P-3	+	-
OBP21-5	+	-	SFC20-2	+	-	ORS57-2	-	+	SLF05-2	+	+
OBP23-2	+	-	SFC21-3	-	+	ORS57-3	+	-	SLF05P-2	-	+
OBP23-4	+	-	SFC55P-2	+	-	ORS57P-1	-	+	SLF05P-3	+	+
OBP23-5	+	-	SFC60-3	+	+	ORS57P-2	+	+	SLF08-1	+	-
OBP26-1	+	-	NFV15-1	+	-	ORS64-1	+	-	SLF08-2	+	-
LLC04	+	-	NFV15-2	+	-	ORS64P-3	-	+	SLF08P-1	+	-
LLC08	+	-	NFV24-1	-	+	LGM02-1	+	-	SLF09-1	+	-
LLC12-2	+	-	NFV24-2	+	+	LGM08-1	+	-	SLF09-2	+	-
LLC17-3	+	-	NFV24-3	+	-	LGM08-2	+	-	SLF11-1	+	-
LLC20-3	+	-	NFV25-1	+	+	LGM10-2	+	-	SLF11-2	+	-
LLC25-1	+	-	NFV25-2	+	-	LGM11P-2	+	-	SLF14-2	-	+
LLC25-2	+	-	NFV25P-1	+	-	LGM11P-3	+	-	SLF18-1	+	-
LLC25-3	+	-	NFV25P-2	+	+	LGM25-2	+	-	SLF28-1	+	-
LLC25P-2	+	+	NFV30-1	+	-	LGM25P-1	+	-	SLF28-3	+	-
LLC34P-1	+	-	NFV34P-4	-	+	LGM25P-2	+	-	SLF34-3	+	-
LLC34P-6	+	-	NFV39-1	+	-	LGM28-1	-	+			
LLC37-1	+	-	NFV39P-2	+	+	LGM28-2	+	+			
LLC39-2	+	-	NFV41P-1	+	-	LGM28P-2	-	+			

Tabela 1. Resultado de todas as PCRs realizadas em 141 isolados de *C. albicans*.

A- PCR para detecção de *C. albicans* (oligonucleotídeos CaF/CaR).

D- PCR para detecção de *C. dubliniensis* (oligonucleotídeos CdF/CdR)

(+) indica positivo para a espécie.

(-) indica negativo para a espécie

As letras correspondem à zona e as iniciais do nome das Unidades de Saúde de onde foram coletadas as amostras: NAV – Norte/Arthur Virgílio; OBP – Oeste/Bairro da Paz; LLC – Leste/Luiza do Carmo; SML – Sul/Morro da Liberdade; SFC – Sul/Frank Calderon; NFV – Norte/Frei Valério; ORS – Oeste/Rayol dos Santos; LGM – Leste/Gilson Moreira; SLB – Sul/Lourenço Borghi; SLF – Sul/Lúcio Flávio. Os números correspondem aos pacientes e a letra P significa prótese.

A frequência de *C. dubliniensis* encontrada neste estudo foi 4% quando relacionada com o total de espécies *C. albicans* (683) avaliadas. As 28 espécies de *C. dubliniensis* foram isoladas de 19 pacientes que freqüentavam Unidades Básicas de Saúde, das quatro zonas (Norte, Sul, Leste e Oeste) da cidade de Manaus-AM. Desses pacientes, 16 (84,2%) eram do gênero feminino e 3 (15,8%) do gênero masculino, com idade entre 18 a 59 anos, sendo que na faixa entre 18 a 39 anos houve a maior ocorrência desta espécie (13 pacientes) comparada a faixa entre 45 a 59 anos (6 pacientes).

Do total de pacientes (19), 12 (63,2%) eram usuários de prótese dentária (8 prótese parcial removível e 4 prótese total). Dos pacientes usuários de prótese, 2 apresentavam lesão característica de estomatite protética tipo I, sendo que 1 estava usando antibiótico. Dos usuários de prótese, 2 eram imunocompetentes (uso de corticóides e quimioterápicos). Um paciente não usuário de prótese apresentava candidíase oral (queilite angular).

Todos os isolados de *C. dubliniensis* encontrados neste estudo estavam co-colonizando a cavidade oral dos pacientes em associação com *C. albicans*. Nenhum desses pacientes relatou ser HIV positivo, porém não foi possível confirmar com exames a veracidade deste dado.

A Figura 3 exhibe os amplicons característicos de ambas as espécies estudadas. Pode-se confirmar um fragmento nucleotídico de aproximadamente 335pb para *C. albicans* e outro, de aproximadamente 427pb para *C. dubliniensis*. Estes dados corroboram, desta forma, com os indicados por Oliveira, et al. (2007) (dados ainda não publicados).

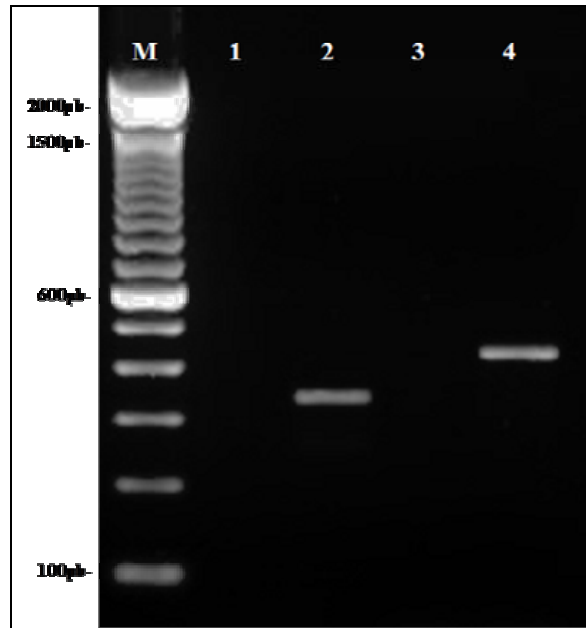


Figura 3. PCR realizada com oligonucleotídeos espécie-específicos para *C. albicans* e *C. dubliniensis*, visualizada em gel de agarose a 2%, com brometo de etídio 0,5µg/mL. Colunas 1 e 2, respectivamente controle (-) e controle (+) de CaF/CaR em *C. albicans* LLC56-1 (amplicom característico de ~335pb). Colunas 3 e 4, respectivamente controle (-) e controle (+) de CdF/CdR em *C. dubliniensis* ORS77-2 (amplicom característico de ~427pb). M- marcador de tamanho molecular de 100pb.

Na Figura 4, pode-se visualizar os amplicons característicos para *C. albicans* e *C. dubliniensis* pelo uso de seus respectivos oligonucleotídeos específicos.

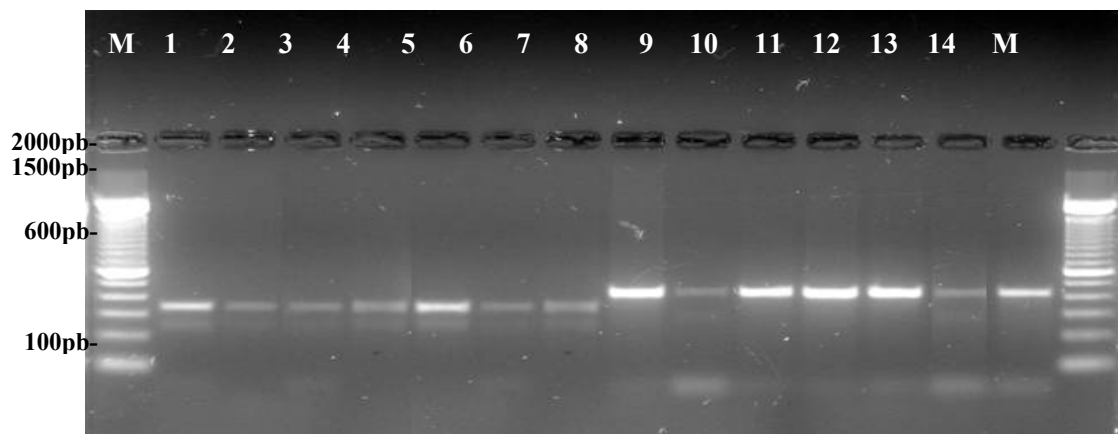


Figura 4. PCR realizada com oligonucleotídeos espécie-específicos, visualizada em gel de agarose a 2%, com brometo de etídio 0,5µg/mL. *C. albicans*: 1- SBC09-1; 2- SFC55P-2; 3- LLC34P-6; 4- SFC01P-3; 5- LLC48P-1; 6- NFV24-3 e 7- LGM25-2. *C. dubliniensis*: 8- SFC21-3; 9- NFV24-1; 10- ORS64P-3; 11- LGM28P-2; 12- SLF05P-3; 13- SLF05P-2; 14- ORS57-1.M- Marcador de tamanho molecular de 100pb

Discussão

O presente estudo destaca a ocorrência de *C. dubliniensis* provenientes da cavidade oral de indivíduos que freqüentam as Unidades Básicas de Saúde, na cidade de Manaus-AM. Este é um dado relevante, porque esta é uma espécie emergente com destacada ocorrência na cavidade oral de pacientes HIV positivos e imunodebilitados, mas que em trabalhos recentes vem sendo considerada também uma espécie isolada de indivíduos sadios (SULLIVAN et al. 2005; AL-KARAAWI, 2002; SAHAND et al., 2006; KHLIF et al., 2009).

A freqüência dos achados de *C. dubliniensis* neste trabalho é semelhante ao encontrado por outros autores (WILLIS et al., 2000; MANFREDI et al., 2002; AL-KARAAWI et al., 2002; KHLIF et al., 2009). Estudos realizados por Al-Karaawi et al. (2002), onde se avaliou a cavidade oral de pacientes que manifestavam alterações mucosas (líquen plano, estomatite aftosa recorrente, leucoplasias e doenças vesículo-bolhosas), pacientes portadores de próteses, usuários de aparelhos ortodônticos e em pacientes portadores de necessidades especiais, foi encontrada uma freqüência para *C. dubliniensis* igual a 5,8%. Já Khlif et al. (2009), isolaram *C. dubliniensis* de vários sítios anatômicos (urina, sangue e lesões na pele), inclusive da cavidade oral de pacientes internados em UTI e encontraram uma freqüência de 3,8% em 12 de pacientes HIV negativos. Willis (2000) e Manfredi et al. (2002), avaliando pacientes diabéticos, encontraram uma prevalência de 4,1% e 3,6%, respectivamente.

Os trabalhos citados, anteriormente, mostram a freqüência de *C. dubliniensis* em pacientes que já possuíam algum fator predisponente local ou sistêmico para ocorrência da colonização de leveduras. Neste estudo, 7 espécies de *C. dubliniensis* foram isoladas de pacientes imunocompetentes ou com algum problema bucal (2 de pacientes com lesão característica de estomatite protética tipo I, sendo que 1 deles estava usando antibiótico; 3 de pacientes usuários de prótese e imunocompetentes e 1 oriunda de paciente não usuário de

prótese com candidíase oral – queilite angular). Al-Karaawi et al. (2002), afirmam que os fatores locais exerceram maior influência do que os sistêmicos na colonização da cavidade oral por *C. dubliniensis*, porque, em seu estudo, esta espécie foi isolada de lesões presentes na cavidade oral e não foi encontrada em nenhum paciente imunocompetente.

No Brasil, alguns estudos apontam a importância de pesquisas epidemiológicas envolvendo *C. dubliniensis* na cavidade oral. Mariano et al. (2003) identificaram (2,0%) 11 isolados de *C. dubliniensis*, de 548 isolados previamente identificados como *C. albicans*, estocados no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de São Paulo, no período de 1994 a 2000, dos quais 9 eram provenientes da microbiota oral de pacientes HIV-positivos. Alves et al. (2000), no Rio Grande do Sul, relataram isolamento de *C. dubliniensis* da mucosa oral de um paciente HIV-positivo, mas sem lesões de candidíase oral, utilizando vários testes para caracterização fenotípica e identificação genotípica pela PCR. Barros (2005), em Piracicaba, São Paulo, utilizou a reação em cadeia da polimerase com *primer* arbitrário para identificar *C. dubliniensis* isolada da bolsa periodontal de um paciente sem história de comprometimento imune. Esses autores apontam um grande interesse para determinar a incidência de *C. dubliniensis* nos achados clínicos e indicam estudos visando esclarecer sua virulência, suas implicações terapêuticas e sua patogênese nas candidíases.

Os sistemas utilizados para identificação bioquímica das espécies de *Candida* apresentam vantagens e desvantagens entre si, entre elas, a limitação para a identificação de somente umas poucas espécies por kit e a exigência de colônias puras (SIDRIM; ROCHA, 2004; ELLEPOLA; MORRISON, 2005). *Candida albicans* é a espécie mais freqüente nos isolados clínicos e era diferenciada preliminarmente de outras espécies pela produção de tubo germinativo em soro e produção de clamidosporos em ágar fubá com Tween 80 (LACAZ et al., 1991).

Atualmente, além de *C. albicans*, outras espécies de *Candida* têm ocorrido de forma mais frequente em infecções tanto na cavidade bucal com em outros órgãos e sistemas (COLOMBO et al., 2006) e sua diferenciação de outras espécies, principalmente, *C. dubliniensis*, está mais complexa. Estudos para diferenciação de *C. dubliniensis* de *C. albicans* têm sido feitos e a característica apontada como mais importante é a formação precoce de abundantes clamidosporos e sua formação em trio ou em pares no ápice da pseudohifa (FAGGI et al., 2005; STAIB; MORSCHEHAUSER, 2006).

O método utilizado neste estudo de formação de abundantes clamidosporos em ágar fubá com Tween 80 para sugerir *C. dubliniensis* a partir de isolados identificados, preliminarmente, como *C. albicans*, indicou 141 amostras consideradas como suspeitas de *C. dubliniensis*, das quais foram confirmadas por método molecular, 28 amostras, ou seja, 19,8%. Alguns autores relatam o uso de testes de caracterização fenotípica mais específicas para detectar *C. dubliniensis*. Por exemplo, Alves et al. (2006), avaliaram a capacidade do ágar suco de tomate (ágar V8) em diferenciar *C. dubliniensis* de *C. albicans* com base na produção de clamidosporos. Como resultado obtiveram que 100% de *C. dubliniensis* formaram clamidosporos e 92,5% de *C. albicans* não evidenciaram estas estruturas e sugerem este meio como recurso alternativo na identificação presuntiva de *C. dubliniensis*.

No estudo de Khlif et al. (2009), de 367 isolados inicialmente identificados como *C. albicans*, 20 (5,4%) foram considerados suspeitos para *C. dubliniensis*, e confirmados com uso de método molecular a identificação de 14, ou seja, 70% dos suspeitos. Estes autores utilizaram quatro testes para suspeitar *C. dubliniensis*, como a falha do crescimento a 45°C, produção de abundantes clamidósporos em SA, cultura em Candiselect 4 (Biorad) e uso do teste comercial Bichro-Dubli fumouze®, com identificação específica para *C. dubliniensis*. A utilização de vários testes aumenta a possibilidade da determinação de *C. dubliniensis*, no entanto, é necessária a identificação molecular.

Alguns autores concordam que o Bichro-Dubli fumouze® é um teste de fácil realização e permite a identificação rápida e específica para *C. dubliniensis* (MAROT-LEBLOND et al., 2006; SAHAND et al., 2006; SAHAND et al., 2007; CHRYSANTHOU et al., 2007; KHLIF et al., 2009), porém Khlif et al. (2009) afirmam, ainda, que o método molecular é mais conveniente. Ratón (2004) e Ellepola e Morrison (2005), também apontam os sistemas que utilizam a biologia molecular como uma forma segura de diagnóstico e que podem oferecer potencial para uma identificação rápida e específica das espécies.

No presente estudo, a análise molecular por PCR indicou 14 isolados como sendo, cada um, constituído de duas espécies, *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Em uma primeira hipótese, isso sugere culturas mistas encontradas na cavidade bucal dos pacientes atendidos. Uma segunda hipótese sugere que fatores de contaminação podem ter ocorrido durante a fase de transporte, isolamento e/ou extração do DNA genômico das leveduras. Independente das hipóteses argüidas, o método de identificação molecular empregado neste trabalho foi extremamente sensível a ponto de detectar essa interação entre estas espécies. Tal fato demonstra que o método, ao contrário dos kits, manuais ou automatizados, não necessita de colônias puras.

C. dubliniensis pode ocorrer co-colonizando a mucosa bucal com outras espécies de *Candida* (PEREA et al., 2002; AL-KARAAWI et al., 2002). Willis et al. (2000), no Norte da Irlanda, encontraram *C. dubliniensis* em 18,2% da cavidade oral de pacientes diabéticos insulino-dependentes, porém estes isolados foram encontrados co-colonizando a cavidade oral com *C. albicans* e outras espécies de *Cândida*. Apenas 4,1% dos pacientes foram colonizados somente por *C.dubliniensis*. Al-Karaawi et al. (2002), encontraram em pacientes diabéticos, 3,5% colonizados somente por *C. dubliniensis*. Todos os isolados de *C. dubliniensis* encontrados neste estudo (4%) estavam co-colonizando a cavidade oral dos pacientes com

espécies de *C. albicans*. Entretanto, não se sabe que influência essa co-colonização com outros microrganismos exerce nos resultados clínicos (AL-KARAAWI et al., 2002).

Neste estudo foi verificada a ocorrência de *C. dubliniensis* em 12 pacientes usuários de próteses dentárias, ou seja, em 63,2% dos pacientes onde foi encontrada essa espécie, sendo 8 usuários de prótese parcial removível e 4 de prótese total. Considerando que algumas destas leveduras foram removidas do biofilme da prótese, os dados indicam a ocorrência dessas leveduras na superfície acrílica das próteses dentárias. Do contrário, os achados de Al-Karaawi et al. (2002), relatam a não ocorrência de *C. dubliniensis* em indivíduo edêntulo (usuário de prótese total) e sugerem uma predileção desta espécie por coabitação com microrganismos presentes no biofilme dental, como, por exemplo, o *Fusobacterium nucleatum*.

Para Barros (2005), o uso de métodos moleculares modernos, associados aos fenotípicos, tem permitido o aprimoramento da identificação e um maior conhecimento sobre as relações de comensalismo e patogenicidade das espécies de *Candida*. Dos 141 isolados identificados previamente como *C. albicans*, 116 foram confirmadas como tal, demonstrando que os padrões clássicos de diagnósticos necessitam ser complementados por métodos estritamente mais específicos, como os métodos baseados em biologia molecular. As 28 espécies de *C. dubliniensis* detectadas através de PCR vem confirmar a sensibilidade desta abordagem molecular.

Khelif et al. (2009), relatam que a alta prevalência de *C. dubliniensis* (15%) encontrada em cultura de sangue de pacientes HIV-negativos, internados em UTI (Unidade de Terapia Intensiva) indicam que esta espécie pode ser capaz de causar infecções invasivas em pacientes HIV negativos e sugere que sejam realizados exames de rotina para detecção desta espécie nos pacientes internados em UTI. As infecções invasivas por espécies de *Candida* podem ocorrer devido à prévia colonização da cavidade oral ou da orofaringe por cepas de alta

resistência (FARIAS, 2003; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; COLOMBO et al, 2006). Por isso, a identificação correta das espécies é de grande importância para uma conduta terapêutica adequada, pois estarão orientadas para os padrões de resistência característicos de determinada espécie circulante. Acompanhar a evolução de *C. dubliniensis* como um agente patológico em potencial é também testar e aprimorar métodos modernos de identificação.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os oligonucleotídeos específicos CdF/CdR e CaF/CdR, utilizados neste estudo, foram efetivos para confirmar isolados de *C. albicans*, preliminarmente identificadas por método bioquímico e morfológico, e eficientes para identificar *C. dubliniensis* a partir desses isolados.

A detecção de *C. dubliniensis*, neste estudo, como membro da microbiota bucal e com níveis de frequência comparáveis a de outras investigações da mesma natureza, permitem que sejam lançados as bases para uma vigilância epidemiológica.

Referências

AL-KARAAWI, Z. M.; MANFREDI, M.; WAUGH, A. C. W.; MCCULLOUGH, M. J.; JORGE, J.; SCULLY, C.; PORTER, S. R. **Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings.** Oral Microbiol Immunol, n. 17 (1), p. 44-49, 2002.

ALVES, S. H.; SILVA, G. M.; SCOPEL, P. A.; OLIVEIRA, L. T. O. et al. **Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul.** Rev. AMRIGS, Porto Alegre, n. 44 (3,4), p. 185-187, jul.-dez, 2000.

ALVES, S. H.; LINARES, C. E.; LORETO2, É. S. de; RODRIGUES, M.; THOMAZI, D. I.; SOUZA, F.; SANTURIO, J. M. **Utilização do ágar suco de tomate (ágar V8) na identificação presuntiva de *Candida dubliniensis*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, n. 39 (1), p.92-93, jan-fev, 2006.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D; SEIDMANM, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York, John Wiley & Sons, 1994.

BARROS, L. M. **Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases**. 2005. (s.n.) Tese (Doutorado em Biologia Buco-Dental - Área de Microbiologia e Imunologia Oral) Universidade Estadual de Campinas - SP, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J., NOUËR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A., WARNOCK, D.; MORGAN, J. **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers**. Journal of Clinical Microbiology, vol. 44, n. 8, p. 2816–2823, aug., 2006.

CHRYSSANTHOU, E.; FERNANDEZ, V.; PETRINI, B. **Performance of commercial latex agglutination tests for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* in routine diagnostics**. APMIS, n. 115, p. 1281–1284, 2007.

DAGISTAN, S.; AKTAS, A. E.; CAGLAYAN, F.; AYYILDIZ, A. e BILGE, M. **Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, *Candida*, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study**. Mycoses v. 52, p. 266-271, 2008

DAR-ODEH, N. S & SHEHABI A. **Oral candidosis in patients with removable dentures**. Mycoses, n. 46, p. 187-191, 2002.

ELLEPOLA, A. N. B.; MORRISON, C. J. **Laboratory diagnosis of invasive candidiasis**. The Journal of Microbiology, v. 43, n. S (special issue), p. 65-84, 2005.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E.; MARTINELLI, C.; DIFONZO, E. **Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection**. Mycoses, n. 48, p. 211–215, 2005.

KHLIF, M.; SELLAMI, H.; SELLAMI, A.; CHELLY, H.; MAKNI, F.; BOUAZIZ, M.; AYADI, A. ***Candida dubliniensis*: first identification in Sfax hospital, Tunisia**. Mycoses, vol. 52 (2), p.171-175, 2009.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica – Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

MANFREDI M, AL-KARAAWI Z, MCCULLOUGH MJ, HUREL S, PORTER SR. **The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus**. Oral Microbiol Immunol, n. 17, p. 181–185, 2002.

MARIANO, P. L. S.; MILAN, E. P.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L.; ***Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection.** Mem Inst Oswaldo Cruz, n. 98(4), p. 533-8, 2003.

MAROT-LEBLOND, A.; BEUCHER, B.; DAVID, S.; NAIL-BILLAUD, S.; ROBERT, R. **Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Assay for Identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.** Journal of Clinical Microbiology, Vol. 42, n. 11, p. 4956–4960, Nov., 2004.

OLIVEIRA, H. V. C. de. **Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de isolados clínicos de *Candida* spp.** 2007. 100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus.

PEREA S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; WICKES, L. B.; KIRKPATRICK, W. R.; DIB, O. P.; BACHMANN, S. P. et al. **Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis.** Antimicrob Agents Chemother, n. 46(6), p.1695–703, 2002.

PEREIRA, C. M.; PIRES, F. R.; CORRÊA, M. E. P.; DI HIPÓLITO JÚNIOR, O.; ALMEIDA, O. P. de. ***Candida* in saliva of brazilian hemophilic patients.** J Appl Oral Sci, n. 12 (4), p. 301-6, 2004.

RATÓN, T. O. **Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico.** Rev Iberoam Micol, n. 21, p. 15-19, 2004.

SAHAND, I. H.; MORAGUES, M. D.; ROBERT, R.; QUINDÓS, G.; PONTÓN J. **Evaluation of Bichro-Dubli Fumouze® to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, vol. 55, p.165-167, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 3 v.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

STAIB, P.; MORSCHHAUSER, J. **Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - an enigmatic developmental programme.** Mycoses, n. 50, p. 1–12, 2006.

SULLIVAN, D. J.; MORAN, G. P.; COLEMAN, DAVID C. ***Candida dubliniensis*: Ten years on.** FEMS Microbiology Letters, n. 253, p. 9–17, 2005.

WILLIS, A. M.; COULTER, W. A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C.; HAYES, J. R.; BELL, P. M. **Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients.** J Oral Pathol Med, n. 29(2), p. 86-90, 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KARAAWI, Z. M.; MANFREDI, M.; WAUGH, A. C. W.; MCCULLOUGH, M. J.; JORGE, J.; SCULLY, C.; PORTER, S. R. **Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings.** Oral Microbiol Immunol 2002; 17: 44–49. C Munksgaard, 2002.

ANDRADE, E. D. **Terapêutica medicamentosa em odontologia: procedimentos clínicos e uso de medicamentos nas principais situações da prática odontológica.** São Paulo: Artes médicas, 1998. 188p.

ARANGO, Héctor Gustavo – **Bioestatística Teórica e Computacional**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

AZUL, A. M.; TRANCOSO, P. F. **Patologia mais freqüente da mucosa oral.** Rev. Port. Clin. Geral, 22:369-77, 2006.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D.D; SEIDMANM, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology.** New York, John Wiley & Sons, 1994.

BERKOWITZ, R.J. et al. **Oropharyngeal *Candida* prophylaxis in pediatric bone marrow transplant patients.** J. Pediatric hematology Oncology 7:82-86, 1985.

CARVALHO de OLIVEIRA, T. R.; FRIGERIO, M. L. M. A.; YAMADA, M. C. M.; BIRMAN, E. G. **Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais.** Pesqui. Odontol. Brás. V. 14, n. 3, p. 219-224, jul./set., 2000.

COLOMBO, A. L. **Contribuições para o entendimento da epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. e para sua abordagem terapêutica.** 2003. Tese (Livre-Docência) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 36(5), p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUE'R, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. **Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers.** Journal of Clinical Microbiology, vol. 44, n. 8, p. 2816–2823, Aug. 2006.

COSTA, M. M.; OLIVEIRA, J. E. C.; PRADO, C. J.; et al. **As próteses removíveis e as iatrogenias evitáveis.** Robrac, Goiânia, v. 6, n. 21, p. 11-13, mar. 1997.

COWEN, L. E. et al. **Population genomics of drug resistance in *Candida albicans*.** PNAS, v. 99, n. 14, p. 9284-9289, jul. 2002.

- DAGISTAN, S.; AKTAS, A. E.; CAGLAYAN, F.; AYYILDIZ, A. e BILGE, M. **Differential diagnosis of denture-induced stomatitis, Candida, and their variations in patients using complete denture: a clinical and mycological study.** *Mycoses* v. 52, p. 266-271, 2008.
- DAR-ODEH, N. S & SHEHABI A. **Oral candidosis in patients with removable dentures.** *Mycoses*. 46: 187-191. 2002.
- DORKO, E.; JENCA, A.; PILIPCINEC, E.; DANKO, J.; SVICKY, E.; TKACIKOVA, L. **Candida associated denture stomatitis.** *Folia Microbiol*, 46: 443-446, 2001.
- EL-AZIZI, M.A. et al. **Interations of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms.** *J. Appl. Microbiol. West Yorkshire*, v. 96, n. 5, p. 1067-1073, 2004.
- ELLEPOLA, A.N.B.; MORRISON, C.J. **Laboratory diagnosis of invasive candidiasis.** *The Journal of Microbiology*, v. 43, n. S (special issue), p. 65-84, 2005.
- EPI-INFO, Versão 3.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, Califórnia, janeiro de 1997.
- FARIAS, N. C. de; BUFFON, M. M.; CINI, R. **Avaliação *in vitro* da ação antifúngica do digluconato de clorhexidina e nistatina no controle do crescimento de *Candida albicans*** in: *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 83-88, Jul.- Dez. 2003.
- GASPARETTO, A.; NEGRI, M. F. N.; PAULA, C. R. e SVIDZINSKI, T. I. E. **Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária** in: *Acta Sci. Health Sci. Maringá*, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005.
- GENCO, R. J.; GOLDMAN, H. M.; COHEN, D. W. **Periodontia Contemporânea.** 2ª edição, São Paulo: Santos, 1997. 238p.
- GOIATO, M. C. et al. **Lesões orais provocadas pelo uso de próteses removíveis** in: *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, João Pessoa, v. 5, n. 1, p. 85-90, jan./abr. 2005.
- GRECCA, K. A. M.; SILVA JÚNIOR, W.; TOMITA, N. E. et al. **Uso de próteses totais e lesões em tecidos moles na terceira idade.** *PCL*, Curitiba, v. 4, n. 22, p. 496-501, 2002.
- GREENSPAN et al. **Treatment of oral candidiasis in HIV infection.** *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. p.211-214, 1994.
- HENRY, K. W.; NICKELS, J.T.; EDLIND, T.D. **Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 10, p. 2693-2700, oct. 2000.
- JORGE, A.O.C.; KOGA-ITO C. Y.; GONÇALVES, C. R.; FANTINATO, V.; UNTERKIECHER, C. S. **Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes**

de diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. Revista Odontológica da USP, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-285, out-dez., 1997.

KHLIF, M.; SELLAMI, H.; SELLAMI, A.; CHELLY, H.; MAKNI, F.; BOUAZIZ, M.; AYADI, A. ***Candida dubliniensis*: first identification in Sfax hospital, Tunisia.** Mycoses, vol. 52 (2), p.171-175, 2009.

KULAK-OZKAN, Y.; KAZAZOGLU, E.; ARIKAN, A. **Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people.** Journal of Oral Rehabilitation, 29: 300-304, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica – Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LEMOS, M. M. C.; MIRANDA, J. L de; SOUZA, M S. G. dos S. **Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura** in: Revista Brasileira de Patologia Oral, v. 2, n. 1, p.3-10, jan./mar. 2003.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 720p.

LORENZO, J. L. D. **Microbiologia para o estudante de odontologia.** São Paulo: Atheneu, 2004. 274p.

LUIZ, R. R.; COSTA, A. J. L.; NADANOVSKY, P. et al. **Epidemiologia e bioestatística na pesquisa odontológica.** São Paulo: Atheneu, 2005. 473p.

MANFREDI M, AL-KARAAWI Z, MCCULLOUGH MJ, HUREL S, PORTER SR. **The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus.** Oral Microbiol Immunol: 17: p.181–185. @ Blackwell Munksgaard, 2002.

MARCUCI, G.; CRIVELLO Jr., O. **Fundamentos de Odontologia: Estomatologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 243p.

MATHIEU, M. C. et al. **Aromatic hydrocarbon receptor (AhR). AhR nuclear translocator- and p53-mediated induction of the murine multidrug resistance *MDR1* gene by 3-methylcholanthrene and benzo(a)pyrene in hepatoma cells.** The Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 7, p. 4819-4827, fev. 2001.

MATSUMOTO, F. E. et al. **Yeasts isolated from blood and catéter in children from a public hospital of São Paulo, Brasil.** Mycopathologia, v. 154, p. 63-69, 2001.

NEUFELD, P. M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico.** Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999. 230p.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 798p.

OLIVEIRA, H. V. C. de. **Desenvolvimento de marcadores moleculares para identificação de isolados clínicos de *Candida* spp.** 2007. 100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. 2^a.ed. São Paulo: Thomson, 2004. 506p.

PAIXÃO, G.C.; SIDRIM, J.J.C. **Meios de cultura usados em micologia**. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 247-254.

PENHA, S. S.; BIRMAN, E. G.; SILVEIRA, F. R. X. da; PAULA, C. R. de. **Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis**. Pesq Odont Bras, v. 14, n. 2, p. 119-122, abr./jun., 2000.

PEREA S.; LOPEZ-RIBOT, J. L.; WICKES, L. B.; KIRKPATRICK, W. R.; DIB, O. P.; BACHMANN, S. P. et al. **Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis**. Antimicrob Agents Chemother, n. 46(6), p.1695–703, 2002.

PEREIRA, C. M.; PIRES, F. R.; CORRÊA, M. E. P.; DI HIPÓLITO JÚNIOR, O.; ALMEIDA, O. P. de ***Candida* in saliva of brazilian hemophilic patients**. J Appl Oral Sci. 12 (4): 301-6, 2004.

PIRES, F. R.; SANTOS, E. B. D.; BONAN, P. R. F.; ALMEIDA, O. P. de; LOPES, M. A. **Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients**. Journal of Oral Rehabilitation, 29: 1115–1119, 2002.

RAMOS, F. M. B. **Influência da concentração de glicose, temperatura e agitação da capacidade de aderência de espécies de *Candida* à resina acrílica de uso odontológico**. 1995. 66p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

RATÓN, T. O. **Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico**. Rev Iberoam Micol. 21: 15-19, 2004.

RIBEIRO, E. L. et al. **Aspectos das Leveduras de *Candida* Vinculadas as Infecções Nosocomiais**. NewsLab. Edição 64: 106-128, 2004.

SAHAND, I. H.; MORAGUES, M. D.; ROBERT, R.; QUINDÓS, G.; PONTÓN J. **Evaluation of Bichro-Dubli FumouzeR to distinguish *Candida dubliniensis* from *Candida albicans***. Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.diag. microbio.2005.12.007, 2006

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. 3 v.

SANDHU, G. et al. **Molecular probes for diagnosis of fungal infections**. J Clin. Microbiol., v. 33, p. 2913-2919, 1995.

SANGLARD, D. et al. **Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters**. Antimicrob Agents Chemother. v. 39, p. 2378-2386, 1995.

SANTOS, E. B. dos; SCHWARTZ FILHO, H. O.; SCHWARTZ, E. A.; RAMOS JÚNIOR, E. S. **Perfil da saúde bucal e presença de *Candida* na cavidade bucal de pacientes atendidos nas clínicas odontológicas da UEPG**. Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences, 8 (1): 57-73, 2002.

SHAFFER, W. G., HINE, M. K., LEVY, B. **Tratado de patologia bucal**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. 837p.

SIDRIM, J. J. C. **Micoses oportunistas**. In: SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro, p. 171-191, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro, 1999. 287p.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 388p.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. **Avaliação do sistema API 20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 38(3), p. 261-263, mai./jun. 2005.

SILVA, C. H. L. et al. **Evidenciadores de biofilme em prótese total: avaliação clínica e antimicrobiana**. Pesq Odontol. Bras. São Paulo, v. 16, n. 3, p. 270-275, 2002.

STAIB, P.; MORSCHHAUSER, J. **Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* - an enigmatic developmental programme**. Journal Compilation @ Blackwell Publishing Ltd. Mycoses, 50, p. 1-12, 2006

SULLIVAN, D. J.; MORAN, G. P.; COLEMAN, DAVID C. ***Candida dubliniensis*: Ten years on**. FEMS Microbiology Letters, 253, 9-17, 2005

TEIXEIRA, M. F. S., SANTOS, L. O., QUEIROZ, L. A., CARVALHO, S. M. S. Una técnica para preparaciones permanentes de levaduras. Boletín Micológico, vol. 7 (1-2), p. 23-25, 1992.

THIELE, M. C. de M. **Estomatite protética: estudo dos fatores predisponentes, graus de colonização por *Candida* spp. e fatores de virulência fúngica.** 2005. 51f. Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Estomatologia) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba.

VIEIRA, Sonia. **Bioestatística, Tópicos Avançados.** Rio de Janeiro. 2.ed. RJ: Elsevier, 2004.p

WAYNE W. Daniel, **Biostatistics: a fundation for analysis in the Health Sciences**, 5th edition, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-52514-6, 1987. 157p.

WILLIS, A. M.; COULTER, W. A.; SULLIVAN, D. J.; COLEMAN, D. C.; HAYES, J. R.; BELL, P. M. **Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients.** **J Oral Pathol Med.** 29(2): p. 86-90, 2000

ZANETTI, R. V.; ZANETTI, A. L.; LAGANÁ, D. C. et al.. **Estudo de 60 pacientes portadores de prótese parcial removível: avaliação clínica das lesões nas áreas de suporte da mucosa bucal.** RPG, São Paulo, v. 3, n. 3, p. 175-184, jul./set. 1996.

ANEXO I – Carta de Autorização da Secretaria Municipal de Saúde




CARTA DE AUTORIZAÇÃO

AO ILMo. Sr. Secretário Municipal de Saúde de Manaus
Dr. Manoel Jesus Pinheiro Coelho

Vimos pelo presente instrumento solicitar vossa autorização para a coleta de amostras de saliva da cavidade oral em pacientes que freqüentam as Unidades Básicas de Saúde desta secretaria, no período de Maio a Outubro de 2007. A coleta destas amostras é parte importante para execução da pesquisa intitulada: "Avaliação da candidíase oral em pacientes portadores de prótese dentária removível na cidade de Manaus", a ser realizada pela pesquisadora Shirley Maria Diniz de Araújo, aluna do mestrado multiinstitucional Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia da CPqLMD/FIOCRUZ/UFAM/UFPA, regularmente matriculada e servidora desta secretaria, sob matrícula 083745-8-A no cargo de Cirurgiã Dentista, lotada na UBS Lúcio Flávio Vasconcelos Dias no regime jurídico estatutário do quadro de pessoal da Prefeitura de Manaus. O projeto de pesquisa, o cronograma e os instrumentos a serem aplicados aos sujeitos da pesquisa seguem em anexo, para ciência de Vossa Excelência. Certo de contarmos com a vossa valiosa contribuição para o assunto exposto, agradecemos antecipadamente.


 Shirley Maria Diniz de Araújo
 Pesquisadora

Adriana Sotero Martins
 CPq Leônidas e Maria Deane / FIOCRUZ
 Pesquisador
 Mat. SIAPE 1355591


 Dra. Adriana Sotero Martins
 Orientador

Manaus, 15 / 01 / 2007

AUTORIZAÇÃO

O secretário Municipal de Saúde de Manaus- AM, no uso de suas atribuições, autoriza a realização da pesquisa: "Avaliação da candidíase oral em pacientes portadores de prótese dentária removível na cidade de Manaus" de autoria de Shirley Maria Diniz de Araújo, aluna do curso de mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias do CPqLMD/FIOCRUZ/UFAM/UFPA, sob orientação da Dra. Adriana Sotero Martins.


 Secretário Municipal de Saúde de Manaus-AM

Manaus, 28 / 02 / 2007

ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº.0057.0.115.115-07, intitulado: **“Avaliação da candidíase oral em pacientes portadores de prótese dentária removível na cidade de Manaus”** tendo como Pesquisadora Responsável Shirley Maria Diniz de Araújo.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 10 de maio de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

ANEXO III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

FIOCRUZ - AM
UFAM
UFPA

Nº DO PACIENTE NO ESTUDO

AVALIAÇÃO DA CANDIDÍASE ORAL EM PACIENTES PORTADORES DE PRÓTESE DENTÁRIA REMOVÍVEL NA CIDADE DE MANAUS

Por favor, leia este documento até o fim e peça explicação sobre qualquer palavra ou frase que não tenha entendido.

Descrição e explicações:

- Estamos fazendo um estudo dos agentes causadores da Candidíase Oral. É importante estudar isto para que os profissionais de saúde que cuidam dessa doença conheçam melhor o problema de saúde que afeta a sua população.
- Para fazer este estudo precisamos colher amostras da saliva da mucosa oral.
- Se você, voluntariamente, concordar em participar deste estudo, será colhida uma amostra, de onde será isolado e identificado, bioquímica e molecularmente, os espécimes envolvidas na infecção e analisado a resistência deles a drogas. Não precisará realizar outros testes laboratoriais, nem de hospitalização.
- Todos os procedimentos serão realizados em apenas uma ocasião. Todo o material utilizado na coleta será descartável, esterilizado e seguro, obedecendo às normas de vigilância sanitária.
- Todas as dúvidas que tiver e as perguntas que quiser fazer serão respondidas, basta perguntar. Sempre que quiser falar conosco a respeito do assunto peça para a secretária da Biodiversidade em Saúde da FIOCRUZ localizar Shirley Maria Diniz de Araújo ou a Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura no telefone **3621-2323**.

Riscos associados ao estudo

- Não há riscos na coleta das amostras;

Benefícios

- Participando deste estudo, você não obterá qualquer benefício financeiro, mas estará contribuindo para o conhecimento da epidemiologia da candidíase oral em Manaus.

Confidencialidade dos registros

- Sua identidade permanecerá sempre na confidencialidade e os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão apenas apresentados para conhecimento científico e para autoridades normativas nacionais e internacionais.

Participação voluntária e consentimento

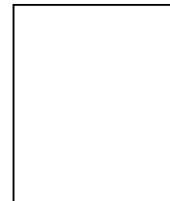
- A sua participação neste estudo é voluntária. Se não desejar participar do estudo, você será atendido normalmente, de acordo com a rotina deste serviço. Se quiser interromper sua participação no estudo, poderá fazê-lo no momento que desejar.
- Você tem o direito de manter uma cópia assinada deste documento.

EU CONCORDO EM PARTICIPAR DO ESTUDO, NAS CONDIÇÕES ACIMA DESCRITAS.

Nome: _____ RG: _____

Local: _____ Data: ____ / ____ /2008

Shirley Maria Diniz de Araújo
Pesquisadora



Polegar Direito

ANEXO IV – Questionário

PROJETO CANDIDÍASE ORAL - FIOCRUZ/UFAM/UFPA

UBS:..... DISTRITO:.....

AMS DATA DO ATENDIMENTO:...../...../.....

A – DADOS PESSOAIS:

NOME:.....

DATA DE NASCIMENTO:...../...../..... IDADE: SEXO:..... COR DA

PELE:.....

PROFISSÃO:..... ESTADO CIVIL:.....

NATURALIDADE:.....

B – HISTÓRIA MÉDICA

1) ESTÁ GRÁVIDA? SIM NÃO

3) USO DE ANTICONCEPCIONAIS: ORAL INJETÁVEIS QUAL?.....NÃO

4) USO DE ANTIFÚNGICO: QUANDO?...SIM QUAL?.....NÃO

5) USO DE ANTIBIÓTICOS: NOS ÚLTIMOS 30 DIAS USO RECORRENTE

6) SITUAÇÕES DE IMUNOSSUPRESSÃO: HIV/AIDS QUIMIOTERAPIA TRANSPLANTE CÂNCER

DIABETES LÚPUS CORTICÓIDE OUTRAS QUAIS:.....

7) ESTÁ FAZENDO TRATAMENTO MÉDICO? SIM NÃO QUAL?.....

8) ESTÁ TOMANDO ALGUM MEDICAMENTO? SIM NÃO QUAL?.....

9) AUMENTOU OU DIMINUIU DE PESO ULTIMAMENTE? SIM NÃO

10) É FUMANTE? SIM NÃO

11) INGERE BEBIDA ALCÓLICA? SIM NÃO

12) PORTADOR DE DST: SIM NÃO QUAL?.....

14) JÁ TEVE CANDIDÍASE VAGINAL/ORAL ? SIM TRATAMENTO COM E COMO? _____ NÃO

C) HISTÓRIA ODONTOLÓGICA

1) USA PRÓTESE DENTÁRIA? SIM NÃO QUAL? PPR PPF PT PI

2) HÁ QUANTO TEMPO USA PRÓTESE? MESES ANOS

3) ONDE FEZ A PRÓTESE? NO DENTISTA NO PROTÉTICO

4) RETIRA A PRÓTESE PARA DORMIR? SIM NÃO

5) TEM O HÁBITO DE HIGIENIZÁ-LA? SIM NÃO

6) SENTE ALGUM DESCONFORTO? SIM NÃO QUAL?

7) TEM SENSAÇÃO DE ARDÊNCIA NA BOCA? SIM NÃO

- 8) COSTUMA SENTIR A BOCA SECA? SIM NÃO
- 9) VAI AO DENTISTA REGULAMENTE? 6/6 MESES 1X NO ANO MAIS DE 1 ANO MAIS DE 2
- 10) QUANTAS VEZES AO DIA ESCOVA OS DENTES? UMA VEZ DUAS TRÊS MAIS DE 3

D) EXAME ORAL

- 1) LESÃO SOB A PRÓTESE? SIM NÃO
- AUTORIZA REGISTRO FOTO? SIM N°. _____ NÃO
- 2) PERIODONTITE? SIM NÃO
- 3) HIGIENE ORAL? BOA REGULAR RUIM
- 4) PRESENÇA DE CÁRIE DENTÁRIA? SIM NÃO
- 5) CANDIDÍASE? SIM NÃO QUAL?

6) OBSERVAÇÕES:.....

ANEXO V – Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento (QUIMIS ®)
- Autoclave vertical (Marte ®)
- Autoclave vertical (PHOENIX ®)
- Balança digital de precisão (Marte ®)
- Banho Maria (QUIMIS ®)
- Câmara de fluxo laminar (VECO ®)
- Centrífuga de tubos (CELM ®, modelo Combate).
- Congelador (Consul ®, modelo biplex CRD36BRANA).
- Congelador (Eletrolux ®, modelo biplex DFF44).
- Estação de trabalho para DNA (Loccus Biotecnologia ®)
- Freezer –20°C (Consul ®, modelo CVU24ABANA).
- Incubadora BOD a 30 °C
- Incubadora com agitação orbital de bancada CT-712 (CIEN TEC ®)
- Incubadora com agitação orbital refrigerada (Shaker) MA83 (MARCONI ®)
- Microcentrífuga (Eppendorf ®, modelo 5417C).
- Microcentrífuga (Eppendorf ®, modelo 5417R).
- Microondas (BRASTEMP ®, modelo DMV38ABHNA).
- Sistema de eletroforese (Fisher Scientific ®)
- Sistema de eletroforese (Loccus Biotecnologia ®)
- Sistema de eletroforese (Pharmacia Biotech ®)
- Sistema de eletroforese (Thermo EC ®)
- Sistema de fotodocumentação (UVP-Biolmaging Systems ®, modelo EpiChem³ Darkroom).

- Termociclador (Eppendorf ®)
- Termociclador (Eppendorf ® Gradiente)
- Termociclador (PERKIN ELMER ®, modelo Gene Amp PCR Systems 9700).
- “Vórtex” maxi mix II (Thermolyne ®)

ANEXO VI – Meios de Cultura

- **Meio Ágar Sabouraud (4% glicose; 1% peptona; 1,5% ágar).**

- Dextrose	40 g
- Peptona	10 g
- Ágar	15 g
- Água deionizada (q.s.p.)	1000 mL

O ágar é previamente adicionado à água deionizada e aquecido em forno microondas para um derretimento moderado. Em seguida, adiciona-se os demais ingredientes e o meio é autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Utilizou-se também o meio Ágar Sabouraud comercialmente pronto; a preparação deste consiste apenas na diluição da concentração desejada em água deionizada, com ligeiro aquecimento em forno de microondas. Após isso, o meio é autoclavado seguindo-se as mesmas condições descritas no parágrafo anterior.

- **Meio YPD (1% extrato de levedura; 2% glicose; 2% peptona).**

- Extrato de levedura	10 g
- Glicose	20 g
- Peptona bacteriológica	20 g
- Água deionizada (q.s.p.)	1000 mL

Os ingredientes serão adicionados à água e, em seguida, autoclavar-se-á por 15 minutos à 121°C.

- **Meio Ágar Fubá (Corn-meal) com Tween 80**

- Fubá de milho 40 g
- Ágar bacteriológico 20 g
- Tween 80 12 ml
- Água destilada (q.s.p.) 1000 ml

O fubá de milho é dissolvido em 500 ml de água, fervendo em banho-maria por 40 minutos; o volume de água inicial deverá ser restituído. Depois de frio, deve ser filtrado por meio de gaze e algodão. Em um recipiente separado o ágar deve ser dissolvido em 500 ml de água destilada. Em seguida, juntar o ágar dissolvido com o fubá e o tween 80 é acrescentado à mistura. Homoginizar a mistura e em seguida autoclavar por 15 minutos, a 121°C.

ANEXO VII – Soluções

- **Etanol Absoluto**

- Etanol 70%
- Solução de brometo de etídeo 10mg/mL
- Solução de fenol saturado (*pureza >99,0%*)
- Solução de carregamento de DNA, ou “solução de load” (*Glicerol 30%; Azul de bromofenol 0.025%; Xileno cianol 0,025%*).

- Glicerol	30mL
- Azul de bromofenol	0,025g
- Xileno cianol	0,025g
- Água deionizada (q.s.p.)	100mL

- Tampão TE

- Tris-HCl 1M (pH 7,8)	10mL
- EDTA 0,5M (pH 8,0)	2mL
- Água deionizada (q.s.p.)	1000mL

- Tampão TAE 50X

- Tris base	242g
- Ácido acético glacial	57mL
- EDTA 1M (pH 8,0)	50mL
- Água deionizada (q.s.p.)	1000mL

- **Tampão TEB 10X**

- Tris base	108g
- EDTA 0,5M	40mL
- Ácido bórico	55g
- Água deionizada (q.s.p.)	1000mL

- **Solução de Acetato de Amônio 4M**

- Acetato de amônia	3,08g
- Água deionizada (q.s.p.)	10mL

- **Solução de RNase-A 10mg/mL**

- RNase-A 20mg/mL	0,5mL
- Água deionizada (q.s.p.)	1mL

- **Tampão de Lise** (2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA, pH 8,0).

- Triton X-100	2mL
- SDS	1g
- NaCl	5,8g
- EDTA 1M (pH 8,0)	1mL
- Tris-HCl 10mM (pH 8,0) (q.s.p.)	100mL

ANEXO VIII – Enzima e Produtos para Biologia Molecular

- Enzima DNA polimerase (*Taq* DNA Polymerase – Invitrogen).
- Marcador de comprimento molecular de 100pb (Invitrogen).
- dNTP Set: dATP; dCTP; dGTP; dTTP (Invitrogen).
- Agarose (Invitrogen e Gibco).
- Pérolas de Vidro 212-300 μm (Sigma – Aldrich).

ANEXO IX – Modelo da Carta ao Diretor da Unidade

Manaus,de 2007.

Ao

Diretor (a) da UBS

Secretaria Municipal de Saúde/SEMSA

Prezado (a) Sr.(a),

Venho, por meio desta, solicitar autorização para realizar pesquisa com aplicação de questionário e coleta de amostras de saliva da cavidade oral em pacientes maiores de 18 anos que frequentam esta unidade básica de saúde para tratamento odontológico, no período de Agosto a Dezembro de 2007 ou ao completar o tamanho de amostras necessárias. Estas informações são necessárias para a realização do projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da candidíase oral em pacientes portadores de prótese dentária removível na cidade de Manaus**”, a ser realizado pela pesquisadora Shirley Maria Diniz de Araújo, aluna do mestrado multiinstitucional Saúde, Sociedade e Endemias da Amazônia da CPqLMD/FIOCRUZ/UFAM/UFPA. Este projeto já está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CAAE nº 0057.0.115.115-07) e autorizado pelo Secretário de Saúde de Manaus para realização da pesquisa nesta Secretaria, conforme documentos em anexo. Certo de contarmos com a vossa valiosa contribuição para o assunto exposto, agradecemos antecipadamente.

Atenciosamente,

Shirley Maria Diniz de Araújo
Pesquisadora

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](#)