

LETIZIA MONTEIRO DE BARROS

OCORRÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E *CANDIDA DUBLINIENSIS* EM SÍTIOS SUBGENGIVAIIS E NAS MUCOSAS DA CAVIDADE BUCAL: GENOTIPAGEM POR RAPD E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ASPARTIL PROTEINASES E FOSFOLIPASES.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia Oral.

Piracicaba
2005

LETIZIA MONTEIRO DE BARROS

OCORRÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E *CANDIDA DUBLINIENSIS* EM SÍTIOS SUBGENGIVAIIS E NAS MUCOSAS DA CAVIDADE BUCAL: GENOTIPAGEM POR RAPD E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE ASPARTIL PROTEINASES E FOSFOLIPASES.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de Microbiologia e Imunologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca Examinadora

Prof. Dr. Cássio Vicente Pereira

Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior

Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior

Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner

Piracicaba

2005

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B278o Barros, Letizia Monteiro de.
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. / Letizia Monteiro de Barros. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: José Francisco Höfling.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Bolsa periodontal. 2. Fatores de virulência. 3. Genotipo. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Occurrence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in the subgingival sites and on the mucosa of the oral cavity: genotyping by RAPD and enzymatic activities of aspartic proteinases and phospholipases

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): 1. Periodontal pocket. 2. Virulence factors. 3. Genotype

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia Oral

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora: José Francisco Höfling, Cássio Vicente Pereira, Francisco Humberto Nociti Júnior, Hercílio Martelli Júnior, Renata de Oliveira Mattos-Graner

Data da defesa: 09/08/2005

Aos meus colegas da Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia, pela participação relevante nesta pesquisa, pelos conhecimentos que, tantas vezes, me transmitiram, com inteligência e generosidade, e pela alegria em tê-los como amigos, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Monteiro de Barros (em memória) e Maria Francisca Gonçalves Monteiro, minha gratidão e meu amor.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, orientador deste trabalho, pela valiosa oportunidade que me concedeu, ao me aceitar como sua aluna, muito contribuindo para o meu aperfeiçoamento profissional, meus sinceros agradecimentos.

Aos Profs. Drs. Reginaldo Bruno Gonçalves e Renata de Oliveira Mattos-Graner, pelas disciplinas ministradas, e pelo incentivo e apoio, sempre que necessitei.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, pelo acolhimento, pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, o que muito contribuiu para minha formação.

À Universidade “José do Rosário Vellano – Unifenas”, na pessoa de seu magnífico reitor, Prof. Edson Antônio Velano, pela busca constante na qualidade do ensino em odontologia, pela generosidade e pelas oportunidades a mim concedidas, permitindo meu crescimento pessoal e profissional.

À FAEP – Fundação de Amparo ao Ensino e Pesquisa, pelo financiamento deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Hercílio Martelli Júnior, Cássio Vicente Pereira, Francisco Humberto Nociti Júnior, Renata de Oliveira Mattos-Graner, Marcelo Fabiano Gomes Boriollo e Francisco Carlos Groppo, por aceitarem compor a banca examinadora deste trabalho de tese.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Caria, Coordenador do curso de Pós-graduação em Biologia Bucodental da FOP-Unicamp.

Aos Profs. Drs. Sérgio Roberto Peres Line, Darcy Oliveira Tosello, Silvana Pereira Barros e Gláucia M. B. Ambrosano, pelas disciplinas ministradas, muito contribuindo para aperfeiçoar nosso conhecimento científico.

À Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Unifenas, e ao Prof. José Ronaldo Miranda, Diretor do Curso de Odontologia, pela solicitude e pelo apoio em todos os momentos.

Agradeço também, de modo especial, aos Drs. Ana Cláudia B. Amoras-Alves, Marlise Inêz Klein e Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, pela generosidade, disponibilidade e pelo valioso auxílio, durante os procedimentos de coleta dos microrganismos, dos testes moleculares, e da organização e discussão dos dados, que permitiram a realização deste trabalho.

Aos demais colegas, Regianne Umeko Kamiya, Rita de Cássia Mardegan, Ângela Guimarães Martins, Priscilla L. S. Mariano, Iriana Zanin, Marcelo Henrique Napimoga, Rafael Nóbrega Stipp, Vívian Fernandes Furletti, Ruchelle Dias Nogueira, Alessandra Castro Alves e Daniel Saito, e também a Anderson L. Teixeira, Wilma Ferraz e Flávia Pampolini, pelo apoio, e pelos bons e inesquecíveis momentos de convivência e amizade.

À Profa. Helena Engel Velano, a quem devo muito, pelo apoio e amizade, e aos Profs. Drs. Roseli Teixeira Miranda, Renata Ribeiro Bruzadelli, Hercílio Martelli Jr., João Evangelista Fiorini, e Amanda Beatriz D. A. Freitas, assim como aos demais professores do Curso de Odontologia da Unifenas, pelo aprendizado e pelo incentivo.

À tia Nice, com quem, em todos os momentos, sempre pude contar.

Às minhas irmãs, Mônica, Wanessa e Ana Paula, aos meus sobrinhos, Natália, Mila, Carlos Gabriel, Flora, Luíza, João Vítor e Pedro Henrique, e, também, a todos os meus amigos, pelo carinho e pela paciência que sempre tiveram comigo.

Aos voluntários, que, com boa vontade e espírito científico, permitiram a realização desta pesquisa.

A esta bela cidade, e ao rio de Piracicaba, o meu respeito e o desejo de que, apesar de tudo, ele sobreviva.

A Deus, pelos tempos de paz.

*"... Tudo vale a pena se a alma não é pequena
Quem quere passar além do Bojador
Tem que passar além da dor
Deus ao mar o perigo e abysmo deu
Mas nelle é que espelhou o céu"*

Fernando Pessoa, "Mar Portuguez"

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	1
RESUMO	5
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
3 PROPOSIÇÃO	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	57
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
AP-PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase com <i>Primer</i> Arbitrário (<i>Arbitrary Primer – Polymerase Chain Reaction</i>)
BSA	-	Albumina do Soro Bovino
<i>C. albicans</i>	-	<i>Candida albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	-	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	-	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. guilliermondii</i>	-	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>C. krusei</i>	-	<i>Candida krusei</i>
<i>Candida</i> spp.	-	Espécies do gênero <i>Candida</i>
<i>C. parapsilosis</i>	-	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>C. tropicalis</i>	-	<i>Candida tropicalis</i>
dc	-	diâmetro da colônia
dATP	-	Deoxinucleosídeo Adenina Trifosfato
dCTP	-	Deoxinucleosídeo Citosina Trifosfato
dGTP	-	Deoxinucleosídeo Guanina Trifosfato
dTTP	-	Deoxinucleosídeo Timina Trifosfato
EBV	-	Vírus Epstein-Barr
ET	-	Tipo eletroforético (<i>Electrophoretic Type</i>)
<i>F. nucleatum</i>	-	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>F. periodontium</i>	-	<i>Fusobacterium periodontium</i>
<i>F. sulci</i>	-	<i>Fusobacterium sulci</i>
HCV	-	Citomegalovírus
HIV	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV-1	-	Vírus do Herpes Simples tipo I

M	- Molar
MLEE	- Eletroforese de Enzima Multiloco (<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>)
mM	- Milimolar
ng	- Nanograma
pb	- Pares de bases
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	- Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
<i>P. gingivalis</i>	- <i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. nigrescens</i>	- <i>Prevotella nigrescens</i>
PLC	- Fosfolipase C
PLD	- Fosfolipase D
PZ	- Zona de atividade enzimática
RAPD	- Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (<i>Random Amplified polymorphic DNA</i>)
REA	- Análise por Enzima de Restrição (<i>Restriction Enzyme Analysis</i>)
SAP	- Família de genes que codificam as isoenzimas <i>Saps</i>
<i>Saps</i>	- Enzimas Aspartil Proteinases Secretadas (<i>Secreted Aspartic Proteinases</i>)
SDS-PAGE	- Dodecilsulfato de Sódio – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
<i>S. oralis</i>	- <i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. gordonii</i>	- <i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. sanguinis</i>	- <i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S. aureus</i>	- <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>	- Espécies de <i>Staphylococcus</i>
S _{SM}	- Coeficiente de Similaridade <i>Simple Matching</i>
Taq DNA Polimerase	- Enzima DNA polimerase

TBE	- Tampão Tris-borato-EDTA
TE	- Tampão Tris-EDTA
UFC	- Unidade Formadora de Colônia
UPGMA	- <i>Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average</i>
YPD	- Yeast Peptone Dextrose
zp	- zona de precipitação

RESUMO

Candida spp. são leveduras oportunistas, que habitam a cavidade bucal de uma proporção significativa da população saudável. Entretanto, sob condições predisponentes, podem provocar candidose bucal. Foram avaliados 53 pacientes com diagnóstico de periodontite, porém saudáveis sistemicamente, com o objetivo de verificar a ocorrência destes microrganismos em 3 sítios distintos: bolsa periodontal, sulco gengival e mucosa bucal. As amostras foram semeadas em meio cromogênico seletivo, e a identificação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi feita por PCR. Vinte e um pacientes (39,6%) foram positivos para *Candida* spp. Não houve diferença significativa na frequência de colonização entre os gêneros (teste χ^2 , $p=0,5922$), ou entre os sítios (teste χ^2 , $p=0,1287$). Entretanto, as bolsas periodontais foram mais densamente povoadas (UFC/mL) do que os outros sítios (teste ANOVA, $p=0,0319$), podendo ser consideradas, assim, um bom reservatório para estas leveduras. *C. albicans*, foi a espécie prevalente, em relação às demais (teste exato de Fischer; $p=0,0088$). *C. dubliniensis* ocorreu em um paciente, nas bolsas periodontais. A diversidade genética de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foi analisada pelo método de RAPD, utilizando dois *primers* arbitrários (OPA-03 e AP-03), sendo detectados 16 tipos eletroforéticos distintos entre os 156 isolados de *C. albicans* e de um tipo eletroforético entre os três isolados de *C. dubliniensis*. Não houve diferença significativa entre os sítios (teste ANOVA, $p=0,6431$), nem entre os gêneros (teste t de student, $p=0,892$), quanto à diversidade genotípica de *C. albicans*. Todos os isolados apresentaram atividade enzimática de aspartil proteinases (*Saps*) e de fosfolipases, podendo ser considerados, portanto, potencialmente patogênicos. A propagação sistêmica de linhagens potencialmente patogênicas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, assim como de outras espécies do gênero, poderia ser favorecida em determinados grupos populacionais, especialmente quando as bolsas periodontais se apresentassem densamente colonizadas. Estudos longitudinais seriam necessários, para acessar o grau de manutenção dessas linhagens, em diferentes populações, incluindo a avaliação dos fatores de virulência e da susceptibilidade a agentes antifúngicos, bem como verificar a eficácia da terapia periodontal no controle e/ou eliminação dessas espécies da cavidade bucal.

ABSTRACT

Candida spp. are opportunistic yeasts that are able to inhabit the oral cavity of a high proportion of the healthy people. However, under predisponent conditions, *Candida* species are associated many forms of oral candidoses. A total of 53 patients with periodontitis, without systemic disease, were evaluated to verify the occurrence of this microorganism in three different sites: periodontal pocket, gingival sulci and oral mucosa. The samples were plated on chromogenic medium, and *C. albicans* and *C. dubliniensis* were identified by PCR Twenty-one volunteers (39.6%) were positive to *Candida* spp. in one or more sites. No statistical differences were detected between the genders, male or female (χ^2 , p= 0.5922), or sites (χ^2 , p= 0.1287). Periodontal pockets were more heavily populated (CFU/ml) than other sites (ANOVA, p=0.0319), so may be considered a yeast reservoir. It was found a higher prevalence of *C. albicans* compared to other species (Fischer test, p=0.0088). *C. dubliniensis* were recovered from the periodontal pocket from one patient. The genotypic diversity of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* were analyzed by RAPD, using two arbitrarily primers (OPA-03 and AP-03), and 16 electrophoretic types were detected among 156 isolates of *C. albicans* and one electrophoretic type among three isolates of *C. dubliniensis*. There was no statistical difference among the analyzed sites (ANOVA, p=0.6431), neither between of gender (student t test, p=0.892) related with the genotypic diversity of *C. albicans*. All isolates showed enzymatic activity of aspartil proteinase (*Saps*) and phospholipase, so may be considered potentially pathogenic. Systemic propagation of commensal *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and other species, would be favor in some population, especially in heavily populated periodontal pockets with *Candida* spp. Longitudinal studies must be done to establish the lineage maintenance in a different population and forms of periodontal disease, including the evaluation of virulence factors, antifungal susceptibility, and to assess the efficacy of different periodontal treatment to eliminate this species from the oral cavity.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* compreende um grupo de leveduras encontrado em diversos ecossistemas, inclusive na microbiota residente de humanos e animais (Höfling & Rosa, 1999). No entanto, podem comportar-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que se manifestam clinicamente por lesões superficiais da pele e mucosas, ou mesmo, sob determinadas circunstâncias, como candidoses disseminadas, muitas vezes severas ou letais (Liu *et al.*, 1996). Nas últimas duas décadas a literatura tem relatado uma ocorrência crescente de infecções por esses fungos, assim como a identificação de novas espécies patogênicas, principalmente em imunocomprometidos (Pfaller, 1995; Pizzo *et al.*, 2002).

Aproximadamente metade da população adulta saudável abriga essas espécies na cavidade bucal (Arendorf & Walker, 1980), sendo as superfícies mucosas consideradas o reservatório principal, mas elas podem ser encontradas também no biofilme dental, co-agregadas a espécies bacterianas aí presentes, ou mesmo aderindo-se diretamente à película salivar (Cannon *et al.*, 1995; Nikawa *et al.*, 1998). Os biofilmes contendo *C. albicans* podem ser importantes para a manifestação de candidoses mucosas e para o processo de colonização, tanto de cavidades de cárie como de bolsas periodontais (George & Falkler, Jr. 1992; Starr *et al.*, 2002). A espécie *C. dubliniensis* tem também demonstrado grande capacidade de adesão às células epiteliais, às mucinas salivares e a determinadas espécies bacterianas (McCullough *et al.*, 1996; Jabra-Rizk *et al.*, 1999; De Repentigny *et al.*, 2000; O'Sullivan *et al.*, 2000; Jabra-Rizk *et al.*, 2001).

Para diversos autores, a presença desses fungos em áreas subgingivais pode contribuir para a patogênese da doença periodontal, bem como determinar um risco aumentado de candidose sistêmica, em casos de depressão imune (Beighton *et al.*, 1995; Nikawa *et al.*, 1998; Kamma *et al.*, 1999; Hannula *et al.*, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2001; Al-Karaawi *et al.*, 2002). Contudo, as espécies de *Candida* não têm recebido ainda o enfoque necessário à compreensão de seu papel como patógenos periodontais, embora já tenha sido reconhecida a sua capacidade de aderir ao epitélio,

invadir o tecido conjuntivo gengival, produzir fatores de virulência e induzir reações inflamatórias (Haffajee & Socransky, 1994; Robinson, 1997; Lamster *et al.*, 1998; De Repentigny *et al.*, 2000; Hube & Naglik, 2001; Reynaud *et al.*, 2001; Järvensivu *et al.*, 2004).

Para colonizar, infectar e evadir-se das defesas do hospedeiro, *C. albicans* possui um repertório de fatores de virulência, que inclui uma variedade de enzimas, cujos principais representantes são as proteinases aspartil secretadas (*Saps*), e as fosfolipases. O estudo dessas enzimas como fatores de virulência é relativamente recente e está em rápida evolução. Futuramente, o estabelecimento de possíveis correlações entre a atividade enzimática e as diferentes linhagens de *C. albicans*, assim como a compreensão mais aprofundada do papel desempenhado por essas enzimas durante os processos infecciosos, abrirá novas perspectivas de intervenções terapêuticas (Ollert *et al.* 1995; Ghannoum, 2000; Hube & Naglik, 2001; Niewerth & Korting, 2001; Calderone & Fonzi, 2001).

A candidose é considerada a mais freqüente infecção fúngica bucal e *C. albicans* é a principal espécie relacionada, embora outras espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*, dentre outras, também ocorram, especialmente em populações imunocomprometidas (Xu, Y *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2000). A identificação de *Candida* spp. pode ser feita através da análise fenotípica dos caracteres morfológicos e fisiológicos exibidos pelas cepas. Entretanto, os métodos moleculares têm permitido um aprimoramento da identificação e caracterização desses microrganismos (McCullough *et al.*, 1995; Sullivan *et al.*, 1995; Milan *et al.*, 2001), auxiliando a esclarecer o papel desempenhado por diferentes espécies e subespécies de *Candida* na colonização de diferentes grupos populacionais, bem como os fatores de risco associados à manifestação de infecção (Lockhart *et al.*, 1999; Hannula *et al.*, 2001; Kam & Xu, 2002; Davies *et al.*, 2002).

A Reação em Cadeia da DNA-Polimerase - PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é uma técnica que envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento de DNA, na presença da enzima Taq DNA polimerase, e tem sido largamente utilizada para a identificação e genotipagem de microrganismos. Dentre suas vantagens estão a relativa rapidez e simplicidade do método, a aplicabilidade universal e um menor gasto de material,

enquanto seu poder discriminatório se mantém comparável aos métodos mais complexos (Van Belkum *et al.*, 1994). Dentre as diferentes aplicações do PCR, o método de RAPD, ou AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com *Primer* Arbitrário) é também bastante empregado em estudos epidemiológicos de leveduras (Hannula *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2003).

Entretanto, ainda é pequeno o conhecimento da distribuição ecológica destas leveduras em populações homogêneas saudáveis, pois a maioria dos estudos é feita com grupos de indivíduos imunocomprometidos (Kam & Xu, 2002; Al-Karaawi *et al.*, 2002). Como, segundo alguns autores, a grande parte das infecções por *Candida* spp. origina-se de cepas comensais, que habitavam o meio-ambiente bucal anteriormente à infecção, a ocorrência desses fungos, mesmo como comensais, pode ter implicações médicas consideráveis (Lockhart *et al.*, 1995; Kam & Xu, 2002).

Devido ao relevante papel que as espécies de *Candida* desempenham na ecologia da cavidade bucal, e a importância de estudos sobre a distribuição dessas leveduras em diferentes grupos populacionais, na elaboração de estratégias para a prevenção de candidoses, a presente pesquisa tem como objetivo verificar a ocorrência de *Candida* spp. em pacientes periodontais sistemicamente saudáveis, distinguir e genotipar os isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* pelos métodos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR específico e RAPD), bem como detectar a produção de fatores de virulência, em amostras clínicas obtidas de três sítios distintos da cavidade bucal: bolsa periodontal, sulco gengival e mucosa bucal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Características Biológicas e Epidemiológicas de *Candida* spp.

Os fungos são seres uni ou multicelulares, que habitam diversos ecossistemas, sendo classificados em um dos 5 reinos da natureza, o Reino Fungi. Os outros são o Reino Monera, que inclui as bactérias e as algas azuis; o Reino Protista, que engloba organismos como os protozoários; o Reino Plantae, ao qual pertencem as plantas e o Reino Animalia, dos animais. Com exceção do Reino Monera, cujos componentes são procariotos, todos os seres pertencentes aos outros reinos são eucariotos (Whittaker & Margulis, 1978).

Uma característica comum a todas as espécies fúngicas é a reprodução através de estruturas assexuadas, denominadas conídios. Entretanto, alguns fungos também se reproduzem sexuadamente, e tais características, dentre outras, são utilizadas para distinguí-los taxonomicamente (Slots & Taubman, 1992). Tem havido, historicamente, dificuldade na classificação e taxonomia desses organismos, que já foram agrupados no mesmo reino das plantas (Oliveira, 1999). Atualmente as diferentes espécies de fungos são classificadas em filos distintos dentro do Reino Fungi: Zigomicetos; Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Os Deuteromicetos são também conhecidos como fungos imperfeitos, por não apresentarem reprodução sexuada conhecida, e ao qual pertencem quase todos os fungos patogênicos para humanos (Poulter, 1987).

Como são heterotróficos, incapazes de realizar a fotossíntese, os fungos retiram seus nutrientes através da secreção de enzimas, que têm por substrato a matéria orgânica do solo, plantas e animais, vivos ou mortos (Slots & Taubman, 1992). Assimilam, assim, o carbono de que necessitam pelo metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e álcoois, e o nitrogênio de compostos como sais de amônio, uréia e peptona, acumulando glicogênio como material de reserva. Os fungos são aeróbios em sua maioria, embora algumas espécies se desenvolvam também em anaerobiose; são importantes em variados setores da atividade humana, como a indústria química, farmacêutica e alimentícia, assim como em agricultura, fitopatologia, medicina veterinária e medicina humana (Oliveira, 1999).

O Reino Fungi abriga, então, uma grande diversidade de espécies; no entanto, poucas dessas espécies produzem doença em seres humanos. Embora alguns fungos sejam patógenos primários, ou seja, capazes de causar infecção mesmo na ausência de fatores predisponentes, há um segundo grupo, conhecido como oportunista, que manifesta seu potencial patogênico em hospedeiros debilitados. Neste último grupo estão incluídas as leveduras do gênero *Candida* (Haynes, 2001). As leveduras são fungos microscópicos, unicelulares, que se reproduzem por brotamento ou divisão binária (Oliveira, 1999).

As espécies de *Candida* estão incluídas na classe dos Deuteromicetos, sendo que diferentes espécies podem ser encontradas habitando ecossistemas distintos, como florestas, rios e solos; porém, algumas dessas espécies colonizam também seres humanos e animais (Höfling & Rosa, 1999). De modo semelhante aos demais fungos, as espécies de *Candida* são organismos eucariotos, não fotossintéticos, possuindo organelas citoplasmáticas, parede celular, e uma membrana plasmática rica em esteróis, usualmente o ergosterol (Akpan & Morgan, 2002). Esse gênero compreende mais de 150 espécies, que crescem bem em temperaturas variando entre 20°C a 38°C, e numa faixa de pH de 2,5 a 7,5 (Odds, 1988).

A cavidade bucal oferece uma variedade de nichos ecológicos à colonização microbiana, permitindo a sobrevivência de uma diversidade de bactérias, vírus e fungos (Socransky & Haffajee, 1994; Sweeney *et al.*, 1998; Jabra-Rizk *et al.*, 2001). As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da boca; entretanto, sob determinadas condições, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas (De Repentigny *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000). As infecções por *Candida* spp. são denominadas candidose ou candidíase, termos utilizados pela literatura como sinônimos (Hannula, 2000). Várias condições predisponentes estão associadas tanto à colonização assintomática quanto à manifestação clínica de candidose, incluindo desde deficiências imunes específicas (Fidel, 2002; Rodriguez-Galan *et al.*, 2002), até o uso de próteses totais (Pires *et al.* 2002; Davies *et al.*, 2002), além de desordens endócrinas, lesões de tecidos moles e medicamentos como antibióticos e corticosteróides (Moreira *et al.*, 2001), ou mesmo o tabagismo (Arendorf & Walker, 1980; Kamma *et al.* 1999; Willis *et al.* 1999).

Durante os eventos de colonização e infecção, um número de fatores de virulência é expresso pelas espécies de *Candida*, como por exemplo, a adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro, as alterações morfogênicas, e a secreção enzimática (Calderone & Fonzi, 2001). Muitas dessas espécies de *Candida* secretam hidrolases, incluindo proteinases e fosfolipases (Wu *et al.*, 1996; Ghannoum, 2000), e produzem metabólitos ácidos, como os ácidos carboxílicos, além de outras substâncias tóxicas (Hannula, 2000); tais produtos podem lesar e interromper as funções celulares. No entanto, nenhum fator em particular tem sido considerado o único responsável pela infecção, mas uma combinação de mecanismos de virulência, expressos sob determinadas circunstâncias, parece ser responsável pelo desenvolvimento de candidoses (Odds, 1994).

A candidose é considerada a infecção fúngica mais freqüente da cavidade bucal humana e *C. albicans* é a principal espécie relacionada, embora *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. Krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, além de outras espécies, também estejam se tornando comuns em certas populações (Haynes, 2001; Martinez *et al.*, 2002). Diferentes tipos de candidose orofaríngea têm sido relatados, incluindo as formas atrófica, pseudomembranosa aguda, candidose hiperplásica crônica, a glossite rombóide mediana e a queilite angular (Akpan & Morgan, 2002).

Além disso, de acordo com Haynes (2001), *C. albicans* é um dos agentes mais importantes de infecções hematológicas; no entanto, outras espécies do gênero também têm sido isoladas de pacientes com candidemia, e sua incidência tem aumentado, principalmente em imunocomprometidos ou em casos de terapia prolongada com antifúngicos. Entretanto, o aumento da detecção de espécies não-*albicans*, é um reflexo, provavelmente, não apenas da alteração ecológica na microbiota de determinadas populações, em si, mas também do interesse que essas leveduras, de um modo mais amplo, vêm despertando entre os microbiologistas. Para Calderone & Fonzi (2001), esse interesse deriva do fato de que, nos dias atuais, grande parte das infecções nosocomiais se deve a *Candida* spp., e naqueles pacientes que manifestam candidemia, por volta de 35% não sobrevivem.

Vários fatores têm contribuído para o aumento, nas últimas décadas, da incidência de infecções fúngicas oportunistas, e o mais relevante pode ser o crescimento

das populações de indivíduos gravemente enfermos e/ou de imunocomprometidos, que sobrevivem com os avanços da medicina - recém-nascidos de baixo peso, infecção pelo HIV, neutropenias induzidas por quimioterapia, transplantes de órgãos, queimaduras severas, procedimentos médicos invasivos, como cirurgias extensas ou cateteres vasculares, ou mesmo medicamentos como antibióticos ou corticosteróides (De Backer *et al.*, 2000; Groll *et al.*, 1998). Uma outra razão para a relevância das infecções provocadas por estes microrganismos é que, embora existam muitos compostos antifúngicos disponíveis no mercado, tais drogas têm limitações em sua utilização, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro, e também pela possibilidade de ocorrer a manifestação de resistência, por diferentes espécies e subespécies de *Candida* (Powderly *et al.*, 1993). Portanto, todos estes aspectos têm contribuído, conjuntamente, para aumentar o interesse no estudo desses microrganismos (De Backer *et al.*, 2000).

O principal tratamento para as infecções por *Candida* spp. consiste na quimioterapia tópica ou sistêmica. Para uso tópico, formulações de Nistatina, Clotrimazol e Miconazol são as mais freqüentemente prescritas. As infecções mais graves são tratadas pela administração sistêmica de Anfotericina B, Fluconazol e Cetoconazol, principalmente (Slots & Taubman, 1992). O anti-séptico gluconato de clorexidina também é utilizado, topicamente, no controle da colonização bucal, e ainda como parte da terapia de candidoses mucosas (Hannula, 2000; Epstein *et al.* 2003). O quadro 1 resume os tipos de candidose que se manifestam em seres humanos, segundo Slots & Taubman (1992).

Quadro 1. Sumário de infecções causadas por espécies de *Candida*

Candidoses cutâneas	Candidoses mucosas	Candidoses sistêmicas
Intertriginosas	Glossite	Urogenital
Perianal	Estomatite	Endocardite
Genital	Queilite	Meningite
Onicomicose	Balanite	Encefalite
Paroníquia	Vaginite	Septicemia
Granuloma	Bronquite	
	Esofagite	

Enterite

2.2. *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura encontrada comumente nas populações humanas, habitando a pele e as mucosas de diferentes sítios anatômicos, como a cavidade bucal, vagina e trato gastrointestinal, sendo capaz de residir em equilíbrio com a microbiota comensal de hospedeiros assintomáticos e imunocompetentes (Hannula, 2000). O *status* fisiológico do hospedeiro tem sido reconhecido, então, como a condição primária para a ocorrência de candidoses, mais do que a virulência intrínseca do microrganismo oportunista (Ollert *et al.*, 1995; Naglik *et al.*, 1999). Entretanto, apenas pequenas alterações nesse estado podem modificar o comportamento de *C. albicans*, que passa a manifestar seu potencial de virulência, e assim, de comensal inofensivo torna-se um patógeno agressivo (Hube & Naglik, 2001).

Esta espécie tem sido considerada, portanto, um agente infeccioso importante, principalmente pela capacidade de sobreviver, disseminada geograficamente, em estado de comensalismo, ou mesmo causando infecções em vários grupos populacionais humanos e em diferentes sítios anatômicos, cada qual com suas condições ambientais distintas (Schmid *et al.*, 1999; Calderone & Fonzi, 2001). Para estes autores, essa versatilidade faz com que o espectro de doenças causadas por *C. albicans* seja maior do que o de outras espécies microbianas oportunistas, capazes de colonizar apenas um ou poucos sítios do hospedeiro.

C. albicans é um microrganismo diplóide, de reprodução assexuada (Kretschmar *et al.* 1999), que pode ocorrer sob várias morfologias; por exemplo, pode germinar como estruturas filamentosas, denominadas hifas, ou então assumir uma forma celular arredondada ou ovalada, leveduriforme, denominada blastoconídio (Hannula, 2000). Acredita-se que a produção de hifas aumente o poder de aderência e de invasão tecidual, permitindo às leveduras o acesso a estruturas e órgãos na profundidade do corpo (Odds, 1994; Calderone & Fonzi, 2001). Portanto, as hifas têm sido geralmente consideradas formas mais virulentas, e que podem ocorrer em resposta a diversas alterações nas condições ambientais, como a temperatura e o pH (Lane & Garcia, 1991; Järvensivu *et al.*, 2004). Outras estruturas morfológicas observadas em *C. albicans* são as pseudo-hifas,

geradas durante sua reprodução por brotamento, na qual os brotos não se destacam da célula original, ocorrendo, então, um encadeamento de células, cuja forma lembra a de uma hifa, sendo denominadas, assim, de pseudo-hifas (Almeida & Scully, 2002). A propriedade que a levedura tem de alterar sua morfologia celular é conhecida como dimorfismo ou polimorfismo (Calderone & Fonzi, 2001). Tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* podem se apresentar ainda sob a forma de estruturas morfológicas denominadas clamidósporos (Nobile *et al.*, 2003). Os clamidósporos, ou clamidoconídios, são células grandes, com parede celular espessa, formadas a partir de uma hifa e, ocasionalmente, pseudo-hifa (Odds, 1988). São estruturas ricas em DNA e podem germinar sob algumas condições (Vidotto *et al.*, 1999). Segundo Montazeri & Hedrick (1984), a produção de clamidósporos pode ser induzida em meio pobre de nutrientes, num pH variando entre 5 e 6, e a uma temperatura entre 30 a 37 °C, pelas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, mas não pelas demais, e esta propriedade tem sido utilizada na caracterização das leveduras (Sandven, 1990).

Para colonizar as superfícies mucosas, *C. albicans* deve competir com a microbiota local pela aquisição de nutrientes, e adaptar-se às demais pressões seletivas ambientais, de modo a sobreviver em diferentes nichos ecológicos, que podem variar amplamente em relação a condições como a temperatura, disponibilidade de nutrientes, tensão de oxigênio e pH. Por exemplo, *C. albicans* pode sobreviver, através da expressão diferenciada de genes, em ambientes como a corrente sanguínea, cujo pH é neutro, assim como no canal vaginal, que possui pH ácido (Calderone & Fonzi, 2001). Esses fungos, embora aeróbios, podem também crescer em anaerobiose. Webster & Odds (1987), testando sete espécies de *Candida*, relataram que todas cresceram, em alguma proporção, em condições de anaerobiose; as espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata* demonstraram maior taxa de crescimento, seguidas por *C. albicans* e *C. krusei*, e o menor crescimento para *C. guilliermondi* e *C. parapsilosis*.

Assim, *C. albicans*, microrganismo eucarioto, possui um grande genoma e, portanto, grandes recursos adaptativos; mesmo altamente capacitado a colonizar o hospedeiro humano como comensal, este fungo tem um considerável potencial patogênico, podendo resistir aos mecanismos de defesa e causar infecções oportunistas (Lane & Garcia, 1991; Mata *et al.*, 2000; Hube & Naglik, 2001).

2.3. *Candida dubliniensis*

Candida dubliniensis é outra espécie do gênero *Candida* descrita primeiramente por Sullivan *et al.*, em 1995. Embora fenotipicamente similar (forma clamidósporos e produz tubo germinativo), no entanto é geneticamente distinta de *C. albicans* (Mariano *et al.*, 2003). Hannula *et al.* (2000), comparando isolados bucais de *C. albicans* e *C. dubliniensis* quanto aos fatores de virulência, relataram que os isolados de *C. dubliniensis* demonstraram maior frequência de alterações fenotípicas, mas significativamente menor produção de proteinases e fosfolipases do que os isolados de *C. albicans*. Para estes autores *C. dubliniensis* é capaz de aderir fortemente às células do epitélio mucoso, e parece estar bem adaptada ao meio-ambiente bucal. Segundo Perea *et al.* (2002), *C. dubliniensis* é isolada, mais frequentemente, associada a *C. albicans* e/ou outras espécies do gênero.

C. dubliniensis tem sido isolada, na grande maioria dos casos, da mucosa bucal de adultos e crianças infectados pelo HIV, implicada na etiologia da candidose orofaríngea (Milan *et al.*, 2001; Perea *et al.*, 2002; Giammanco *et al.*, 2002; Martinez *et al.*; 2002). Jabra-Rizk *et al.* (2001) reportaram o isolamento desta espécie também em bolsas periodontais de pacientes HIV-positivos, e indicam a necessidade de mais estudos para esclarecer o papel de *C. dubliniensis* na patogênese das doenças periodontais. Há relatos também de colonização bucal assintomática (Hannula *et al.*, 1997; Al-Karaawi *et al.*, 2002), assim como de candidoses em HIV-negativos (Coleman *et al.*, 1997). Hannula *et al.* (2000) encontraram 26 cepas de *C. dubliniensis* em pacientes sem história de comprometimento imune, que procuravam atendimento odontológico de rotina. Esta espécie também foi identificada por Montour *et al.* (2003), em dois de 39 indivíduos saudáveis, de uma comunidade aborígine no Canadá. Willis *et al.* (2000), avaliando a ocorrência de espécies de *Candida* em pacientes com diabetes melito, relataram, pela primeira vez, segundo os autores, o isolamento de *C. dubliniensis* em pacientes diabéticos. No entanto, Tekeli *et al.* (2004), não encontraram nenhum isolado de *C. dubliniensis* em um estudo realizado pacientes portadores de diabetes melito insulino-dependente.

Tem sido observado que, na cavidade bucal de indivíduos HIV-positivos, ocorre um aumento da proporção de *C. dubliniensis* em relação a *C. albicans*. Martinez *et al.* (2002) relataram uma substituição das cepas de *C. albicans*, sensíveis ao fluconazol, por

cepas de *C. dubliniensis*, em pacientes HIV-positivos. Estes autores observaram que, embora a maioria dos isolados de *C. dubliniensis* seja susceptível ao fluconazol, a resistência a este antifúngico já foi induzida, *in vitro*. Assim, o uso de fluconazol em pacientes HIV-positivos poderia aumentar a proporção de *C. dubliniensis*, devido ao impacto desse medicamento sobre a ecologia das espécies bucais de leveduras. Para Donnelly *et al.* (1999), são necessários estudos mais aprofundados, para determinar a prevalência desta espécie na cavidade bucal de HIV-positivos e de sua associação com infecções em outras partes do corpo que não a cavidade bucal.

Além deste sítio, *C. dubliniensis* tem sido isolada ainda do trato respiratório, vagina e trato gastrointestinal, e também de urina, escarro e feridas, estando implicada em infecções invasivas, mesmo em HIV-negativos, quando acometidos por doenças graves (Sullivan & Coleman, 1998; Jankittivong *et al.*, 1998; Fotedar & Al Hedaithy, 2004). *C. dubliniensis* é capaz de colonizar, portanto, vários sítios do corpo, sendo encontrada em diferentes populações e localidades geográficas; esta distribuição global, para Montour *et al.* (2003), poderia ser conseqüência das recentes correntes migratórias populacionais, que ocorreram principalmente durante o último século. No entanto, segundo Sullivan *et al.* (1997) e Mariano *et al.* (2003), provavelmente *C. dubliniensis* sempre esteve presente como parte da microbiota das comunidades humanas, como um constituinte significativo da microbiota residente, com potencial para causar infecção, e tenha sido erroneamente identificada como *C. albicans*.

Nos anos posteriores ao primeiro relato da identificação de *C. dubliniensis*, laboratórios de vários países e localidades, incluindo Europa, América do Norte, Oriente Médio e Austrália também relataram seu isolamento (Sullivan & Coleman, 1998; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Polacheck *et al.*, 2000; Lefler *et al.*, 2001). Giammanco *et al.* (2002) identificaram *C. dubliniensis* em 5 de 45 indivíduos HIV-positivos, na Itália, e observaram que a maioria dos isolados identificados até então, eram provenientes principalmente da Europa Ocidental e América do Norte. Há poucos estudos epidemiológicos sobre a ocorrência desta espécie na América do Sul. Sullivan *et al.* (1997), e Rodero *et al.* (1998), isolaram *C. dubliniensis* em lesões de candidose bucal de HIV-positivos, na Argentina; Silva *et al.* (2003), reportaram, no Chile, o isolamento de uma cepa

de *C. dubliniensis*, em uma criança com candidemia. Milan *et al.* (2001) analisaram, no Brasil, 108 pacientes infectados pelo HIV, provenientes de centros de tratamento da AIDS, para determinar a prevalência de *C. dubliniensis* nessa população. Esses pesquisadores relataram que quatro, de um total de 155 isolados, pertenciam à espécie *C. dubliniensis*. Alves *et al.* (2001) também relataram o isolamento de *C. dubliniensis* na cavidade bucal de HIV-positivos, no estado do Rio Grande do Sul. Mariano *et al.* (2003) identificaram 11 isolados de *C. dubliniensis*, entre 548 isolados de leveduras previamente identificados como *C. albicans*, que permaneciam estocados no Laboratório de Micologia da Universidade Federal de São Paulo, no período de 1994 a 2000. A maioria desses isolados era proveniente da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos, e demonstraram ser sensíveis aos anti-fúngicos azóis e à anfotericina B. Recentemente, Portela *et al.* (2004), na cidade do Rio de Janeiro, RJ, isolaram *C. dubliniensis* em sítios subgengivais de crianças infectadas pelo HIV.

2.4. Colonização da Cavidade Bucal por *Candida* spp.

Como são altamente prevalentes em populações saudáveis e assintomáticas, o isolamento de *Candida* spp. da cavidade bucal não implica, necessariamente, na ocorrência de infecções (Samaranayake & Samaranayake, 2001). Diversos estudos reportam que, aproximadamente, metade da população adulta saudável abriga essas leveduras nas mucosa bucais (Arendorf & Walker, 1980; Lynch *et al.*, 1994; Darwazeh & Al-Bashir, 1995; Abu-Elteen E Abu-Alteen, 1998). Entretanto, uma prevalência muito variável entre os diferentes grupos populacionais tem sido encontrada (Hannula *et al.*, 1999; Samaranayake & Samaranayake, 2001). Isso pode ser devido, principalmente, à dificuldade de padronização dos fatores que influenciam a colonização, em populações heterogêneas, como uma dieta rica em açúcares (Pizzo *et al.*, 2000) ou a presença de cavidades de cárie (Starr *et al.*, 2002); além disso, os hábitos de higiene bucal (Darwazeh & Al-Bashir, 1995), o uso de próteses totais (Pires *et al.*, 2002), o fluxo e pH da saliva (Spolidorio *et al.*, 2001), além de variáveis como os diferentes meios de cultura e métodos de amostragem de cada estudo, são condições capazes de influenciar a prevalência ou a detecção destes microrganismos (Davies *et al.*, 2002; Al-Karaawi *et al.*, 2002).

Em relação às faixas etárias, a ocorrência de *Candida* spp. foi demonstrada em populações de crianças saudáveis (Mattos-Graner *et al.*, 2001; Starr *et al.*, 2002) bem como em recém-nascidos (Russel & Lay, 1973). Outros estudos, porém, observam que a colonização em indivíduos idosos pode ser maior que em faixas etárias mais jovens (Kleinegger *et al.*, 1996; Lockhart *et al.*, 1999). Parece possível, no entanto, que o aumento da colonização em idosos ocorra secundariamente a alterações no meio-ambiente bucal (Odds, 1988).

A literatura relata resultados controversos, em relação à colonização quanto aos gêneros masculino e feminino. Campisi *et al.* (2002), analisando a colonização assintomática da mucosa bucal em indivíduos HIV-positivos não observaram nenhuma diferença em relação ao gênero. Os mesmos resultados foram observados por Willis *et al.*, (2000), em pacientes com diabetes melito insulino-dependentes, e por Torres *et al.* (2003), em pacientes com xerostomia. No entanto, alguns autores encontraram que a colonização bucal por *Candida* é maior em mulheres (Masipa *et al.*, 1992; Campisi *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2002), enquanto outros encontraram maior prevalência em homens (Oliver & Shillitoe, 1984; Moalic *et al.*, 2001).

Vários grupos populacionais distintos podem apresentar níveis de colonização bucal por leveduras maiores que a média da população geral, enquadrando-se nas denominadas populações de risco (Davies *et al.*, 2002). Assim, estudos reportam maior prevalência de espécies de *Candida* em pacientes portadores da síndrome de Sjögren (Almstahl *et al.*, 1999) e da síndrome de Down (Carlstedt *et al.*, 1996); em indivíduos com hipofunção das glândulas salivares, diminuição do fluxo ou do pH salivar (Spolidorio *et al.*, 2001; Al-Karaawi *et al.*, 2002) e diabetes melito (Vargas & Joly, 2002). Embora haja relatos de resultados controversos (Oliver & Shillitoe, 1984; Kindelan *et al.*, 1998), tais condições parecem alterar o meio-ambiente bucal, e favorecer a colonização por essas e outras espécies de patógenos oportunistas.

No entanto, a ocorrência desses fungos tem sido relatada principalmente em HIV-positivos, sendo até mesmo maior do que em outras populações de risco (Campisi *et al.*, 2002; Barchiesi *et al.*, 2002). Para Vargas & Joly (2002), o aumento da proporção dessas espécies sugere que a deficiente resposta imune, associada à progressão da infecção

viral, em indivíduos infectados pelo HIV, poderia ser um fator preditivo para o desenvolvimento de candidoses. A ocorrência de leveduras é também comum em pacientes com câncer em estágio avançado (Davies *et al.*, 2002), e a candidose bucal é considerada uma condição clínica grave entre esses pacientes; desse modo, estudos epidemiológicos sobre a distribuição e o potencial de virulência dessas leveduras, em diferentes grupos populacionais, abordando os fatores de risco associados à infecção, são importantes no desenvolvimento de estratégias para o controle e prevenção de infecções clinicamente importantes (Lockhart *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2000; Ghannoum, 2000; Davies *et al.*, 2002; Rodriguez-Galan *et al.*, 2002; Kam & Xu, 2002).

Essas leveduras são encontradas, assim, colonizando diferentes sítios da cavidade bucal, como língua, palato, tonsilas e mucosa dos lábios e bochechas (Arendorf & Walker, 1980; Hägewald *et al.*, 2002); em lesões de cárie (Starr *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2003); em canais radiculares (Molander *et al.*, 1998; Siqueira & Rôças, 2004) e, também, em lesões de periodontite, fazendo parte do biofilme subgingival (Slots *et al.*, 1988; Rams *et al.*, 1997; Reynaud *et al.*, 2001).

As cavidades de cárie podem ser um reservatório importante dessas espécies (Starr *et al.*, 2002; Hossain *et al.*, 2003). Hossain *et al.* (2003) observaram uma semelhança significativa entre as cepas de *C. albicans* que colonizavam a cavidade bucal e o trato gastrointestinal de crianças com lesões de cárie severas, e propõem que tais lesões sirvam como nichos ecológicos para a liberação de células planctônicas de *C. albicans* para sítios distantes da boca, podendo, ocasionalmente, causar infecções em órgãos vitais como pulmões, estômago e intestino. Os autores recomendam o tratamento odontológico e uma adequada higiene bucal como medidas preventivas indispensáveis, especialmente em populações de risco. Estes fungos também já foram observados infectando canais radiculares, muitas vezes associados com a resistência à terapia endodôntica (Molander *et al.*, 1998). Siqueira & Rôças (2004) encontraram *C. albicans*, associada a espécies bacterianas, em dentes com lesões peri-radulares persistentes. Para tais autores, a resistência aos medicamentos dispensados intra-canal, e a capacidade de colonizar a dentina e invadir túbulos dentinários podem explicar a presença dessa levedura nas infecções endodônticas persistentes.

Outro fator que pode favorecer a colonização da cavidade bucal é o uso de próteses dentais removíveis (Abu-Elteen & Abu-Alteen, 1998; Pires *et al.*, 2002). Abu-Elteen & Abu-Alteen (1998), num estudo comparativo entre usuários de próteses totais e indivíduos dentados, relataram que os sítios de maior prevalência e mais densamente colonizados por *C. albicans* foram, para os indivíduos dentados, a língua, palato e mucosa jugal, enquanto nos portadores de próteses, as superfícies protéticas superiores e inferiores. Nikawa *et al.* (1998) relatam que a microbiota entre a estrutura de acrílico das próteses totais e a mucosa do palato possui uma composição semelhante ao biofilme dental, exceto pela maior proporção de espécies de *Candida*, fato este relacionado ao desenvolvimento de candidoses na mucosa do palato. A substituição das próteses insatisfatórias e uma melhor higiene bucal podem acelerar a resolução dessa infecção que, segundo Pires *et al.* (2002), está frequentemente associada a altos níveis salivares de *Candida*, e à higiene deficiente das próteses. Entretanto, outros estudos não encontraram relação entre o uso de próteses, totais ou parciais, e o aumento da ocorrência ou da proporção desses fungos na mucosa bucal (Al-Karaawi *et al.*, 2002).

Desse modo, a partir de observações sobre a variação individual e populacional na prevalência de *Candida* spp. e do fato de que nem todos os indivíduos abrigam essas leveduras na boca, Kleinegger *et al.* (1996) concluíram que, possivelmente, um número de barreiras naturais existentes nas superfícies mucosas e nos fluidos orgânicos, impediria a colonização nos indivíduos não portadores. Estas barreiras seriam mais ou menos eficazes na dependência de fatores relacionados à idade, gênero, tabagismo, dieta, medicamentos, condições sistêmicas e estado imune do hospedeiro, dentre outros (Höfling *et al.*, 2004).

2.5. Fatores Moduladores da Colonização

A cavidade bucal possui muitos fatores locais de defesa contra a colonização microbiana; dentre eles incluem-se a barreira epitelial e o fluxo salivar, assim como várias substâncias antimicrobianas presentes na saliva (Nikawa *et al.*, 1993). A saliva auxilia na manutenção da saúde bucal também pela capacidade tampão e pela lubrificação das mucosas, de modo que alterações qualitativas e quantitativas da saliva inevitavelmente afetam a fisiologia, os mecanismos de defesa e a ecologia microbiana da boca (Leung *et al.*,

2000). Por exemplo, a lactoferrina e a lisozima são duas proteínas da resposta inata, presentes na saliva, que demonstraram exercer um efeito anti-fúngico, modulando a implantação de espécies de *Candida* na cavidade bucal (Xu Y *et al.*, 1999; Samaranayake *et al.*, 2001). Segundo Nikawa *et al.* (1993), *C. krusei* mostrou-se mais sensível que *C. albicans* à ação antifúngica da lactoferrina, e tal variação pode estar relacionada às diferenças tanto na prevalência quanto na proporção do isolamento dessas duas espécies. Outras proteínas importantes da saliva humana, com ação citotóxica sobre bactérias e fungos, são as histatinas (Lin *et al.*, 2001), estaterinas (Johanson *et al.*, 2000), lactoperoxidasas (Edgerton & Koshlukova, 2000), e as calprotectinas (Kleinegger *et al.*, 2001). Jainkittivong *et al.* (1998) relataram que a sobrevivência de leveduras poderia ser influenciada pela concentração e secreção de histatina na saliva. Segundo Lin *et al.* (2001), quando há um decréscimo da concentração das histatinas salivares e/ou uma disfunção dessas proteínas, as candidoses tendem a se manifestar; indivíduos infectados pelo HIV, que demonstram uma redução do fluxo salivar e da atividade anti-*Candida* da saliva, são frequentemente acometidos por candidoses orofaríngeas. Para esses autores, a saliva possui mucinas contendo agregados de IgA, histatina, lactoferrina e lisozima, que permanecem concentradas sobre as superfícies mucosas, exercendo um efeito antimicrobiano.

As células epiteliais da mucosa bucal desempenham também um papel ativo nas funções defensivas do hospedeiro contra a candidose, pela capacidade de secretar uma variedade de citocinas e peptídeos com propriedades antifúngicas (Steele & Fidel, 2002; Dongari-Bagtzoglou & Kashleva, 2003). Tais substâncias, secretadas em proporções variáveis entre os indivíduos, podem desempenhar um papel protetor na cavidade bucal (Jurevic *et al.*, 2003). Acredita-se, portanto, que as células epiteliais viáveis impeçam a superproliferação microbiana, e os relativamente poucos organismos remanescentes são identificados como colonização assintomática (Steele *et al.*, 2001).

As superfícies mucosas da boca parecem ser o reservatório principal dessas leveduras. De acordo com O'Sullivan *et al.* (2000), as superfícies bucais são recobertas por proteínas salivares que podem servir de receptores, permitindo a adesão de *C. albicans* a essas superfícies. No entanto, tais microrganismos também podem ser encontrados no biofilme dental, coagregados a espécies bacterianas aí presentes ou aderidos diretamente à

película salivar adquirida (Arendorf & Walker, 1980; Nikawa. *et al.*, 1998). Como na maioria dos processos infecciosos, a adesão aos tecidos do hospedeiro é o primeiro passo para a colonização (Jabra-Rizk *et al.*, 2001). Portanto, para colonizar o meio ambiente bucal, as leveduras devem, inicialmente, aderir às células do epitélio mucoso, aos aparatos protéticos, ou coagregar com a microbiota residente do biofilme dental. Esses eventos são críticos também para o desenvolvimento de candidoses, pois precedem a invasão tecidual, podendo ainda ser uma via para infecções disseminadas (Ramage *et al.*, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Holmes *et al.* 2002).

A coagregação intergenérica, frequentemente observada entre os microrganismos, favorece, desse modo, a colonização da cavidade bucal por *Candida* spp., principalmente por *C. albicans* (Grimaudo *et al.*, 1996). Para Holmes *et al.* (1996) e O'Sullivan *et al.* (2000), *C. albicans* é capaz de ligar-se a diversas espécies de estreptococos, como *S. oralis*, *S. sanguinis* e, particularmente, *S. gordonii*, através do reconhecimento de receptores polissacarídeos na superfície celular bacteriana. Coagregações intergenéricas têm sido observadas também entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* a espécies de *Fusobacterium*. *F. nucleatum*, por exemplo, é um bacilo anaeróbio gram-negativo frequentemente isolado do biofilme subgingival e de lesões periodontais, desempenhando um papel importante na colonização da cavidade bucal, pela capacidade de adesão a células humanas e a muitos outros microrganismos, como as leveduras (Jabra-Rizk *et al.*, 2001). Grimaudo & Nesbitt (1997) analisaram a capacidade de agregação, *in vitro*, de cepas bucais de *Fusobacterium* a *C. albicans*. Todas as cepas de *F. nucleatum*, *F. periodontium* e *F. sulci* agregaram-se, em graus variados, a todas as cepas de *Candida* testadas.

A formação de biofilmes tem sido considerada, então, uma importante estratégia microbiana para a sobrevivência e proliferação no ambiente bucal. A complexa estrutura de um biofilme permite a organização das populações de microrganismos de modo a oferecer proteção contra os mecanismos de remoção pela saliva e dificultar a ação de agentes antimicrobianos (Kirkpatrick *et al.*, 2000). Acredita-se que a maioria das manifestações de candidose esteja associada à formação de biofilmes, e o reconhecimento de tais características pode auxiliar na elaboração de estratégias terapêuticas para essas

infecções (O' Sullivan *et al.*, 2000; Kirkpatrick *et al.*, 2000; Ramage *et al.*, 2001). Para estes autores, os biofilmes formados por *C. albicans* e por *C. dubliniensis* possuem vários aspectos em comum com os biofilmes bacterianos, incluindo a heterogeneidade estrutural e a diminuição da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos; quando maduros, consistem de uma mistura de células leveduriformes e filamentosas embebidas numa matriz de exopolímeros, que serve como um reservatório para a liberação de organismos infectantes na cavidade bucal. Isso pode permitir a sobrevivência das leveduras em seus nichos ecológicos, tanto como comensais, quanto durante os episódios infecciosos, o que, para Ramage *et al.* (2001), traz importantes repercussões clínicas, no tratamento e prevenção de candidoses.

Desse modo, para muitos pesquisadores, os biofilmes contendo leveduras, principalmente *C. albicans*, poderiam estar implicados não apenas nas candidoses mucosas, mas também no desenvolvimento de cáries (Nikawa *et al.*, 1998; Starr *et al.*, 2002), e na patogênese das doenças periodontais (Kamma *et al.*, 1999; Ryder, 2000; Hannula *et al.*, 2001; Järvensivu *et al.*, 2004).

2.6. Doenças Periodontais

As doenças periodontais são afecções que acometem os tecidos de proteção e suporte dos dentes, em que os microrganismos do biofilme subgingival, aderido à superfície radicular adjacente à bolsa periodontal, induzem uma variedade de respostas imunes defensivas, no hospedeiro, na tentativa de conter a infecção (Järvensivu *et al.*, 2004; Alpagot *et al.*, 2004). Como resultado da ativação de mecanismos inflamatórios, contra a agressão dos patógenos, ocorre a inflamação dos tecidos gengivais, e a destruição ligamento periodontal e do osso alveolar de suporte, podendo levar à perda do dente afetado (Chen *et al.*, 2000).

Contudo, acredita-se que a maioria dos microrganismos encontrada no biofilme subgingival seja comensal, ou seja, ocorra também em indivíduos com periodonto saudável, em equilíbrio com o hospedeiro; uma menor proporção desses microrganismos consistiria de patógenos potenciais (Järvensivu *et al.*, 2004). Desse modo, os episódios de doença podem ser resultantes de alterações ecológicas, devidas, por exemplo, a deficiências

na capacidade de defesa do hospedeiro frente a alterações qualitativas e/ou quantitativas da microbiota subgingival (Kornman *et al.*, 1997; Lamont & Jenkinson, 1998; Alves, 2003).

Segundo Lindhe (1999), embora as doenças periodontais compartilhem alguns aspectos com as demais doenças infecciosas, elas possuem também aspectos peculiares, principalmente devido à característica anatômica própria da cavidade bucal, onde uma estrutura mineralizada - o dente - atravessa os tecidos epitelial e conjuntivo, de modo que a coroa fica susceptível à colonização pelos microrganismos do meio-ambiente bucal, enquanto a raiz permanece no interior do tecido conjuntivo. Ocorre então uma condição na qual os microrganismos do biofilme dental permanecem ancorados na superfície do dente, em contato íntimo com os tecidos periodontais, durante períodos relativamente longos de tempo, o que pode produzir infecção, inflamação crônica e destruição tecidual.

As doenças periodontais podem ser classificadas, de uma maneira geral, como gengivites ou periodontites (Newman *et al.*, 2004). A gengivite é uma infecção associada ao biofilme dental, caracterizada pela ocorrência de fenômenos inflamatórios reversíveis e limitados aos tecidos gengivais, não atingindo, nesse estágio, os tecidos periodontais de suporte. Ocorrem sinais clínicos de inflamação, como vermelhidão, inchaço, sangramento e perda da arquitetura e do contorno normal da gengiva (Lindhe, 1999). A periodontite é definida também como uma doença inflamatória, mas que envolve os tecidos de suporte dental, provocando a reabsorção irreversível do osso alveolar e das fibras colágenas do ligamento periodontal. Para Newman *et al.* (2004), tanto a progressão quanto a severidade das periodontites são influenciadas por condições de origem local ou sistêmica, ou ambas. Os fatores locais geralmente estão associados ao acúmulo microbiano na superfície dos dentes, favorecido pela má-higiene bucal, presença de cáries, ou mesmo próteses e restaurações insatisfatórias; os fatores sistêmicos são as alterações no estado fisiológico do hospedeiro, que podem exacerbar e agravar o quadro infeccioso periodontal, como distúrbios hormonais, terapias imunossupressoras ou anticonvulsivantes, má-nutrição, desordens metabólicas, e, especialmente, a infecção pelo HIV.

Do ponto de vista microbiológico, as periodontites estão associadas a uma microbiota complexa, em que aproximadamente 500 espécies bacterianas já foram encontradas colonizando as bolsas periodontais (Van Winkelhoff *et al.*, 1996); ocorre uma

grande preponderância de bactérias anaeróbias gram-negativas, como, dentre outras, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythensis* (Hannula *et al.*, 2001; Alves, 2003). No entanto, outros microrganismos como Entamoebas e Tricomonas (Slots & Taubman, 1992); bacilos entéricos e *Pseudomonas* (Slots *et al.*, 1988); vírus como o Epstein-Barr - EBV - (Idezawa *et al.*, 2004); Citomegalovírus Humano - HCMV - (Slots, 2004) e o vírus do Herpes Simples tipo 1 - HSV - (Saygun *et al.*, 2004), bem como leveduras do gênero *Candida* (Rams *et al.*, 1997), também estão sendo pesquisados atualmente, com o objetivo de esclarecer seu papel na etiopatogenia da doença periodontal.

2.7. *Candida* spp. e Doenças Periodontais

Pelo fato de possuir vários fatores de virulência relevantes na patogênese da doença periodontal, tais como a capacidade de aderir ao epitélio e de invadir o tecido conjuntivo gengival (Järvensivu *et al.*, 2004), de inibir a função de neutrófilos polimorfonucleares (Maccarinelli *et al.*, 2001), bem como de produzir enzimas como colagenases e proteinases, capazes de degradar imunoglobulinas (Hägeward *et al.*, 2002), as espécies de *Candida* poderiam agir como patógenos importantes em algumas formas de periodontite (Reynaud *et al.*, 2001). Tem sido sugerido que os microrganismos podem adquirir uma vantagem seletiva na colonização das superfícies bucais, se forem capazes de inibir a imunidade das mucosas pela degradação proteolítica da IgA (Hägeward *et al.*, 2002). Para esses autores, é provável que a proteólise dessa imunoglobulina facilite a penetração e a disseminação de substâncias potencialmente tóxicas e/ou de antígenos liberados pela microbiota subgengival. Tais processos podem desempenhar um papel importante na perpetuação das alterações inflamatórias associadas com as doenças periodontais destrutivas.

C. albicans foi detectada, em várias análises microbiológicas, infectando bolsas periodontais (Dahlen & Wikstrom, 1995; Reynaud *et al.*, 2001; Hannula *et al.*, 2001). De acordo com Hannula *et al.* (2001), as doenças periodontais são causadas, principalmente, por bactérias anaeróbias gram-negativas, mas que, aproximadamente, 20% dos pacientes adultos, com periodontite, também abrigam leveduras subgengivais, a maioria das quais

pertencente à espécie *Candida albicans*. Tais autores avaliaram a existência de uma possível correlação entre o isolamento subgingival de *C. albicans* e a ocorrência de determinadas espécies periodontopatogênicas, e observaram que *P. gingivalis* foi menos frequentemente isolada em amostras positivas para *C. albicans*, enquanto que, ao contrário, a proporção média de *A. actinomycetemcomitans*, em relação à microbiota total, era maior nos indivíduos positivos do que naqueles em que tais leveduras não foram encontradas nas bolsas periodontais. Para esses autores, são necessários estudos adicionais para verificar se outras bactérias subgingivais podem favorecer a colonização e a persistência subgingival desses fungos. Ainda segundo Hannula *et al.* (2001), não é conhecido se, e em que proporção, as espécies de *Candida* participam da patogênese da periodontite, ou se as leveduras subgingivais são apenas comensais inofensivos, que ocorrem nas bolsas periodontais apenas como resultado da difusão para o espaço subgingival, em casos de colonização assintomática ou de candidose na mucosa bucal. Para Yuan *et al.* (2001), as bolsas periodontais que abrigam *C. albicans* podem representar um importante reservatório desses fungos, favorecendo a ocorrência de candidose bucal. Estes pesquisadores analisaram a microbiota subgingival de indivíduos com doença periodontal, em pacientes portadores de diabetes melito não-insulino-dependentes e de controles não-diabéticos, para a detecção de cinco espécies patogênicas: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola* e *C. albicans*, e observaram que estas espécies ocorreram mais frequentemente em sítios doentes do que em sítios saudáveis, em ambos os grupos; para os autores, mais estudos são necessários para determinar a relevância de *C. albicans* no desenvolvimento de periodontites em pacientes com diabetes melito.

Em um estudo recente, Järvensivu *et al.* (2004) investigaram a ocorrência e a extensão da penetração de *C. albicans* nos tecidos periodontais de pacientes com periodontite crônica, em espécimes de tecido conjuntivo gengival, coletados durante cirurgias periodontais a retalho. Esses espécimes foram examinados por imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos para *C. albicans*, e foi observada a presença de hifas penetrando no tecido conjuntivo periodontal. Os autores sugerem que alterações ambientais podem favorecer a germinação de hifas, que possuem maior capacidade de aderir e penetrar nos tecidos do hospedeiro, e que as bolsas periodontais e o

fluido crevicular formam um ambiente favorável para a germinação dessas estruturas morfológicas. Para estes pesquisadores, *C. albicans* poderia desempenhar um papel na infra-estrutura do biofilme subgengival, e em sua adesão aos tecidos periodontais, visto que são mais resistentes aos mecanismos imunes do que a maioria dos demais microrganismos. Neste estudo *C. albicans* foi encontrada, tipicamente, nas camadas mais externas do biofilme, e pareceu agir, segundo os autores, como uma barreira que protegia os microrganismos das camadas mais internas da ação dos mecanismos imunes, auxiliando a resistência da microbiota subgengival frente às defesas do hospedeiro, e contribuindo para a persistência da inflamação nos tecidos adjacentes. Os pacientes desse estudo eram imunocompetentes e não haviam recebido medicação local ou sistêmica previamente às cirurgias periodontais; os autores consideraram, então, surpreendente que as leveduras tenham sido encontradas invadindo tecidos. Esse fato foi explicado como devido, ou à patogenicidade intrínseca de *C. albicans* ou à imunossupressão local causada pela doença periodontal severa. No entanto, além das hifas, células leveduriformes de *C. albicans* também foram encontradas invadindo o tecido conjuntivo gengival de lesões de periodontite juvenil, por González *et al.* (1987). Também para estes pesquisadores, mais estudos são necessários para esclarecer o papel desempenhado por *C. albicans* na patogênese da doença periodontal.

Assim, o isolamento subgengival de *Candida* tem sido reportado por muitos autores, em diferentes manifestações de doença periodontal, como por exemplo, em casos de periodontite agressiva (González *et al.*, 1987; Fiehn & Westergaard, 1990; Hägewald *et al.*, 2002) e periodontite crônica (Rams & Slots, 1991); de sítios refratários à terapia periodontal (Slots *et al.*, 1990; Rams *et al.*, 1990; Listgarten *et al.*, 1993; Helovuo *et al.*, 1993; Olsvik *et al.*, 1995; Rams *et al.*, 1996; Edwardsson *et al.*, 1999), bem como em bolsas periodontais de fumantes (Kamma *et al.*, 1999), de indivíduos diabéticos (Yuan *et al.*, 2001), de mielossuprimidos (Peterson *et al.*, 1987) e, ainda, em lesões de peri-implantite (Leonhardt *et al.*, 1999). Estes autores, estudando a microbiota de lesões de peri-implantite, relataram o isolamento de microrganismos não associados primariamente com as doenças periodontais, como *Staphylococcus* spp., microrganismos entéricos e *Candida* spp., em 55% das lesões de peri-implantite, ou seja, em proporção semelhante aos

patógenos periodontais reconhecidos, como *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans*. Os autores observam que um diagnóstico microbiológico deveria servir de guia para a escolha de uma terapia antimicrobiana em pacientes com peri-implantite.

Entretanto, a maioria dos relatos sobre o isolamento subgingival de espécies de *Candida* está associada à enfermidade periodontal em pacientes HIV-positivos (Zambon *et al.*, 1990; Rams *et al.*, 1991; Moore *et al.*, 1993; Odden *et al.*, 1994; Chattin *et al.*, 1999; Velegraki *et al.*, 1999; Ryder, 2000; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002). Odden *et al.* (1994), analisando biópsias de tecido gengival de 27 indivíduos HIV-positivos, com diagnóstico de gengivite ou periodontite, comparados a 16 controles HIV-negativos, observou a penetração de hifas e de pseudo-hifas de *C. albicans* no tecido gengival, apenas nos indivíduos infectados pelo HIV. A invasão tecidual por *Candida* spp. foi significativamente mais freqüente em pacientes com história de doença periodontal destrutiva do que naqueles sem episódios dessa doença. A principal alteração histopatológica foi uma infiltração do epitélio gengival por neutrófilos polimorfonucleares, sugerindo que *Candida albicans* pode contribuir para o desenvolvimento de doenças periodontais em pacientes infectados pelo HIV. Tais pacientes algumas vezes manifestam determinados tipos de periodontite de evolução rápida, caracterizada por ulceração e necrose do tecido gengival, destruição e exposição do osso alveolar subjacente, com sangramento espontâneo e dor severa; essas doenças são denominadas gengivites ou periodontites ulcerativas necrosantes, conforme atinjam os tecidos gengivais e periodontais, respectivamente (Newman *et al.*, 2004). Uma outra manifestação clínica, denominada "gengivite-HIV", é caracterizada por um intenso eritema linear na margem gengival. Tais formas de doença periodontal têm sido freqüentemente associadas à infecção por espécies de *Candida*, e têm sido observadas tanto em adultos como em crianças, como uma importante manifestação da AIDS na cavidade bucal (Odds *et al.*, 1994; Velegraki *et al.*, 1999; Chattin *et al.*, 1999; Holmstrup, 1999; Portela *et al.*, 2004). Desse modo, para Ryder (2000), os profissionais da área odontológica devem compreender que as infecções periodontais em pacientes HIV-positivos podem estar associadas também à colonização dos

tecidos periodontais por patógenos oportunistas, sendo *Candida* spp. um dos mais importantes.

Outro aspecto abordado pela literatura, de interesse principalmente na manifestação de doenças periodontais em pacientes enfermos e/ou imunocomprometidos, é que a microbiota subgingival como um todo, que infecta as bolsas periodontais, também tem sido associada com a manifestação de enfermidades de ordem geral (Garcia *et al.*, 2001; Raber-Durlacher *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003). Alguns pesquisadores têm considerado que as periodontites podem constituir um fator de risco para determinadas enfermidades tais como, dentre outras, doenças respiratórias (Scannapieco, 1999); diabetes melito (Grossi & Genco, 1998); doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Morrison *et al.*, 1999; Hayrinen-Immonen *et al.*, 2000), como resultado da disseminação de patógenos periodontais e/ou mediadores inflamatórios na corrente circulatória, afetando adversamente o estado geral de saúde do indivíduo. Entretanto, outros autores não puderam comprovar essa relação (Hujoel *et al.*, 2000; Mattila *et al.*, 2000) e muitas questões a esse respeito ainda permanecem sem resposta definitiva. Para Garcia *et al.* (2001), se essas hipóteses forem comprovadas, os objetivos tradicionais do tratamento periodontal podem ser alterados, e incluir, além da prevenção da perda de suporte dental, a melhoria das condições gerais de saúde da população.

Raber-Durlacher *et al.* (2002), numa revisão da literatura, abordaram a patogênese das doenças periodontais e a possibilidade de veiculação sistêmica de microrganismos subgingivais, em pacientes com câncer tratados com quimioterapia. Estes autores relataram que as infecções bucais são problemas significativos, principalmente porque, durante as neutropenias que ocorrem após o tratamento quimioterápico, é alto o risco de infecções disseminadas a partir de microrganismos residentes na boca. Desse modo, os tecidos periodontais inflamados podem agir como um foco infeccioso, trazendo significativa morbidade e, em alguns casos, risco à vida. Ainda para estes autores há evidência de que gengivites e periodontites pré-existentes estejam associadas, nesses pacientes, a episódios de febre e *sepsis*, pois o epitélio ulcerado da bolsa periodontal pode servir como uma via de entrada de microrganismos na corrente sanguínea, e para a veiculação sistêmica de endotoxinas bacterianas e outros mediadores inflamatórios. Além

de bactérias gram-negativas, anaeróbias estritas ou facultativas, o biofilme subgengival também abriga outros patógenos, como a espécie *C. albicans*, passíveis de disseminação sistêmica. Para tais pesquisadores, a incidência de focos infecciosos na cavidade bucal nessas populações é provavelmente subestimada, e sua prevenção e tratamento podem ser críticos para a manutenção da saúde. Todos esses dados, tomados em conjunto, apontam para a necessidade de cooperação multidisciplinar entre os diversos profissionais das áreas médicas e biológicas, de forma a melhor esclarecer o papel das infecções periodontais em grupos populacionais diferenciados.

Desse modo, vários estudos relatam que as espécies de *Candida*, presentes na mucosa ou em áreas subgengivais, mesmo em indivíduos assintomáticos, podem contribuir tanto para patogênese da doença periodontal, como também aumentar o risco de candidoses superficiais ou disseminadas, especialmente em casos de comprometimento imune (Damjanovic *et al.*, 1993; Nikawa *et al.*, 1998; Redding *et al.*, 1999; Marco *et al.*, 1999; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Luu *et al.*, 2001; Al-Karaawi *et al.*, 2002; Starr *et al.*, 2002; Epstein *et al.*, 2003).

Epstein *et al.* (2003), estudando um grupo de pacientes transplantados, relataram que a colonização orofaríngea por espécies de *Candida* é comumente observada em pacientes que recebem transplante de células hematopoiéticas, mesmo com o uso de profilaxia anti-fúngica tópica ou sistêmica. Para esses autores, a candidose disseminada foi um fato comum nos pacientes que não sobreviveram no período pós-transplante, sendo que as leveduras podem disseminar-se pela corrente circulatória a partir de uma infecção mucosa superficial, e implantar-se em vários órgãos internos importantes. Estes autores também sugeriram que a prevenção da colonização da orofaringe por *Candida* spp. e das candidoses bucais é essencial para evitar as candidemias. Luu *et al.* (2001), num estudo sobre a transição de *C. albicans* de sítios superficiais, como a mucosa bucal, para a corrente circulatória, relatam que as mesmas linhagens que colonizam sítios superficiais possuem também a capacidade de invadir a corrente sanguínea, e que o aumento na incidência de infecções fúngicas acontece numa época em que a mortalidade por infecções bacterianas vem decrescendo, com a administração de antibióticos de largo espectro, enquanto essas leveduras continuam a produzir infecções sistêmicas severas.

Entretanto, muitas das interações desses microrganismos com o hospedeiro ainda são pouco compreendidas (Ollert *et al.*, 1995; Hube & Naglik, 2001). Por exemplo, os mecanismos de defesa às candidoses são complexos, e diferentes tipos de infecção podem ocorrer, dependendo do grau e do tipo de deficiência imune (Vargas & Joly, 2002). As infecções mucosas são as formas mais comuns de candidose, mas as sistêmicas também ocorrem, e os mecanismos de defesa para cada uma podem ser diferentes. Desse modo, infecções sistêmicas não são freqüentes em indivíduos com deficiência de células-T, mas comuns naqueles com neutropenia ou disfunção neutrofílica; por outro lado, a resistência à candidose local pode estar associada principalmente às respostas celulares dos linfócitos-T CD4 (Rodriguez-Galan *et al.*, 2002). Segundo Vargas & Joly (2002), os neutrófilos de pacientes HIV-positivos mantém suas funções adequadamente, sendo a candidose disseminada raramente observada nessa população; porém as funções dos macrófagos declinam, e o número de células T-auxiliares também fica comprometido, predispondo à candidose orofaríngea. Todavia, os vários mecanismos responsáveis pela resposta imune - inata, humoral e celular - agem em conjunto na proteção contra a infecção por espécies de *Candida* (Fidel, 2002).

2.8. Fatores de Virulência

A transição do estado de comensalismo para o de patogenicidade é bem controlada nesses fungos, e atribuída à expressão seletiva de vários fatores de virulência, que agem de forma sinérgica, sob condições predisponentes favoráveis. Assim, o tipo, o estágio e o sítio da infecção, além da natureza da resposta imune, fazem com que a levedura expresse um ou outro de seus variados fatores de virulência (Hube & Naglik, 2001) e, dentre os quais, a atividade enzimática extracelular, proteolítica ou lipolítica, parece desempenhar um papel principal na patogenicidade desses microrganismos (Kaminishi *et al.*, 1995; Willis *et al.*, 2001).

As membranas celulares são constituídas de lipídeos e proteínas, e estes constituintes podem servir como um alvo para o ataque das enzimas microbianas. Fungos patogênicos como *Candida albicans* secretam uma variedade de enzimas, cujos principais representantes são classificados em dois tipos: as proteinases, que hidrolizam as ligações

peptídicas das proteínas e as fosfolipases, que hidrolizam os fosfolipídeos da membrana plasmática. A atividade enzimática produz disfunção ou rompimento da membrana das células do hospedeiro (Ghannoum, 2000). Shimizu *et al.* (1996), num estudo sobre a produção enzimática por espécies de *Candida*, relataram que apenas *C. albicans* foi capaz de produzir simultaneamente as quatro classes de enzimas analisadas: hialuronidase, condroitin-sulfatase, proteinases e fosfolipases. Além disso, a ação combinada dessas enzimas contribuiu para o potencial patogênico das cepas secretoras, aumentando o poder de virulência em camundongos. Entretanto, nenhuma diferença foi encontrada entre as cepas de *C. albicans* isoladas da saliva de portadores assintomáticos e de pacientes com candidose, quanto à produção enzimática ou ao potencial patogênico. Ghannoum (2000) observa que o estudo desses fatores de virulência é relativamente recente e está em rápida evolução, o que auxiliará a elucidar a contribuição destas enzimas para a virulência fúngica, num futuro próximo.

2.9. Enzimas Aspartil Proteinases Secretadas (*Saps*)

As enzimas proteolíticas têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, sendo que as enzimas Aspartil Proteinases Secretadas (*Saps*) vêm sendo o principal foco de investigação na virulência de *C. albicans*. Essas enzimas foram detectadas também em bactérias como *Pseudomonas*, *Porphyromonas* e *Serratia*, induzindo o aparecimento de reações inflamatórias, com os conseqüentes sintomas clínicos. Cepas com alta atividade de proteinase são mais capazes de causar infecção do que aquelas com menor atividade ou mutantes enzima-deficientes. (Kaminishi *et al.*, 1995; Na *et al.*, 1997). Dentro do gênero *Candida*, essas enzimas são secretadas pela maioria das cepas de espécies consideradas mais patogênicas, como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, estando ausentes em leveduras não-patogênicas como *S. cerevisiae*, o que corrobora a hipótese de que estejam envolvidas na virulência (Shimizu *et al.*, 1996).

As *Saps* são produzidas intracelularmente, e transportadas através de vesículas, do citoplasma até a superfície, sendo então secretadas para o meio extracelular. No entanto, algumas classes de proteinases, (*Saps* 9 e 10), permanecem ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol (GPI), associadas à membrana celular da levedura (Hube & Naglik,

2001). Para estes autores, todas as aspartil proteinases maduras contêm seqüências-consenso de aminoácidos, incluindo 2 resíduos conservados de aspartato no sítio ativo. Resíduos conservados de cisteína estão provavelmente implicados na manutenção da estrutura tridimensional da proteína. As *Saps* formam um grupo de enzimas proteolíticas codificadas por uma família de genes contendo 10 membros (*SAP1* a *SAP10*). Pouco depois da descoberta da isoenzima *Sap1*, mais 9 genes foram identificados, e todos já seqüenciados (Kaminishi *et al.*, 1995; Hube & Naglik, 2001; Zaugg *et al.*, 2001). A família de genes *SAP* fornece um eficiente sistema proteolítico, vital para o sucesso de *Candida* spp., tanto na colonização comensal quanto no desenvolvimento de infecções. Desse modo, tais enzimas podem permitir a aquisição de nutrientes por *C. albicans*, pela proteólise de substratos do hospedeiro. Por exemplo, a atividade da enzima *Sap2* possibilita ao fungo crescer eficientemente em meio contendo albumina ou outra proteína, como única fonte de nitrogênio (Hube *et al.*, 1994; White & Agabian, 1995). Entretanto, esse grupo de enzimas pode ter evoluído e se adaptado para uma função de virulência mais direta, por exemplo, a capacidade de lesar membranas celulares, de aumentar a adesão da levedura às células do epitélio mucoso (Hube & Naglik, 2001), além de induzir respostas inflamatórias, pela liberação de mediadores como a Interleucina-1 β (Beausejour *et al.*, 1998). A inativação de componentes imunes tais como IgG e IgA favorece a adesão e a penetração de *C. albicans* nos tecidos bucais, assim como a evasão da resposta imune, por dificultar a atividade fagocitária (Ollert *et al.*, 1995; Kaminishi *et al.*, 1995; Borg Von Zepelin *et al.*, 1998; Hägewald *et al.*, 2002). Kaminishi *et al.* (1995), analisando a ação das proteinases de *C. albicans* sobre a atividade antibacteriana e de opsonização do soro humano, observaram uma capacidade significativamente reduzida na fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* por neutrófilos polimorfonucleares, quando em contato com soro humano tratado com proteinase. Esse distúrbio foi atribuído à hidrólise enzimática da porção Fc da IgG e da fração C₃ do complemento, tornando deficiente a atividade de opsonização e a fagocitose dos microrganismos.

A degradação proteolítica dos inibidores endógenos de proteinase, como a α -macroglobulina e o α -1 inibidor de proteinase, foi demonstrada por Pichová *et al.* (2001), através da técnica de SDS-PAGE, sugerindo que a destruição de proteínas reguladoras da

resposta inflamatória e a perturbação nos mecanismos de defesa debilitam o hospedeiro infectado por *C. albicans*. Estes pesquisadores demonstraram que a utilização terapêutica de inibidores da secreção de proteinases como, por exemplo, a pepstatina A, foi útil em casos de vaginite experimental, em ratas infectadas com cepas altamente produtoras de proteinase, isoladas de um paciente HIV-positivo. Contudo, o potencial de virulência das aspartil proteinases tem sido demonstrado, principalmente, pelo estudo do comportamento de cepas mutantes de *C. albicans*, deficientes em alguns desses genes, que exibem virulência diminuída em modelos animais de disseminação hematogênica, comparados com a cepa parental (Pichová *et al.*, 2001). Estudos imunoquímicos e histopatológicos demonstraram a presença de antígenos *Sap* em quase todos os órgãos de pacientes imunocomprometidos que faleceram em consequência de candidose disseminada (Ruchel *et al.*, 1991).

A expressão dessas enzimas é rigidamente controlada (Naglik *et al.*, 1999), e, assim, esses genes são expressos diferencialmente, *in vivo*, de acordo com o tipo e o estágio do processo infeccioso, pois diferentes proteinases são requeridas para agir sobre proteínas e tecidos específicos do hospedeiro (Ollert *et al.*, 1995; Pichová *et al.*, 2001; Hube & Naglik, 2001). Portanto, a manifestação clínica da infecção parece estar associada ao padrão de expressão de algumas classes de proteinases; por exemplo, a expressão das *Saps* 1 e 3 foi detectada por Naglik *et al.* (1999), apenas em indivíduos com candidose. A germinação de hifas também pode ser determinada pela secreção de algumas dessas isoenzimas. Sendo assim, nem todas as proteinases são requeridas ao mesmo tempo ou no mesmo estágio do processo infeccioso, e nem todas contribuem para os mesmos tipos de infecção (White & Agabian, 1995; Naglik *et al.*, 1999). Foi demonstrado em modelos animais, que as *Saps* 1, 2 e 3 são as principais classes de proteinases secretadas durante as infecções bucais superficiais (Schaller *et al.*, 1998). Ao contrário, nas infecções sistêmicas, predomina a expressão das *Saps* 4, 5 e 6 (Staib *et al.*, 2000). Estes autores também relataram que a isoenzima *Sap2* foi encontrada nas fases tardias da candidose sistêmica. Naglik *et al.* (1999), estudando o padrão de expressão desses genes em humanos, através da detecção do mRNA, relatou que a patogênese das infecções por *C. albicans* pode estar

associada com a expressão genética diferencial dessas isoenzimas, evidenciando seu papel na candidose bucal humana.

A regulação da transcrição desses genes é dependente de vários mecanismos: por exemplo, a isoenzima *Sap2* é regulada por um mecanismo de *feedback* positivo, em que peptídeos advindos da hidrólise de proteínas de alto peso molecular induzem a transcrição do gene *SAP2*. Ao contrário, a transcrição dos genes que codificam as enzimas *Sap1* e *Sap3* ocorre durante as alterações fenotípicas, manifestadas por determinadas cepas. Já a expressão da *Sap8* é regulada pela temperatura e as *Saps* 9 e 10 são constitutivamente expressas, sob a maioria das condições ambientais, tanto pelas hifas como pelas células da levedura (Hube & Naglik, 2001).

Durante o curso das infecções, *C. albicans* encontra diversos tecidos e condições ambientais, o que pode explicar a necessidade de a levedura possuir um arsenal de genes codificando enzimas proteolíticas. A posse de uma família de genes confere a estes microrganismos as vantagens biológicas de se ter uma segunda linha enzimática, quando uma das enzimas falhar ou for perdida (Ibrahim *et al.*, 1998). Por exemplo, a inativação dos genes *SAP* 1 e 3, associados à infecção bucal, induz um aumento da secreção das isoenzimas *Saps* 5 e 8, sugerindo a existência de um mecanismo compensatório, de modo que *C. albicans* pode compensar a perda de alguns genes por super-regular genes alternativos (Hube & Naglik, 2001).

As enzimas aspartil proteinases já foram consideradas ativas apenas em pH ácido, o que poderia ser ecologicamente desvantajoso para esses fungos; entretanto, posteriormente, foi observado que as diferentes isoenzimas possuem diferentes pH ótimos de atividade, e que algumas estão adaptadas para funcionar em pH próximo da neutralidade (Monod *et al.*, 1998). Desse modo, a *Sap 2* age principalmente em pH ácido, em torno de 4; as *Saps* 4, 5 e 6 são ativas em pH fisiológico, e a *Sap3* conserva sua atividade num pH próximo de 2 (Borg Von Zepelin *et al.*, 1998). Isso permite a *C. albicans* manter uma atividade proteolítica em ambientes com pH variando de 2 a 7, o que pode ser essencial para sua adaptação aos diversos ambientes encontrados no hospedeiro. Além disso, para Hube & Naglik, (2001), essa levedura é capaz de acidificar ativamente o meio-ambiente, de

forma a criar micro-nichos ótimos para a atividade enzimática, durante o processo infeccioso.

Outra questão a ser considerada é que a evolução dessa família de genes tem permitido uma expressão enzimática coordenada com outros fatores de virulência, como a capacidade adesiva e a formação de hifas, contribuindo para o potencial patogênico de *C. albicans* e para a sua grande capacidade adaptativa. A expressão conjunta de alguns desses genes pode resultar num efeito sinérgico, importante para a colonização ou para a infecção (Hube & Naglik, 2001).

Staib (1965) foi o primeiro pesquisador a demonstrar a presença de uma proteinase ácida em *C. albicans* e, posteriormente, Remold *et al.* (1968) conseguiram purificar essa enzima, e demonstrar uma maior virulência das cepas proteolíticas em relação às não-proteolíticas, em experimentos com cobaias, relatando, pela primeira vez, uma associação entre atividade enzimática e virulência de *C. albicans*.

A produção de proteinases por diferentes isolados dessa levedura pode variar bastante. Chakrabarti *et al.* (1991), examinando amostras de *C. albicans* provenientes de diversos sítios anatômicos, observou que a atividade enzimática de proteinases foi observada em 44 a 84% dos isolados, dependendo do sítio de origem. Penha *et al.* (2000), analisando isolados bucais dessas leveduras, verificou que 100% eram produtoras de proteinase. Wu *et al.* (1996) encontraram que os isolados de *C. albicans* provenientes de pacientes infectados pelo HIV foram mais proteolíticos que os obtidos de portadores saudáveis e assintomáticos. Também para Cassone *et al.* (1998), os isolados de *C. albicans* de lesões de candidose demonstraram maior atividade enzimática do que aqueles provenientes de portadores assintomáticos.

Todavia, Candido *et al.* (2000), comparando a atividade enzimática entre isolados de *C. albicans* obtidos de portadores assintomáticos e de indivíduos que manifestavam candidose, não observaram diferença significativa entre os grupos. Da mesma maneira, McMullan-Vogel *et al.* (1999), analisando a atividade enzimática das *Saps* por isolados de *C. albicans*, em indivíduos com candidose no palato relacionada ao uso de próteses totais, não encontraram diferença significativa na atividade enzimática de proteinases, entre estes isolados e aqueles provenientes de indivíduos portadores

assintomáticos, não-usuários de prótese; os autores concluíram que não houve, na cavidade bucal de usuários de próteses totais, uma seleção de cepas de *C. albicans* altamente secretoras de proteinases, como observada entre HIV-positivos. No entanto, isso não significou, para os autores, que essas enzimas não fossem importantes para a infecção, mas que o ambiente de estagnação, criado sob as próteses, com um baixo pH, e onde a ação do fluxo salivar está diminuída, favorece uma maior concentração e atividade enzimática local. Portanto, uma secreção enzimática aumentada pode não ser particularmente necessária para o desenvolvimento da candidose no palato.

Para induzir a secreção enzimática, vários meios de cultura, com diferentes composições de proteínas já foram testados (Ray & Wuepper, 1976). As enzimas são secretadas, *in vitro*, quando as leveduras são cultivadas em presença de proteínas exógenas como fonte de nitrogênio, como a albumina do soro bovino (Angiolella *et al.*, 1996). Dentre os métodos utilizados para avaliar a produção destas enzimas, o método do cultivo em placas de petri, descrito por Ruchel *et al.* (1982), empregando meio sólido enriquecido com albumina, têm sido utilizado em muitas pesquisas de atividade enzimática (Ghannoum & Abu-Alteen, 1986; Penha *et al.*, 2000; Candido *et al.*, 2000; Hannula, 2000). Estudos feitos por Hube *et al.* (1994) e White & Agabian (1995), demonstraram que apenas a secreção da isoenzima *Sap2* é suficiente para o crescimento de *C. albicans* em meio de cultura contendo proteína como única fonte de nitrogênio. Foi constatado também que essa isoenzima pode degradar eficientemente vários substratos do hospedeiro, como queratina, colágeno, fibronectina e mucinas, assim como a lactoferrina salivar e IgA (Ruchel *et al.*, 1992). De acordo com Candido *et al.* (2000), estudos utilizando essa propriedade de secreção enzimática em meios de cultura têm possibilitado a biotipagem de *C. albicans*

Muitos estudos atuais têm ajudado a esclarecer o papel dessas isoenzimas na virulência de *C. albicans*. Entretanto, a função exata de cada uma delas, durante o curso das infecções humanas, bem como as conseqüências da ação enzimática sobre os fatores defensivos do hospedeiro, *in vivo*, são largamente desconhecidas e necessitam ser mais bem estudadas, de forma a auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento das infecções causadas por tais espécies (Pichová *et al.*, 2001).

2.10. Enzimas Fosfolipases

O termo “fosfolipase” refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas, que demonstra capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações ésteres nos glicerofosfolipídeos. Embora todas as fosfolipases possuam como alvo os fosfolipídeos, cada enzima é capaz de clivar uma ligação éster específica (Ansell & Hawthorne, 1964; Ghannoum, 2000). Ao catalisar a hidrólise dos fosfolipídeos da membrana celular, geram nessa reação o lisofosfolipídeo, metabólito que pode desestabilizar a membrana plasmática e danificar uma variedade de tecidos (Price *et al.*, 1982; Willis *et al.*, 2001).

De acordo com Ghannoum (2000), a secreção extracelular de fosfolipases por *C. albicans* foi primeiramente relatada em 1960, através do cultivo da levedura em meio sólido contendo gema de ovo. Para este autor, como os fosfolipídeos e as proteínas representam os principais constituintes do envoltório celular, enzimas capazes de hidrolisar esses compostos estão envolvidas no processo de rompimento da membrana celular, durante a invasão dos tecidos do hospedeiro.

Quatro classes de isoenzimas fosfolipases foram descritas, todas provavelmente envolvidas na lise celular ou na alteração de moléculas superficiais dos tecidos, de modo a facilitar a aderência das leveduras e a infecção (Price *et al.*, 1982; Willis *et al.*, 2001). Essas classes foram designadas pelas letras A, B, C e D, cada qual desempenhando uma função, e cujo complexo de atividades provoca dificuldades em sua nomenclatura. Além de fungos como *C. albicans*, as fosfolipases extracelulares têm sido implicadas na patogenicidade de bactérias, como *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *S. aureus* (Ghannoum, 2000).

Segundo Price & Cawson (1977), as fosfolipases são comumente encontradas em vesículas, associadas à superfície celular das leveduras. Para Niewerth & Korting (2001), estas enzimas podem estar relacionadas ao crescimento celular de *C. albicans* e, possivelmente, na formação do tubo germinativo. Estudos de microscopia eletrônica têm demonstrado que a atividade enzimática de fosfolipases está concentrada nas extremidades das hifas da levedura (Price *et al.*, 1982; Lane & Garcia, 1991). Lane & Garcia (1991) avaliaram a produção extracelular das enzimas fosfolipases por linhagens de *C. albicans* e relataram que aquelas que produziram maiores níveis de fosfolipases, também causaram um

aumento significativo da mortalidade em camundongos. Willis *et al.* (2001), relataram que pacientes sem sinais clínicos de candidose abrigavam significativamente menos cepas produtoras de fosfolipase do que pacientes que manifestavam candidose bucal. Além disso, significativamente maior quantidade de linhagens de *C. albicans*, provenientes de pacientes diabéticos com candidose, produziram fosfolipase, sugerindo que algumas cepas de *C. albicans* são mais patogênicas que outras.

Banno *et al.* (1985), detectaram a presença da fosfolipase B (PLB) em filtrados de cultura de *C. albicans*, e relataram que o pH ótimo para a atividade enzimática é em torno de 4,0 a 5,0. Para tais autores, esta é a principal classe de fosfolipases secretada pelas linhagens patogênicas de *C. albicans*. A fosfolipase C (PLC) tem atividade ótima em pH em torno de 7,5 e, segundo Bennett *et al.* (1998), sua atividade é aumentada nas fases de hifa. A produção de fosfolipase D (PLD) é estimulada durante a ocorrência de dimorfismo celular (McLain & Dolan, 1997).

Price *et al.*, em 1982, descreveram um método prático para a detecção de fosfolipases de *C. albicans*. Esses autores propuseram que a gema de ovo, substrato com grande quantidade de fosfolipídeos, fosse incorporado ao meio Ágar Sabouraud Dextrose. Quando os isolados de *Candida*, produtores de fosfolipases, eram cultivados nesse meio, ocorria uma zona de degradação enzimática dos fosfolipídeos, formando um halo observável em torno das colônias. Esse halo seria originado provavelmente, segundo os autores, pela formação de complexos entre o cálcio e os ácidos graxos provenientes da ação das fosfolipases nos fosfolipídeos da gema de ovo. Esse método tornou-se tradicional para a determinação da atividade enzimática de fosfolipases em isolados de *C. albicans* (Samaranayake *et al.*, 1984; Williamson *et al.*, 1986; Lane & Garcia, 1991; Candido *et al.*, 2000). Segundo Ibrahim *et al.* (1995), a PLB é a principal classe de fosfolipase detectada pelo método da placa contendo a gema de ovo como substrato. Entretanto, para Fu *et al.*, (1997), pelo fato da gema de ovo conter substratos também para as enzimas lipases, que degradam triglicerídeos, esse método não é específico, e deveria ser utilizado apenas para um rastreamento inicial dos isolados de *C. albicans*.

A produção de fosfolipases pode ser variável entre os isolados de *C. albicans* (Williamson *et al.*, 1986). Estes autores, analisaram a atividade enzimática de 100 isolados

buciais desta espécie, e relataram que apenas 6% deles não produziram fosfolipases. Samaranayake *et al.* (1984), analisaram 41 isolados de *C. albicans* e constataram que 79% dos isolados eram produtores de fosfolipases, enquanto outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não as produziam. Shimizu (1989), observaram que 100% dos isolados de *C. albicans* eram fosfolipase-positivas. Vários outros autores têm observado uma produção variável dessas isoenzimas por isolados de *C. albicans*, em diversas condições clínicas (Maffei, 1996; Souza *et al.*, 1990; Ibrahim *et al.*, 1995; Penha *et al.*, 2000; Hannula, 2000).

2.11. Identificação e genotipagem de *Candida* spp.

A identificação e a caracterização das espécies de *Candida* podem ser feitas através de testes fenotípicos clássicos, como a micromorfologia e a análise dos diferentes perfis bioquímicos apresentados por essas espécies (Sandven, 1990). Além disso, o estudo de propriedades como, dentre outras, a capacidade de secreção enzimática (Price *et al.*, 1982), de formação de biofilmes, pela coagregação intergenérica (Jabra-Rizk *et al.*, 2001); de sensibilidade aos anti-fúngicos (Pfaller *et al.*, 2003), e a sorotipagem (Hannula *et al.*, 2001), permite uma caracterização fenotípica dos isolados clínicos. Entretanto, as comparações entre os isolados, baseadas nos métodos de biotipagem, trazem o risco de agrupar linhagens geneticamente distintas, mas que apresentam fenótipos similares, ou ao contrário, separar as geneticamente semelhantes com fenótipos distintos (Hellstein *et al.*, 1993). Portanto, o uso de métodos moleculares modernos, associados aos fenotípicos, têm permitido o aprimoramento da identificação e um maior conhecimento sobre as relações de comensalismo e patogenicidade que as espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, estabelecem com o hospedeiro, como, por exemplo, o papel de diferentes cepas em infecções recorrentes, a análise dos padrões de transmissibilidade e do potencial de virulência, bem como a resistência aos antifúngicos, pelas diferentes linhagens dentro de cada espécie (Sullivan *et al.*, 1996; Clemons *et al.*, 1997; Hannula *et al.*, 2001; Al-Karaawi *et al.*, 2002; Samaranayake *et al.*, 2003).

Assim, a caracterização molecular, em nível de subespécies, é necessária para esclarecer muitos aspectos sobre a epidemiologia das infecções produzidas por estes

patógenos oportunistas (Sanz *et al.*, 1996), e vários métodos de genotipagem, como a análise por enzimas de restrição (REA), a eletroforese de isoenzimas (MLEE), a eletroforese de campo pulsado (PFGE) e os métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR e RAPD), dentre outros (HöflinG & Rosa, 1999; Rosa *et al.*, 2000), vêm sendo utilizados para mensurar o grau de relacionamento genético, verificando possíveis associações de determinadas linhagens com características fenotípicas, e com os parâmetros do hospedeiro (Dahl *et al.*, 1997; Xu J *et al.*, 1999; Redding *et al.*, 1999; Pizzo *et al.*, 2002).

Para McCullough *et al.* (1999), os métodos de genotipagem baseados na análise dos ácidos nucleicos são altamente específicos e reprodutíveis. A Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é uma poderosa técnica, que envolve a síntese *in vitro* de milhões de cópias de um determinado segmento de DNA, na presença da enzima Taq DNA polimerase (Saiki *et al.*, 1988). Como vantagens dessas técnicas estão a relativa rapidez, simplicidade e aplicabilidade universal, enquanto seu poder discriminatório se mantém comparável aos métodos mais complexos, como o PFGE ou REA (Van Belkum *et al.*, 1994). Clemons *et al.* (1997), comparando o poder discriminatório de 3 técnicas moleculares - REA, PFGE e RAPD, na análise da diversidade genética de *C. albicans*, relataram que o método de PFGE demonstrou o menor poder discriminatório, enquanto os métodos REA e RAPD demonstraram uma resolução similar.

Na técnica de RAPD, ou AP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase com *Primer* Arbitrário), é utilizado apenas um único *primer*, composto por uma curta seqüência de nucleotídeos, que hibridiza de forma aleatória na fita molde (*template*) de DNA, enquanto que na técnica de PCR clássica são empregados um par de *primers*, espécie-específicos, para amplificar uma seqüência-alvo conhecida no genoma estudado (Welsh & McClelland, 1990). A técnica de RAPD, desenvolvida por Williams *et al.* (1990), permite a análise de uma grande diversidade de organismos, detectando polimorfismos intra e inter-espécies, sem necessidade de prévio conhecimento sobre as seqüências-alvo a serem amplificadas no DNA de interesse. Tais polimorfismos funcionam como marcadores genéticos, segundo esses autores, e podem ser utilizados para uma variedade de aplicações. Entretanto, para Dassanayake *et al.* (2000), a reprodutibilidade do método depende da

cuidadosa padronização das reações, e seu poder discriminatório depende do *primer* utilizado e da otimização dos experimentos.

Atualmente o método de RAPD vem sendo largamente empregado em estudos epidemiológicos de leveduras (Sanz *et al.*, 1996; Xu J *et al.*, 1999; Donnelly *et al.*, 1999; Kurzai *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2003), inclusive de isolados clínicos provenientes de diversos sítios da cavidade bucal, em grupos populacionais caracterizados por uma variedade de condições clínicas (Hannula *et al.*, 1997; Clemons *et al.*, 1997; Hannula *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 1999; Waltimo *et al.*, 2001; Hannula *et al.*, 2001; Samaranyake *et al.*, 2003; Gugnani *et al.*, 2003; Hossain *et al.*, 2003; Mardegan, 2003).

Sanz *et al.*, (1996) genotiparam 16 isolados de *C. albicans*, provenientes de diferentes sítios anatômicos, utilizando 4 *primers* arbitrários, e relataram que o *primer* AP-03 foi o que apresentou maior poder discriminatório, gerando 8 padrões distintos de DNA entre estes isolados. Ahmad *et al.* (2003), também utilizaram a técnica de RAPD utilizando 3 *primers* arbitrários, para investigar a colonização e a diversidade genética de espécies de *Candida*, inclusive *C. albicans*, entre pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva e enfermeiros saudáveis, em um hospital universitário no Kuwait. Também para estes autores, o *primer* AP-03 demonstrou maior poder discriminatório que os demais. Mardegan (2003), analisando isolados bucais de *C. albicans* em crianças clinicamente saudáveis, cárie-ativas ou livres de cárie, provenientes de uma única localidade geográfica, utilizaram o RAPD com o *primer* AP-03, e encontraram uma grande diversidade genotípica entre os isolados, com mais de um genótipo colonizando o mesmo hospedeiro.

Hannula *et al.* (1997) relataram que, através da utilização de 2 *primers*, um dos quais o OPA-03, foi possível distinguir entre diferentes espécies de leveduras bucais, incluindo *C. albicans* e *C. dubliniensis*, e também de acessar a variabilidade genética entre as linhagens dentro de uma mesma espécie, em populações saudáveis e assintomáticas. Hannula *et al.* (1999), num estudo sobre a transmissão de linhagens bucais e nasofaríngeas de *C. albicans* entre pares mãe-filho, utilizando o *primer* arbitrário OPA-03, relataram que isolados de *C. albicans* possuíam perfis genotípicos similares, mas não necessariamente idênticos, o que possibilitou distinguir diferentes linhagens, bem como estabelecer o padrão de transmissibilidade desses microrganismos. Xu J *et al.* (1999), através de RAPD com o

primer OPA-03 e por PCR-*fingerprinting* com a sequência M13, puderam acessar a diversidade genética de espécies de *Candida* em 3 sítios anatômicos, de 3 grupos de mulheres.

Todavia, observações recentes vêm, em conjunto, demonstrando que a epidemiologia de *C. albicans* é bastante complexa e que, embora este seja um patógeno importante, frequentemente encontrado na cavidade bucal de hospedeiros humanos, alguns aspectos ecológicos fundamentais necessitam ainda de maiores esclarecimentos (Soll, 1993). Por exemplo, é geralmente assumido que, pelo fato de *C. albicans* ser um habitante comum da cavidade bucal de indivíduos assintomáticos, as infecções oportunistas, que eventualmente ocorrem, seriam produzidas pelas próprias cepas comensais residentes; assim, todas, ou pelo menos a maioria dessas linhagens, seriam consideradas também, por definição, patógenos oportunistas (Hellstein *et al.*, 1993; McCulough *et al.*, 1994; Xu J *et al.*, 1999; Samaranayake *et al.*, 2003). Ao contrário, outras pesquisas observam que, na transição do estado comensal para o patogênico pode ocorrer, na orofaringe, uma substituição das cepas residentes por outras linhagens, mais virulentas e melhor adaptadas, numa seleção de patógenos (Schmid *et al.*, 1992; Schröppel *et al.*, 1994; Miyasaki *et al.*, 1994). Para Ollert *et al.* (1995), embora a hipótese da emergência de uma nova e hipervirulenta cepa de *C. albicans* venha sendo descartada como causa da severidade e do caráter recorrente de alguns tipos de candidose, há indícios de que a seleção de patógenos é possível, e não pode ser totalmente ignorada, principalmente em pacientes HIV-positivos.

Schmid *et al.* (1992) demonstraram, por experimentos de hibridização genética com a sonda Ca3, que certas linhagens de *C. albicans*, embora também detectadas na cavidade bucal de HIV-negativos, são mais frequentemente isoladas de pacientes com AIDS. Estes autores observaram que a alteração da microbiota, determinada pela maior proliferação dessas linhagens, acontece precocemente na cavidade bucal, antes da manifestação da infecção, e que permanece estável durante todo o curso da candidose orofaríngea. Utilizando esta mesma sonda, Miyasaki *et al.* (1994) também demonstraram que a candidose bucal recorrente em HIV-positivos é usualmente causada por uma única linhagem persistente, que pode ser transmitida entre parceiros sexuais e tornar-se predominante em ambos os indivíduos. Para Schmid *et al.* (1992), as alterações ecológicas

no meio-ambiente podem favorecer a proliferação de cepas mais virulentas de *C. albicans*. Ollert *et al.* (1995) observaram que as cepas provenientes de indivíduos HIV-positivos, demonstravam uma maior atividade enzimática de aspartil proteinases, e uma menor susceptibilidade aos agentes anti-fúngicos azóis, comparados aos controles HIV-negativos. Porém, de acordo com esse estudo, as razões para que ocorram a seleção e a substituição das cepas comensais permanecem obscuras.

Desse modo, recentes estudos sobre as populações genéticas de *C. albicans*, isoladas de HIV-positivos, apontam para uma seleção de cepas mais virulentas e para um modo clonal de reprodução dessas linhagens. Este fato tem grandes implicações na patogênese da candidose bucal, pela possibilidade de disseminação de linhagens genéticas virulentas e altamente resistentes de *C. albicans*, selecionadas em indivíduos infectados pelo HIV. McMullan-Vogel *et al.* (1999) também sugeriram um papel das aspartil proteinases na seleção dessas cepas, cuja característica particularmente importante é a invasão tecidual, comumente observada em candidoses associadas à infecção pelo HIV, e raramente vista em HIV-negativos.

Porém, Xu J *et al.* (1999) não encontraram diferenças significativas quanto à diversidade de espécies e genotípica na microbiota de leveduras colonizando mulheres, nem em relação às condições do hospedeiro (HIV, gravidez e grupo-controle), nem em relação aos sítios anatômicos estudados (cavidade bucal, vagina e reto), e relatam que, neste estudo, não houve substituição das cepas comensais por qualquer linhagem particular. Samaranayake *et al.* (2003), num estudo para verificar a ocorrência de alterações na microbiota de *C. albicans*, na cavidade bucal de HIV-positivos, assintomáticos ou com candidose orofaríngea, também relataram que cepas provenientes das lesões de candidose não representaram clones geneticamente distintos das cepas comensais, provenientes de portadores assintomáticos dessa levedura. Contudo, de acordo com Powderly *et al.* (1993), a manifestação de candidoses pode ocorrer por ambos os processos.

Dessa forma, segundo Xu J *et al.* (1999), duas hipóteses têm sido propostas para explicar a ocorrência de infecções por *C. albicans*, com importantes repercussões no tratamento das infecções clínicas e na elaboração de estratégias preventivas:

1) **"Hipótese da substituição"**: propõe que as cepas comensais originais, que habitam um determinado sítio anatômico anteriormente à infecção, podem ser substituídas por linhagens de *C. albicans* potencialmente mais virulentas e bastante similares geneticamente; se for assim, então a microbiota de leveduras do sítio doente deve possuir um maior grau de similaridade genética entre si, ao contrário das cepas provenientes de sítios assintomáticos, que tendem a ser geneticamente mais diversas. Se este fenômeno ocorrer freqüentemente, a identificação das vias de transmissão dessas linhagens patogênicas poderia levar a adoção de medidas que limitem sua disseminação, visto terem maior potencial de virulência e maior capacidade adaptativa que as cepas ditas comensais.

2) **"Hipótese da persistência"**: postula que, ao contrário da hipótese da substituição, as cepas que habitam o hospedeiro assintomático, como comensais inofensivos, seriam as mesmas responsáveis pelos episódios infecciosos. Segundo este conceito, a manifestação da infecção dependeria principalmente das condições imunes do indivíduo, mais do que do potencial patogênico aumentado de algumas linhagens de *C. albicans*. Se este for o caso, o conhecimento da microbiota de leveduras em populações consideradas de risco, seria importante no controle e tratamento dessas micoses.

Hellstein *et al.* (1993) analisaram a diversidade genética entre isolados comensais e patogênicos de *C. albicans*, provenientes, respectivamente, de um grupo de indivíduos assintomáticos e de outro grupo com lesões de candidose bucal, através de hibridização usando *Southern blot* com a sonda *fingerprinting Ca3*. A população estudada era composta por indivíduos imunocompetentes e provenientes de uma única localidade geográfica. Os autores relataram que ambos os grupos de cepas, comensais e patogênicos, se concentravam em um grande *cluster*, quando colocados para gerar um único dendrograma. Assim, tanto as cepas comensais como as patogênicas pareciam possuir origens clonais comuns, cuja progênie teria competido, com sucesso, com as demais, pelo povoamento dos diferentes nichos ecológicos da cavidade bucal.

Para estes autores, a progênie de uma célula de *C. albicans* representa uma linhagem completamente independente das demais, competindo entre si pelo povoamento de nichos ecológicos, tanto nos sítios assintomáticos como nas lesões de candidose. Assim,

os clones mais competitivos e bem adaptados proliferam numa determinada localidade, enquanto os menos competitivos tendem a desaparecer.

Boriollo (2004), analisando isolados bucais de *C. albicans*, em populações de crianças saudáveis em idade escolar, observou, por MLEE, uma alta diversidade genética entre os isolados, com predominância de alguns tipos eletroforéticos, sugerindo a existência de um ou mais grupos de isolados bucais de *C. albicans*, altamente relacionados, normalmente predominantes dentro e entre subpopulações de crianças saudáveis, de diferentes categorias socio-econômicas. Outros autores têm relatado também a ocorrência de diversidade genética entre isolados bucais de *C. albicans*, além de uma especificidade regional na composição da microbiota de leveduras, observando que certos genótipos são amplamente distribuídos geograficamente (Kleinegger *et al.*, 1996; Clemons *et al.*, 1997; McCullough *et al.*, 1999; Hannula *et al.*, 2001).

Muitas pesquisas têm demonstrado, portanto, que um *cluster* principal de isolados de *C. albicans*, geneticamente relacionados, usualmente predomina em uma dada população de indivíduos, num determinado local geográfico, indicando uma especificidade regional dessa espécie (Schmid *et al.*, 1993; Hellstein *et al.*, 1993). Além disso, segundo Schmid *et al.* (1999), é possível que tais linhagens geneticamente homogêneas de *C. albicans* façam parte de um grupo maior, geograficamente disseminado e ecologicamente bem sucedido. Analisando, então, por *fingerprinting* com a sonda genética Ca3, 266 isolados de *C. albicans* provenientes de pacientes com diversas formas de candidose, em 12 regiões geográficas de 6 países distintos, estes autores relataram a existência de um *cluster* disseminado pelas regiões estudadas, e encontrado como agente etiológico predominante em todas as formas de candidose, em todas as populações analisadas, e que, por isso, deveria ser um foco de atenção dos pesquisadores. Ainda para Schmid *et al.* (1999), tais linhagens seriam provenientes de grupos de cepas ancestrais, comuns a todas as regiões, e que parte de seu sucesso como patógenos, pode ser explicado pela sua versatilidade, pois, além de predominarem sobre outras linhagens, nos processos infecciosos, também ocorrem como organismos comensais, em diferentes tipos de hospedeiros. Estas linhagens foram então denominadas de *General Purpose Genotype*.

Alguns autores têm observado ainda, através de diferentes metodologias moleculares, o compartilhamento de linhagens de *C. albicans* por indivíduos não relacionados (Bartie *et al.*, 2001; Hannula *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002; Al-Karaawi *et al.*, 2002; Boriollo *et al.*, 2004). Bartie *et al.* (2001), utilizando o método PCR-*fingerprinting* com uma combinação de diferentes *primers*, para analisar isolados de *C. albicans*, provenientes de grupos de indivíduos com e sem candidose, relataram que sete linhagens foram compartilhadas entre 35 pacientes não relacionados. Segundo tais autores, uma possível explicação para este fato pode ser a existência de uma especificidade geográfica para determinadas populações de *C. albicans*. A ocorrência endêmica dessas linhagens pode ser resultante de processos de seleção natural, que poderia favorecer a colonização por uma linhagem específica da levedura.

Entretanto, para Kam & Xu (2002), o compartilhamento de linhagens é observado principalmente em pacientes hospitalizados e imunologicamente comprometidos e, portanto, mais susceptíveis de adquirir microrganismos exógenos, por exemplo, por transmissão interpessoal (Huang *et al.*, 1998), ou ainda em casos de terapia com fluconazol, onde um diferentes indivíduos são colonizados por um grupo de linhagens resistentes a este antifúngico (Xu *et al.*, 2000). Mehta *et al.* (1999), estudando a distribuição de linhagens de *C. albicans* entre famílias, por PFGE, REA e RAPD, também não encontraram o compartilhamento de linhagens entre indivíduos saudáveis provenientes de famílias distintas.

Além disso, há outra questão controversa na literatura, de que um mesmo sítio anatômico possa ou não ser multicolonizado por linhagens distintas de *C. albicans*. Por exemplo, alguns autores observaram que um mesmo sítio pode abrigar diferentes linhagens dessa espécie (Anthony *et al.*, 1995; Kleinegger *et al.*, 1996; Xu J *et al.*, 1999; Bartie *et al.*, 2001; Samaranayake *et al.*, 2003); no entanto outros relatam que a maioria dos indivíduos colonizados abriga, usualmente, uma única linhagem de *C. albicans* (Hellstein *et al.*, 1993; Mehta *et al.*, 1999; Hannula *et al.*, 2001).

Essa discrepância de resultados pode ser devido a fatores como diferenças na capacidade discriminatória das técnicas utilizadas e/ou à interpretação dos resultados (Hannula *et al.*, 1997), assim como a heterogeneidade das populações estudadas, o que

interfere no controle das variáveis (Xu J *et al.*, 1999). Tais observações indicam a necessidade de padronização dos grupos populacionais e dos diferentes métodos que fornecem a mensuração da distância genética entre as linhagens, com o objetivo de gerar bases de dados confiáveis para análises comparativas e retrospectivas entre os estudos (Pujol *et al.*, 1997).

De acordo com Hannula *et al.* (2001) e Samaranayake *et al.* (2003), aparentemente, indivíduos mais susceptíveis de desenvolver infecções clínicas tendem a ser colonizados por várias linhagens de *C. albicans*. Utilizando o método de RAPD, Samaranayake *et al.* (2003), relataram que indivíduos infectados pelo HIV comumente abrigam, simultaneamente, múltiplas linhagens de *C. albicans*, e que a presença de mais de um tipo clonal pode ter importantes implicações terapêuticas, como a diferença na susceptibilidade aos antifúngicos, e a seleção de cepas resistentes. Estes autores sugerem que indivíduos com comprometimento imune deveriam ser monitorados para a presença de múltiplas linhagens dessa levedura. Um outro estudo reportou a ocorrência simultânea de mais de uma linhagem de *C. albicans* na cavidade bucal de um indivíduo HIV-positivo e em outro indivíduo HIV-negativo (Howell *et al.* 1996).

Como a maioria dos estudos epidemiológicos sobre esses microrganismos é feita em populações com diversos tipos e graus de comprometimento imune, sendo ainda pequeno o conhecimento sobre a distribuição das espécies e subespécies de *Candida* em populações homogêneas saudáveis, alguns autores sugerem maiores pesquisas neste campo, visto que a ocorrência de espécies de *Candida*, mesmo como comensais, pode ser importante do ponto de vista clínico (Lockhart *et al.*, 1995; Kam & Xu, 2002; Al-Karaawi *et al.*, 2002).

Algumas pesquisas têm sido dirigidas também com a finalidade de acessar a diversidade genotípica de isolados subgingivais de *C. albicans* (Lamster *et al.*, 1998; Hannula *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002). Por exemplo, a relação entre os isolados de *C. albicans* provenientes da mucosa bucal e aqueles de áreas subgingivais, ainda é um assunto pouco explorado, principalmente quanto à diversidade genotípica e a susceptibilidade aos antifúngicos (Pizzo *et al.*, 2002). Estes autores, através de cariotipagem eletroforética, analisaram 29 isolados subgingivais de *C. albicans*, em 9 indivíduos HIV-positivos,

demonstrando a ocorrência de diversidade genética entre estes isolados; embora tivessem sido encontrados, neste estudo, isolados subgingivais geneticamente similares aos provenientes da mucosa bucal, algumas linhagens de *C. albicans* foram encontradas exclusivamente nos sítios subgingivais, sugerindo que a colonização desses ambientes não ocorre apenas como resultado da difusão de leveduras das superfícies mucosas para os espaços subgingivais, mas que também é possível que algumas cepas sofram processos adaptativos nestes ambientes.

A partir desses dados, Pizzo *et al.* (2002), concluíram, portanto, que antifúngicos como o fluconazol e itraconazol deveriam ser utilizados, associados à terapia convencional, no tratamento das infecções periodontais oportunistas por *C. albicans*, principalmente em HIV-positivos e naqueles indivíduos de risco à candidose sistêmica. A diversidade clonal de leveduras subgingivais foi também analisada, por AP-PCR, por Hannula *et al.* (2001), em 60 indivíduos sistemicamente saudáveis, provenientes da Finlândia, Estados Unidos e Turquia; analisando 5 isolados subgingivais de *C. albicans* por indivíduo, estes autores encontraram 27 perfis genotípicos distintos.

Como a maioria dos estudos tem abordado a caracterização de cepas de *C. albicans* da mucosa bucal ou de sítios extra-bucais (Schmid *et al.*, 1993; Kleinegger *et al.*, 1996; Clemons *et al.*, 1997), alguns autores sugerem, portanto, que são necessários estudos adicionais sobre a colonização subgingival por tais fungos, visando a caracterização fenotípica e molecular de diferentes linhagens, auxiliando, assim, a esclarecer seu papel como patógenos periodontais (Hannula *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002).

3 PROPOSIÇÃO

A presente pesquisa tem como proposta:

- Verificar a ocorrência de *Candida* spp., em 3 sítios anatômicos da cavidade bucal: bolsa periodontal, sulco gengival saudável e mucosa dos lábios, bochechas, gengivas, palato e dorso de língua, de pacientes sistemicamente saudáveis, de ambos os gêneros, feminino e masculino, com diagnóstico de doença periodontal crônica ou agressiva;
- Verificar a atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases, pelos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- Analisar, pelo método de RAPD, a diversidade genotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, bem como sua distribuição, e a possível correlação entre as linhagens com os sítios bucais e os gêneros, masculino ou feminino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção dos pacientes

Na presente pesquisa foram selecionados 53 pacientes da Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, de ambos os gêneros (33 mulheres e 20 homens), com idades entre 23 e 61 anos (média de $40,5 \pm 10,15$ anos), apresentando diagnóstico de doença periodontal, crônica ou agressiva, porém sem relato de enfermidades sistêmicas. Cada paciente deveria apresentar, como critérios de inclusão: *i*) no mínimo 20 dentes presentes, em ambos os arcos; *ii*) no mínimo, 6 sítios subgingivais com bolsas periodontais (profundidade de sondagem acima de 3mm; sangramento e/ou supuração), denominados sítios A; e *iii*) 6 sítios subgingivais saudáveis (profundidade de sondagem de até 3mm e ausência de sangramento e/ou supuração), denominados sítios B (Pizzo *et al.*, 2002; Hannula *et al.*, 2001). Como critérios de exclusão foram empregados os seguintes parâmetros: *i*) enfermidades sistêmicas e/ou uso de medicamentos relacionados à ocorrência de *Candida spp.*; *ii*) antibioticoterapia nos últimos 6 meses; *iii*) tratamento periodontal nos últimos 12 meses antecedentes à coleta; *iv*) manifestações clínicas de candidose bucal; e, *v*) uso de próteses dentais removíveis ou aparatos ortodônticos (Nikawa *et al.*, 1998; McMullan-Vogel *et al.*, 1999; Alves, 2003).

Esta pesquisa foi conduzida de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras Sobre Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução nº196/96 - Conselho Nacional de Saúde 1996 - <http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>), a qual também foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo no. 008/2003 - <http://www.fop.unicamp.br/cep/>).

4.2. Coleta das amostras

Para cada paciente foram coletadas amostras do sítio A (bolsa periodontal), sítio B (sulco gengival saudável) e sítio C (mucosa bucal: gengiva, palato duro, bochechas e dorso de língua). Foram empregados espelho bucal, sonda periodontal milimetrada com marcação tipo Williams e pontas de papel absorvente esterilizados (# 35 – 55, Endpoints

Indústria e Comércio Ltda., Paraíba do Sul, RJ, Brasil).

Previamente às coletas subgingivais, foi feito o isolamento relativo de cada dente selecionado com roletes de algodão, e o biofilme supragengival foi removido através de curetas, bolinhas de algodão e fio dental; para evitar a contaminação pela microbiota salivar foram feitas a sucção da saliva e a secagem do dente com jatos de ar. As amostras dos sítios A ou B foram obtidas através da inserção dos cones de papel absorvente nas bolsas periodontais e sulcos gengivais, respectivamente, durante, aproximadamente, 20 segundos, e, sempre que possível, em um sítio A ou B por sextante, dos dois arcos dentais, perfazendo um total de seis sítios A e seis sítios B por paciente. Posteriormente, as amostras de ambos os sítios subgingivais foram transferidas, separadamente, para microtubos contendo 500 μ L de solução salina estéril (0,9% NaCl), de modo que formassem um *pool* para o sítio A e outro para o sítio B. As amostras do sítio C foram obtidas através de zaragatoas (*swab*) e, em seguida, transferidas para tubos contendo solução salina estéril. O volume das amostras (inóculo original) calculado para o sítio A foi de 60 μ L, para o sítio B de 40 μ L, e para o sítio C, de 170 μ L. Imediatamente após as coletas, as amostras foram conduzidas ao laboratório de microbiologia da FOP, para a identificação das leveduras, segundo metodologias descritas previamente (Sandven, 1990; Kleinegger *et al.*, 1996; Reynaud *et al.*, 2001). A figura 1 ilustra a coleta dos sítios anatômicos bucais.

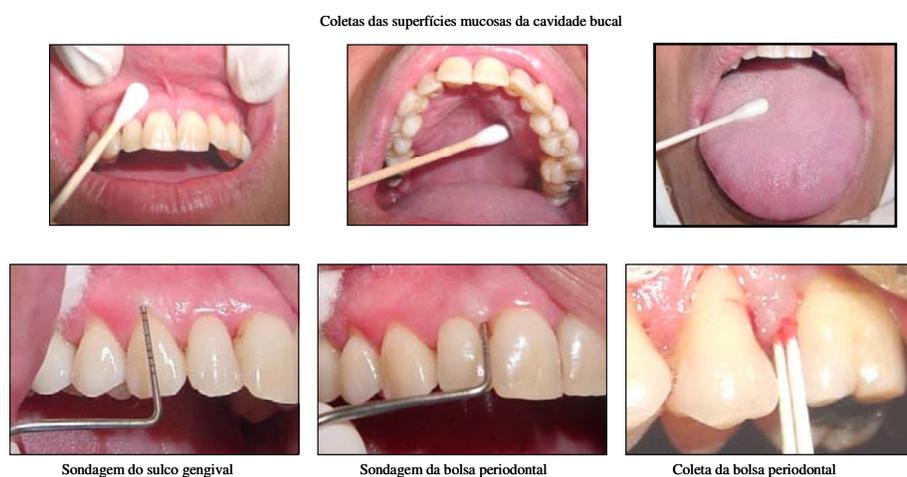


Figura 1. Procedimentos de coletas dos sítios bucais A, B e C.

4.3. Identificação preliminar das amostras

Os microtubos (2mL) contendo as amostras dos sítios A e B foram agitados em vortex (Vortex MA162, Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram diluídas (10^{-1}), semeadas (100 μ L) em duplicata sobre meio de cultura cromogênico Chromagar Candida[®] (CHROMagar Microbiology, BioMerieux, Paris, France) e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o desenvolvimento das culturas, foram realizados testes de produção de clamidósporos em ágar-fubá e coloração de Gram. Um total de cinco colônias sugestivas de *C. albicans* e/ou *C. dubliniensis*, por sítio (máximo de 15 colônias/paciente), foi selecionado e armazenado em tubos de ensaio contendo 5mL de meio inclinado ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Germany), preenchido com óleo mineral estéril, e em microtubos contendo 3mL de meio Sabouraud dextrose caldo e glicerol estéril (concentração final de 20%) a -70°C (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Baumgartner *et al.*, 1996).

4.4. Identificação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* por PCR específico

Os isolados bucais identificados preliminarmente como *C. albicans* ou *C. dubliniensis* através da produção de clamidósporos e crescimento em meio cromogênico, foram submetidos à análise por PCR específico a fim de confirmar suas identidades, conforme estudos prévios (Baumgartner *et al.*, 2000; Donnelly *et al.*, 1999; Losberger & Ernst, 1989).

Extração de DNA. A extração do DNA dos isolados bucais de *C. albicans* foi realizada conforme o método descrito previamente (Doyle & Doyle, 1990), adaptado. Culturas celulares foram desenvolvidas em meio YPD (Extrato de Levedura 1% m/v, Peptona 2% m/v e Glicose 2% m/v, Merck, Darmstadt, Germany) a 37°C por 18-24 horas. Após o crescimento, alíquotas de 1,5mL de cultura foram transferidas para microtubos e centrifugadas a 5000 \times g por 5 minutos para a remoção do sobrenadante. Em seguida, as células foram homogeneizadas com 650 μ L de tampão de extração (10mM Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; 100 μ g/mL proteinase K), mantidas a 65°C por 30 minutos, emulsionadas com 650 μ L de clorofórmio:álcool isoamil (24:1) por movimentos de inversão, e centrifugadas a 12000 \times g a 4 °C por 7 minutos. A fase aquosa superior

resultante foi transferida para novos microtubos contendo 200 μ L de tampão de extração (sem proteinase K) e 650 μ L de clorofórmio:álcool isoamil (24:1), e novamente emulsionadas por movimentos de inversão, e centrifugadas a 12000 \times g a 4 °C por 7 minutos. Uma repetição adicional deste último passo foi realizada. Então, o DNA foi precipitado com 1 vol. de isopropanol gelado, centrifugado a 12000 \times g a 4 °C por 7 minutos, lavado com etanol 70%, novamente centrifugado a 12000 \times g a 4 °C por 7 minutos, seco a temperatura ambiente, e ressuspenso em tampão TE (10mM Tris-HCl; 0,1mM EDTA pH 7,5) acrescido de ribonuclease (RNase 10 μ g/mL) a 37 °C por 30 minutos. O DNA de cada isolado foi quantificado por dosagem espectrofotométrica a 260nm (Genesys 10UV, Rochester, NY, USA), padronizado para 120ng/ μ L, e armazenado a -20 °C até o momento de uso. A integridade do DNA foi checada através de eletroforese em gel de agarose.

Primers e amplificação. *Primers* específicos para *C. albicans* (*sense* 5' - CGA TTC AGG GGA GGT AGT GAC - 3' e *anti-sense* 5' - GGT TCG CCA TAA ATG CGT ACC AG - 3') (BAUMGARTNER *et al.*, 2000) e *C. dubliniensis* (*sense* 5' - GTA TTT GTC GTT CCC CTT TC - 3' e *anti-sense* 5' - GTG TTG TGT GCA CTA ACG TC - 3') (Donnelly *et al.*, 1999) foram empregados para amplificar uma região do gene 18S rRNA de 276 bp e uma região do gene *ACT1* de 288pb, respectivamente. O DNA das linhagens padrões de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. dubliniensis* CD 36 foram empregadas como controle positivo e negativo do método PCR específico. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo 1 \times tampão de PCR (20mM Tris HCl pH 8,4, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTPs (*deoxynucleoside triphosphates*), 300mM de cada *primer*, 120ng de DNA genômico e 5U de *Taq* DNA polimerase (InvitrogenTM Brasil Ltda.). As amplificações foram conduzidas em termociclador convencional Geneamp PCR Systems 2400 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Inc. Shelton, CT, USA) empregando um programa inicial para a desnaturação do DNA a 94 °C por 5 minutos, seguido de 38 ciclos a 94 °C por 1 minuto (desnaturaçã), 53 °C por 1 minuto (anelamento) e 72 °C por 1½ minuto (extensão). O ciclo final foi conduzido a 72 °C por 10 minutos para a extensão final (Baumgartner *et al.*, 2000) com algumas adaptações.

Eletroforese e coloração das bandas. Volumes de 10µL dos produtos amplificados foram misturadas com 5µL de tampão de carregamento (glicerol 10% v/v; azul de bromofenol 1% m/v em água destilada), sobre parafilmeTM, e separadas em géis de agarose 1% m/v [TBE 1× (89mM Tris-base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA)]. A eletroforese foi conduzida em sistema vertical (Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) e contínuo (tampão TBE 1×). Rapidamente, volumes de 10µL dessas misturas foram aplicados no gel e submetidos a uma tensão de 60 V/cm (PowerPac 200, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 60 minutos. Como controle positivo, produtos amplificados do DNA genômico das linhagens padrões de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. dubliniensis* CD 36 foram colocados nas extremidades de cada gel, ao lado de marcadores de massa molecular (100 bp DNA ladder, Gibco, Grand Island, NY, USA). Após a corrida eletroforética, as bandas de DNA foram coradas com solução de brometo de etídio. (0,5µg/mL) por 10 minutos, visualizadas em transluminador UV (Pharmacia LKB-MacroVue, San Gabriel, CA, USA), fotografadas (Image Master – LISCAP, VDS, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e analisadas.

4.5. Avaliação da produção de exoenzimas

Os testes para avaliar a atividade enzimática extracelular de proteinases aspartil e de fosfolipases pelos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram feitos utilizando meios de cultura contendo albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin Fração V 1% m/v, Yeast Nitrogen Base 0,15% m/v, Glicose 2% m/v e Agar 2% m/v) e gema de ovo (Peptona 1% m/v, Glicose 3% m/v, NaCl 5,7% m/v, CaCl₂ 0,06% m/v, Agar 2%, *Egg Yolk* 5%), respectivamente (Price *et al.*, 1982; Lane & Garcia, 1991; Candido *et al.*, 2000; Zaugg *et al.*, 2001). A padronização do inóculo para 10⁷ UFC/mL foi feita por espectrofotometria (D.O. 560nm) sob leitura de absorbância equivalente a 1,2. Um volume de 5µL de cada isolado foi inoculado, em duplicata, em pontos equidistantes, perfazendo 4 isolados por placa e, então, incubados a 37°C por 4 dias (teste de fosfolipases) e 7 dias (teste de proteinases).

A atividade enzimática P_z (*zona de atividade enzimática*), para ambas as exoenzimas, foi detectada pela formação de um halo opaco de precipitação ao redor da colônia de levedura, de acordo com a metodologia de Price *et al.* (1982), através da expressão $P_z = \frac{dc}{dc + zp}$, onde dc corresponde ao diâmetro da colônia (mm) e zp corresponde à zona de precipitação (mm). Os resultados foram interpretados da seguinte maneira:

- a) $P_z = 1$ – ausência de atividade enzimática (índice zero);
- b) $1 > P_z > 0,64$ – atividade enzimática positiva (índice 1);
- c) $P_z < 0,64$ – atividade enzimática fortemente positiva (índice 2).

4.6. Genotipagem de *C. albicans* e *C. dubliniensis* por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Para avaliar uma possível existência de diferentes linhagens (subtipos) de *C. albicans* e *C. dubliniensis* na população estudada e, ainda, correlacionar possíveis grupos dessas linhagens com os parâmetros do hospedeiro (gênero e sítios bucais), foi feita a genotipagem dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* pelo método molecular de RAPD, empregando dois *primers* descritos previamente na literatura (Sanz *et al.*, 1996; Hannula *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 2003).

Primers e amplificação. Os *primers* arbitrários AP-03 (5' - TCA CGA TGC A - 3') e OPA-03 (5' - AGT CAG CCA C - 3') foram empregados, separadamente, para a genotipagem dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O DNA das linhagens-padrão de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. dubliniensis* CD 36 foram empregadas como controle positivo do método RAPD. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µL contendo 1× tampão de PCR (20mM Tris HCl pH 8,4, 50mM KCl), 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTPs (*deoxynucleoside triphosphates*), 0,4µM de *primer*, 120ng de DNA genômico e 5U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Brasil Ltda.). As amplificações foram conduzidas em termociclador convencional Geneamp PCR Systems 2400 (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Inc. Shelton, CT, USA) empregando um programa inicial para a desnaturação do DNA a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a

94 °C por 1 minuto (desnaturação), 36 °C por 2 minutos (anelamento) e 72 °C por 2 minutos (extensão). O ciclo final foi conduzido a 72 °C por 5 minutos para a extensão final (Sanz *et al.*, 1996; Hannula *et al.*, 1997).

Eletroforese e coloração das bandas. Volumes de 10µL dos produtos amplificados foram misturadas com 6µL de tampão de carregamento (glicerol 10% v/v; azul de bromofenol 1% p/v em água destilada), sobre parafilmeTM, e separadas em géis de agarose 1% p/v [TBE 1× (89mM Tris-base, 89mM ácido bórico, 2mM EDTA)]. A eletroforese foi conduzida em sistema vertical (Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) e contínuo (tampão TBE 1×). Volumes de 16µL dessas misturas foram aplicados no gel e submetidos a uma tensão de 88 volts (PowerPac 200, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 2 horas e 40 minutos. Como controle positivo e para assegurar a reprodutibilidade dos resultados, produtos amplificados do DNA genômico das linhagens padrões de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. dubliniensis* CD 36 foram sistematicamente colocados nas extremidades e centro de cada gel ao lado de marcadores de massa molecular (100 bp DNA ladder, Gibco, Grand Island, NY, USA). Após a corrida eletroforética, as bandas de DNA foram coradas com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 10 minutos, visualizadas em transluminador UV (Pharmacia LKB-MacroVue, San Gabriel, CA, USA), fotografadas (Image Master – LISCAP, VDS, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) e analisadas (Hannula *et al.*, 1997).

Análise de agrupamento: padrões de DNA amplificados pelo método de RAPD (AP-03 e OPA-03) foram expressos numericamente por seus valores de mobilidade no gel (mm). Os valores de mobilidade foram convertidos em valores binários do tipo 1 e 0, cujas representações correspondem à presença e ausência de bandas, respectivamente. Os isolados de *C. albicans*, bem como aqueles isolados de *C. dubliniensis*, foram caracterizados pelas combinações das bandas de alta e média intensidade, e reprodutíveis após dois ensaios independentes, de modo que distintas combinações de bandas polimórficas foram designadas de tipos eletroforéticos (ET1, ET2, ET3,...) (Selander *et al.*, 1986; Casanova *et al.*, 1991; Pujol *et al.*, 1997).

O relacionamento genético entre os isolados bucais de *C. albicans* e *C.*

dubliniensis foi determinado pelo coeficiente de similaridade *Simple Matching*, $S_{SM} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$, o qual admite a utilização de dados a partir de valores binários. Deste modo, a matriz de similaridade genética (*trellis diagrams*) foi elaborada e tratada pelo método de agrupamento SHAN algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*), a fim de gerar uma árvore com classificações bidimensionais, denominada dendrograma (Sneath & Sokal, 1973). Essas análises foram realizadas com o auxílio do programa NTSYS-pc 1.70 (Rohlf, 1988). As linhagens padrões de *C. albicans* ATCC 90028 e *C. dubliniensis* CD 36 foram incluídas nestas análises a fim de estabelecer a correlação cofenética entre os isolados bucais e determinar a reprodutibilidade.

4.7. Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados foram utilizados os seguintes testes: χ^2 (comparação da prevalência de *Candida* spp., e do grau de atividade enzimática de fosfolipases entre os sítios anatômicos bucais e os gêneros masculino ou feminino); teste exato de Fischer (comparação da prevalência de *C. albicans* em relação às demais espécies de *Candida* e da prevalência de *Candida* spp. entre fumantes e não fumantes); teste t de Student (comparação do número de sítios colonizados, e da diversidade genética entre os gêneros), e teste ANOVA – análise paramétrica de variância - (comparação número de UFC/mL, e da diversidade genética entre os sítios). As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1. Prevalência de *Candida* spp.

Um total de 21 pacientes (39,6%) com diagnóstico de doença periodontal (14 entre 33 mulheres e sete entre 20 homens), sem relato de comprometimento sistêmico, foi colonizado por *Candida* spp., em um ou mais sítios anatômicos bucais (14 pacientes positivos no sítio A; oito no sítio B e 20 no sítio C). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na colonização por espécies de *Candida* entre os gêneros (teste χ^2 ; $p = 0,5922$), nem entre os sítios (teste χ^2 ; $p = 0,1287$). Dos pacientes colonizados, foram selecionadas 206 colônias de leveduras, (média de $9,8 \pm 4,54$ colônias por paciente) das quais 159 colônias (média de $8,8 \pm 2,95$ colônias por paciente) foram sugestivas de *C. albicans* e/ou *C. dubliniensis*, por meio de suas características fenotípicas, como a cor verde em meio cromogênico e a produção de clamidósporos em microcultivo. Os demais isolados assumiram cores diferentes do verde, e não produziram clamidósporos, sendo sugestivos, portanto, de outras espécies de *Candida* (Figura 2). Empregando o método de PCR específico foi possível confirmar a identidade de 156 colônias de *C. albicans* (média de $8,6 \pm 3,02$ colônias por paciente) e três colônias de *C. dubliniensis* (isoladas de um único paciente, do gênero feminino) (Figura 3).

Foi observado que 11 pacientes abrigavam apenas *C. albicans*; sete eram portadores simultâneos de *C. albicans* e outras espécies de *Candida*, sendo que um deles, abrigava também *C. dubliniensis*, no sítio A. Nos demais três pacientes foram isoladas apenas outras espécies de *Candida* (Figura 4). Desse modo, dos 21 pacientes colonizados por *Candida* spp., 18 abrigavam *C. albicans*, e 10 pacientes abrigavam outras espécies de *Candida*, única ou simultaneamente a *C. albicans*. Uma maior prevalência de *C. albicans*, em relação às demais espécies foi considerada estatisticamente significativa pelo teste exato de Fischer ($p=0,0088$).

Figura 2. Identificação presuntiva por meio cromogênico e microcultivo. (A) Colônias verdes e produção de clamidósporos, sugestivas de *C. albicans*/*C. dubliniensis*. (B). Cores diferentes do verde, sugestivas de outras espécies de *Candida*

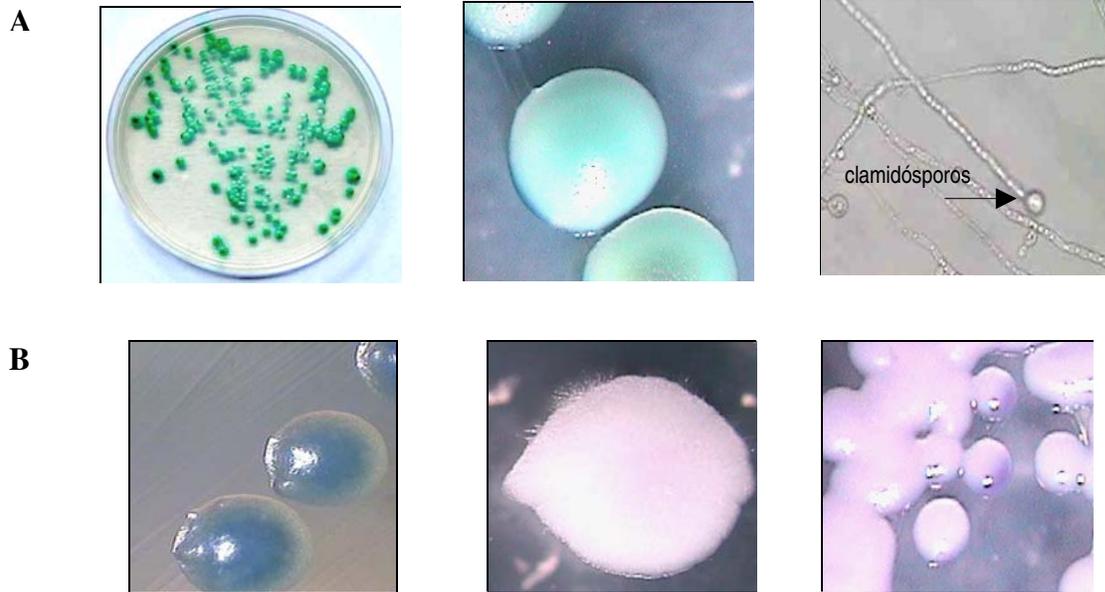


Figura 3. Perfis eletroforéticos dos padrões amplificados de DNA de *C. albicans* (A. gene 18S rRNA – 276bp) e *C. dubliniensis* (B. gene *ACT1*- 288bp) provenientes de três sítios bucais (A, B e C), de pacientes com doença periodontal.

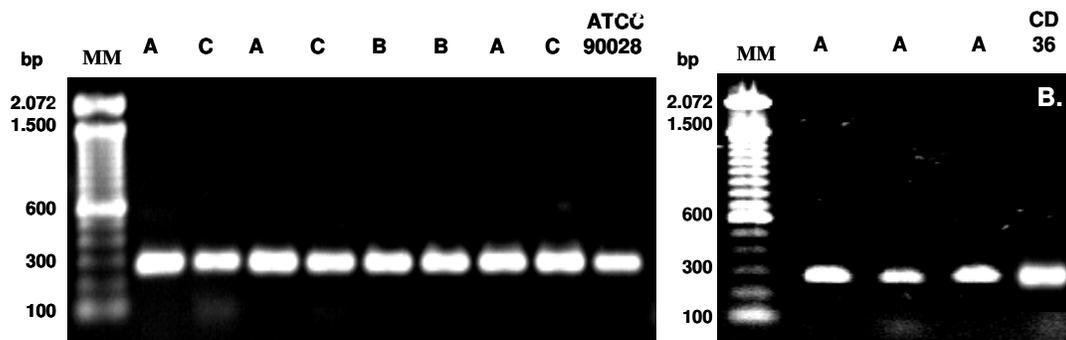
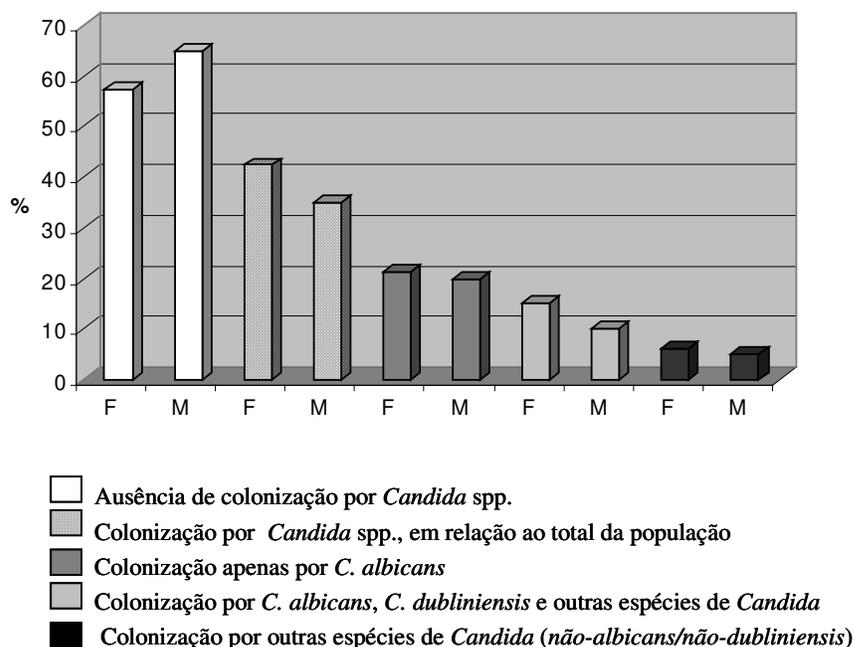


Fig.4. Prevalência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e outras espécies relacionadas ao gênero *Candida* em três sítios bucais (A, B e C), de pacientes com doença periodontal.



A avaliação da prevalência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e de outras espécies relacionadas do gênero *Candida*, nos três sítios anatômicos bucais - A, B ou C, de 14 mulheres e sete homens, revelou um padrão variável de colonização (colonização em múltiplos sítios: ABC, AC e BC, ou em um único sítio, A ou C. Não houve colonização isolada do sítio B). Das 14 mulheres colonizadas, 57% foram positivas nas bolsas periodontais, 50% no sulco gengival, e 100% na mucosa bucal. Dos sete homens colonizados, 86% foram positivos nas bolsas periodontais, 14% no sulco gengival, e 86% na mucosa bucal. Duas mulheres e um homem abrigavam, na cavidade bucal, exclusivamente outras espécies que não *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, no sítio C (Tabela 1). Não houve diferença significativa na colonização por espécies de *Candida* entre os gêneros, em relação aos três sítios bucais (teste χ^2 ; sítio A, $p=0,213$; sítio B, $p=0,1328$; sítio C, $p=0,3333$).

Tabela.1. Prevalência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e de outras espécies relacionadas do gênero *Candida* em três sítios bucais (A, B e C) de pacientes com doença periodontal.

Sítios bucais	ABC		AC		BC		A		C		Total		Total geral
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
Colonizadores													
<i>C.albicans</i>	3	1	2	3	1	-	-	-	1	-	7	4	11
<i>C. albicans</i> e outras espécies de <i>Candida</i> (inclusive <i>C. dubliniensis</i>)	2	-	1	1	1	-	-	1	1	-	5	2	7
<i>Candida</i> spp. (não- <i>albicans</i> , não- <i>dubliniensis</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1	2	1	3
Σ total	5	1	3	4	2	-	-	1	4	1	14	7	21
Ausência <i>Candida</i> spp.											19	13	32
Σ total											33	20	53

A (bolsa periodontal), B (sulco gengival saudável), C (mucosa bucal: gengiva, palato duro, bochechas e dorso de língua), F (gênero feminino) e M (gênero masculino).

De um total de 63 sítios possíveis de serem colonizados (máximo de três sítios por paciente), 42 foram positivos para *Candida* spp. (média de $2 \pm 0,77$ sítios/paciente), sendo 29 sítios em 14 mulheres (média de $2,0 \pm 0,78$ sítios/paciente) e 13 sítios em 7 homens (média de $1,9 \pm 0,69$ sítios/paciente). Não houve diferença significativa, no número de sítios colonizados, em relação aos gêneros, feminino ou masculino (teste t de Student, $p=0,6877$). *C. albicans* foi encontrada, unicamente ou simultaneamente a outras leveduras relacionadas, em 90,4% dos 42 sítios colonizados, sendo isolada em 100% das bolsas periodontais positivas, assim como em 87,5% dos sulcos gengivais, e em 85% das mucosas bucais. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros, em relação à colonização por *C. albicans*, nos 3 sítios analisados (Sítio A, 100% de colonização por *C. albicans*, em ambos os gêneros; p valor não calculado; teste χ^2 ; sítio B, $p= 0,8750$; teste χ^2 ; sítio C, $p= 0,6807$).

Tabela 2. Número de colônias totais de leveduras (UFC/mL) desenvolvidas em meio cromogênico CHROMagar Candida[®], provenientes de três sítios anatômicos bucais (A, B e C) de pacientes com doença periodontal.

Pacientes	Sítio A	Sítio B	Sítio C
1	0	$4,6 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$
3	$1,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$
13	$1,1 \times 10^5$	0	$4,6 \times 10^2$
14	$3,8 \times 10^4$	$7,7 \times 10^2$	$9,2 \times 10^2$
15	$1,0 \times 10^4$	0	$4,6 \times 10^2$
26	$6,3 \times 10^5$	0	$8,2 \times 10^3$
30	$6,2 \times 10^3$	0	0
31	$1,0 \times 10^4$	0	$2,6 \times 10^3$
34	$1,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$
36	0	0	$2,2 \times 10^3$
41	$6,2 \times 10^4$	0	$3,9 \times 10^3$
42	0	$1,1 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$
45	0	0	$3,4 \times 10^2$
46	0	0	$2,3 \times 10^2$
47	$3,8 \times 10^4$	0	$2,3 \times 10^2$
50	$3,8 \times 10^3$	0	$4,6 \times 10^2$
53	0	0	$1,0 \times 10^3$
55	$2,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$
56	0	0	$1,1 \times 10^3$
57	$7,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	$4,6 \times 10^2$
58	$4,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^2$
Média	$2,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$
D. padrão	$5,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^4$	$7,6 \times 10^3$

O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), obtidos em meio cromogênico foi, em média, de $2,4 \times 10^5 \pm 5,5 \times 10^5$ UFC/mL para o sítio A; $1,3 \times 10^4 \pm 5,1 \times 10^4$ UFC/mL para o sítio B, e de $3,5 \times 10^3 \pm 7,6 \times 10^3$ UFC/mL para o sítio C (Tabela 2). O sítio A apresentou maior número de UFC/mL, enquanto os sítios C e B apresentam quantidades estatisticamente iguais (teste ANOVA, $p=0,0319$).

Em relação ao hábito de fumar, dos 53 pacientes examinados, 11 pacientes (20,7%) faziam uso diário de tabaco. Destes 11, quatro (36%) foram colonizados por *Candida* spp. Dos 42 pacientes não fumantes, 17 (40%) foram positivos para esses microrganismos, em um ou mais sítios anatômicos bucais. Esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa pelo teste exato de Fischer ($p=0,8039$).

5.2. Avaliação da produção de aspartil proteinases e fosfolipases

5.2.1. Aspartil proteinases.

Todos os isolados de *C. albicans* analisados ($n=156$) demonstraram forte atividade de aspartil proteinase, independentemente dos sítios anatômicos bucais e do gênero. Os valores P_z variaram de 0,16 a 0,36 para os isolados do sítio A; de 0,18 a 0,25 para os isolados do sítio B e de 0,17 a 0,34 para os isolados do sítio C (Tabela 3 e Figura 6). Os três isolados identificados como *C. dubliniensis*, provenientes do sítio A de um paciente do sexo feminino, também exibiram forte atividade de aspartil proteinase.

Os isolados de *C. albicans* fortemente produtores de aspartil proteinase são mostrados na Figura 5.

Figura 5. Isolados de *C. albicans* fortemente produtores de aspartil proteinases em meio contendo albumina bovina fração V. O halo de precipitação ao redor da colônia representa a produção da exoenzima.



5.2.2. Fosfolipases.

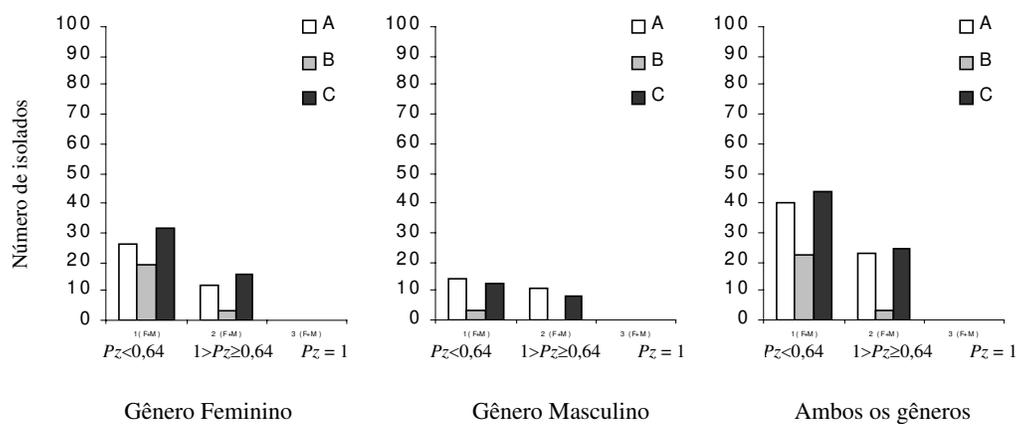
Todos os isolados de *C. albicans* demonstraram atividade enzimática positiva ou fortemente positiva de fosfolipases, com valores P_z variando de 0,40 a 0,88 para os isolados do sítio A, de 0,47 a 0,80 para os isolados do sítio B e de 0,40 a 0,90 para os isolados do sítio C (Tabela 4 e Figura 7). Dos 63 isolados de *C. albicans* no sítio A, 63,4% exibiram atividade de fosfolipases fortemente positiva; dos 25 isolados no sítio B, 88% exibiram atividade de fosfolipases fortemente positiva e dos 68 isolados no sítio C, 64,7% exibiram atividade de fosfolipases fortemente positiva. Os demais isolados demonstraram atividade enzimática apenas positiva. Não houve diferença significativa entre os sítios quanto ao grau de atividade enzimática de fosfolipases (teste χ^2 , $p = 0,5505$). Dos 49 isolados de *C. albicans*, provenientes de indivíduos do gênero masculino, 61% eram fortemente positivos para fosfolipases, bem como 71% dos 107 isolados de *C. albicans*, provenientes de indivíduos do gênero feminino. Não houve diferença significativa quanto ao grau de atividade enzimática de fosfolipases entre os gêneros (Teste χ^2 , $p = 0,290$).

Tabela 4. Isolados de *C. albicans* produtores de fosfolipase provenientes de três sítios bucais (A, B e C), de pacientes com doença periodontal.

Sítios Bucais	Atividade de Fosfolipases														Total
	$Pz < 0,64$				$1 > Pz \geq 0,64$				$Pz = 1$				Σ	Σ	
	F		M		F		M		F		M		F	M	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	n	
A	26	68,4	14	56,0	12	31,6	11	44,0	0	0,0	0	0,0	38	25	63
B	19	86,4	3	100,0	3	13,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0	22	3	25
C	31	66,0	13	61,9	16	34,0	8	38,1	0	0,0	0	0,0	47	21	68

A, B e C correspondem aos sítios bolsa periodontal, sulco gengival mucosa bucal, respectivamente. F e M correspondem ao gênero feminino e masculino, respectivamente.

Figura 7. Prevalência de isolados de *C. albicans* produtores de fosfolipases, provenientes de três sítios bucais (A, B e C) de pacientes com doença periodontal.



Os isolados de *C. albicans* fortemente produtores ou apenas produtores de fosfolipases são mostrados na Fig. 8 e 9. Os três isolados de *C. dubliniensis* exibiram atividade positiva ($n = 1$ isolados) e fortemente positiva ($n = 2$ isolados) de fosfolipase.

Fig.8. Isolados de *C. albicans* produtores (A) ou fortemente produtores (B) de fosfolipase em meio enriquecido com *Egg yolk*, após 4 dias de incubação. O halo de precipitação ao redor da colônia representa a produção da exoenzima.

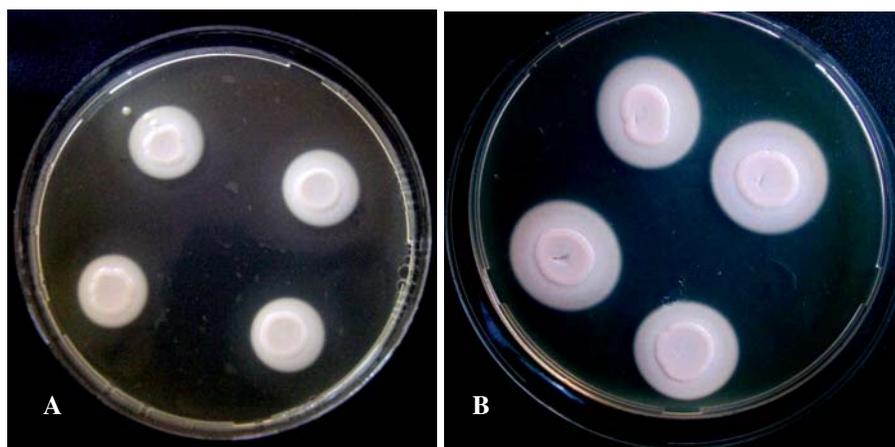
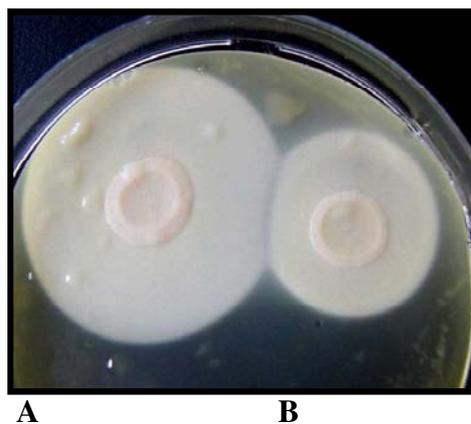


Fig.9. Isolados de *C. albicans* fortemente produtores (A) ou produtores (B) de fosfolipase em meio enriquecido com *Egg yolk*, após 7 dias de incubação. O halo de precipitação ao redor da colônia representa a produção da exoenzima.



5.3. Genotipagem de *C. albicans* e *C. dubliniensis* por RAPD

Os perfis eletroforéticos dos isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, obtidos através do método de RAPD, utilizando dois *primers* arbitrários (AP-03 e OPA-03), estão representados nas Figuras de 10 a 14. O *primer* AP-03 gerou 11 tipos eletroforéticos distintos (média de $14,18 \pm 19,37$ isolados/ET) de *C. albicans* e um tipo eletroforético de *C. dubliniensis*; O *primer* OPA-03 gerou cinco tipos eletroforéticos distintos (média de $31,20 \pm 65,30$ isolados/ET) de *C. albicans* e um tipo eletroforético de *C. dubliniensis*. A combinação de ambos os *primers* gerou 16 tipos eletroforéticos distintos de *C. albicans* e um tipo eletroforético de *C. dubliniensis*.

Figura 10. Perfis eletroforéticos dos padrões de RAPD (A. AP-03 e B. OPA-03) de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, provenientes de três sítios bucais (A, B e C) de pacientes com doença periodontal.

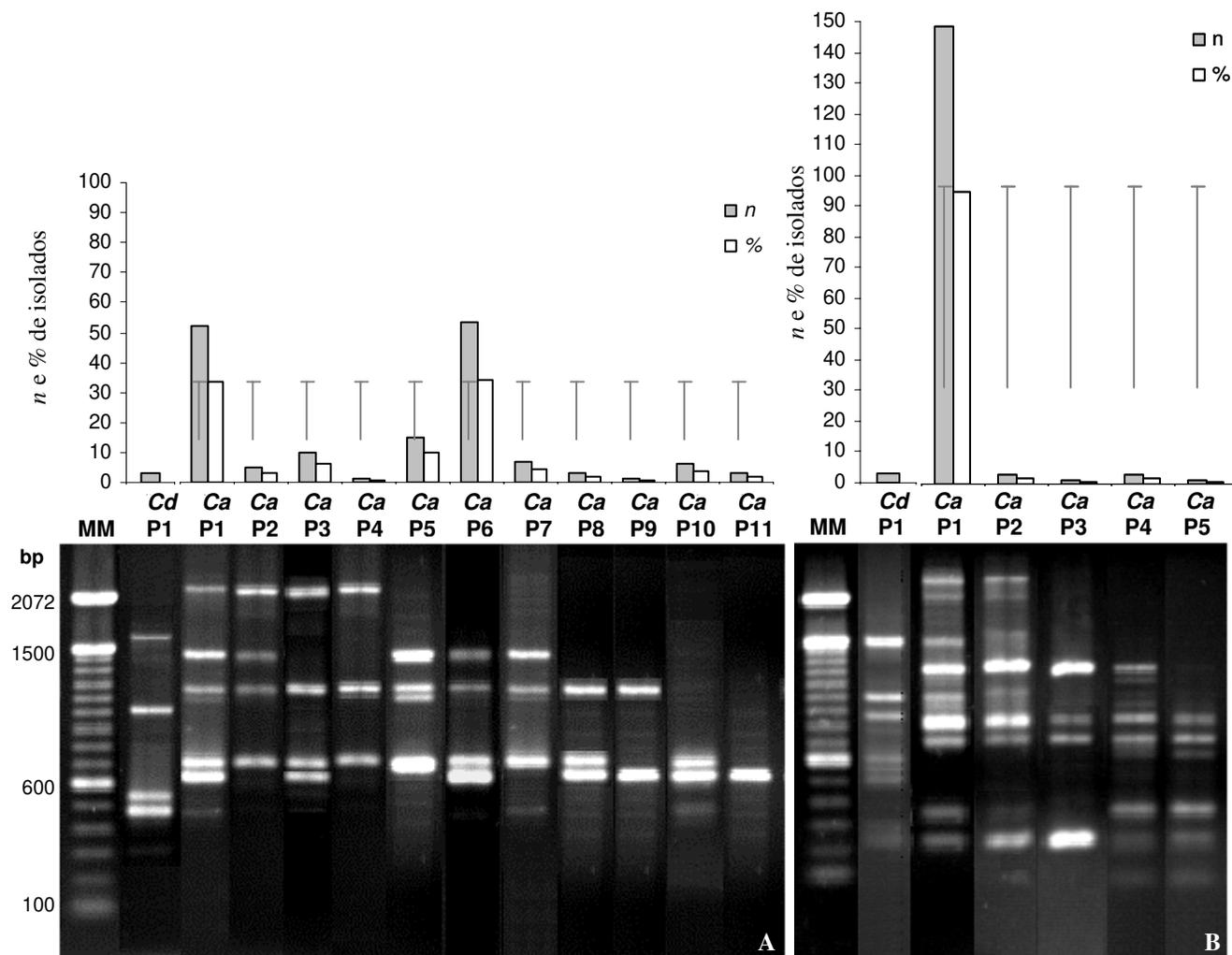
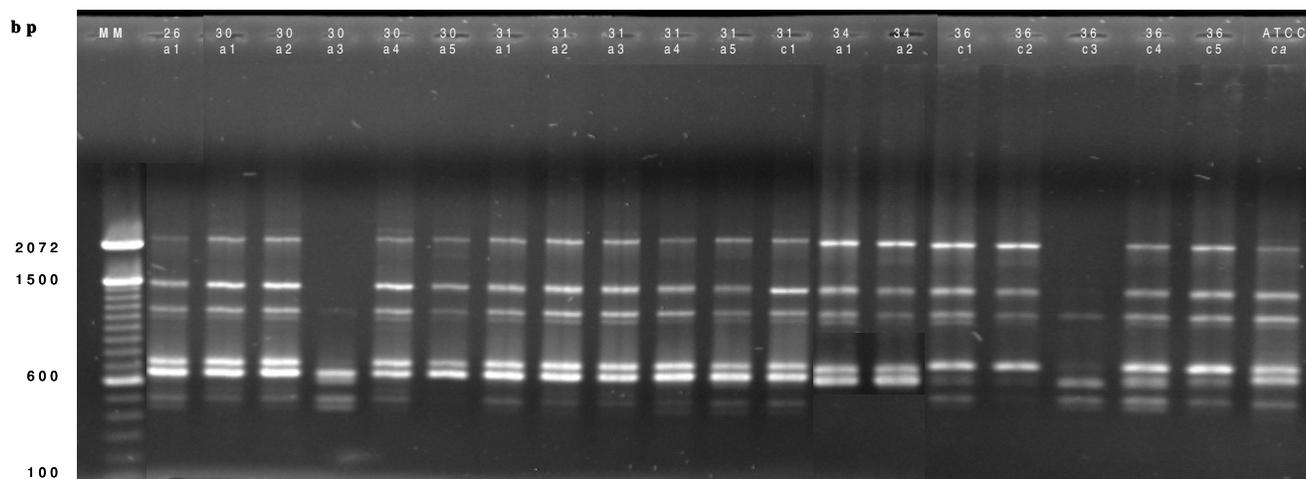
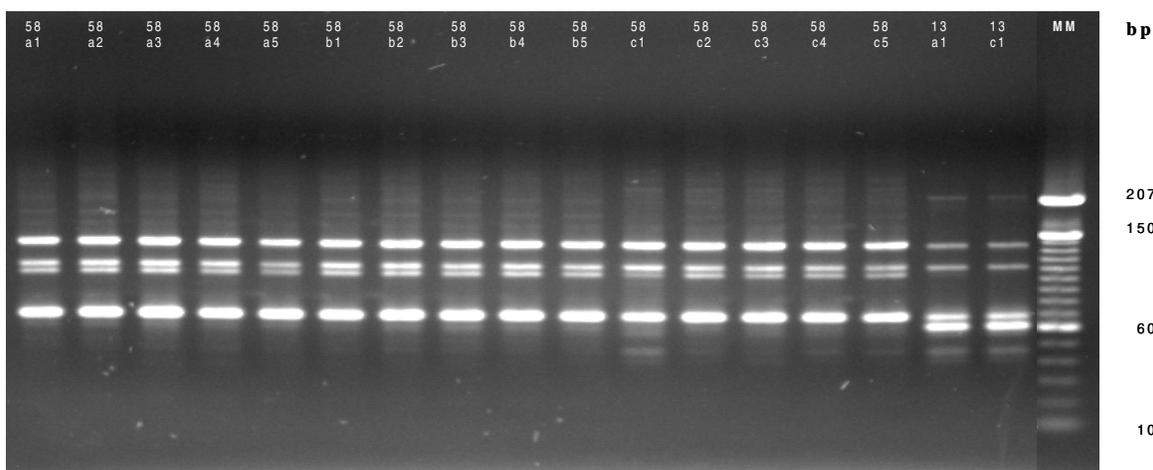


Figura 11. Gel representativo das linhagens de *C. albicans*, obtidas com o *primer* AP-03, nos 3 sítios bucais, em pacientes de ambos os gêneros. Foi observada a ocorrência de mais de uma linhagem num mesmo indivíduo (pacientes 30 e 36), assim como o compartilhamento de uma mesma linhagem entre diferentes indivíduos (pacientes 26, 30, 31 e 36).



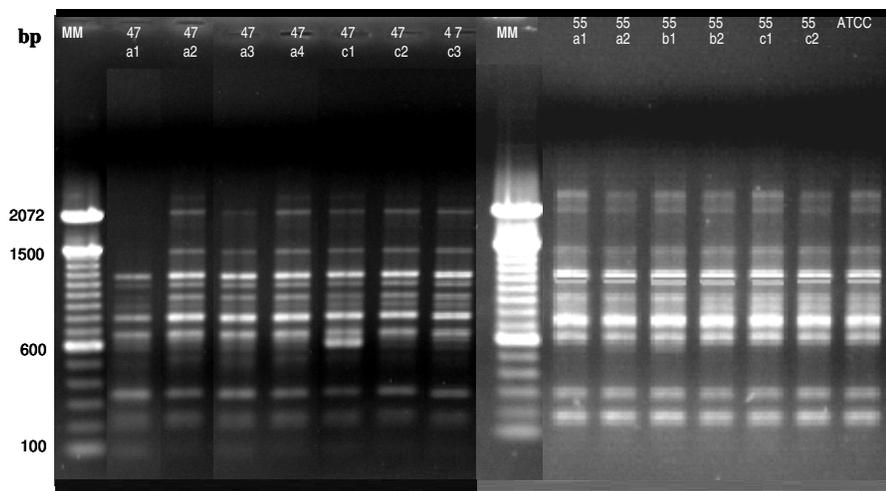
Código das amostras: 1^o. número corresponde ao número do voluntário; letras a, b, c correspondem aos sítios bucais; 2^o. número corresponde ao número do isolado. ATCC (90028): cepa-padrão de *C. albicans*.

Figura 12. Gel representativo das linhagens de *C. albicans*, obtidas com o *primer* AP-03, nos 3 sítios bucais, em pacientes de ambos os gêneros. Foi observada a ocorrência de uma única linhagem no paciente 58, bem como a ocorrência de uma mesma linhagem nos sítios A e C (paciente 13).



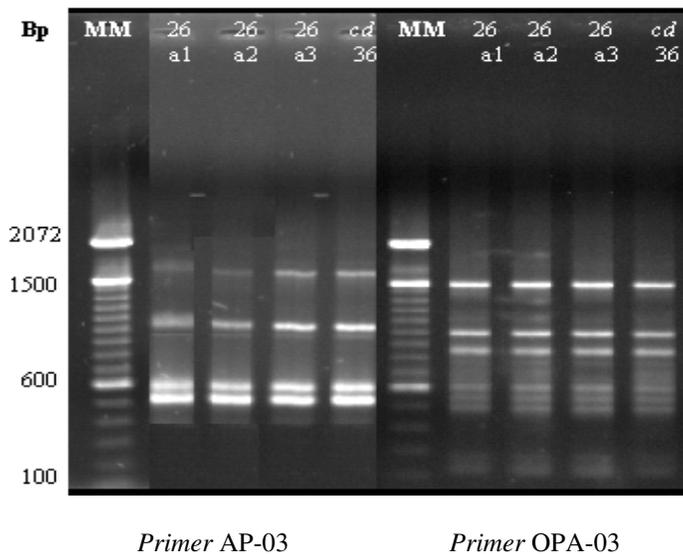
Código das amostras: 1^o. número corresponde ao número do voluntário; letras a, b, c correspondem aos sítios bucais; 2^o. número corresponde ao número do isolado.

Figura 13. Gel representativo das linhagens de *C. albicans*, obtidas com o *primer* OPA-03, nos 3 sítios bucais, em pacientes de ambos os gêneros. Foi observada a ocorrência de mais de uma linhagem por indivíduo (paciente 47), bem como uma única linhagem por indivíduo (paciente 55).



Código das amostras: 1^o. número corresponde ao número do voluntário; letras a, b, c correspondem aos sítios bucais; 2^o. número corresponde ao número do isolado. ATCC (90028): cepa-padrão de *C. albicans*.

Figura 14. Gel representativo das linhagens de *C. dubliniensis*, isoladas de bolsas periodontais em um paciente do gênero feminino.



Código das amostras: 1^o. número corresponde ao número do voluntário; a letra “a” corresponde ao sítio bucal bolsa periodontal; 2^o. número corresponde ao número do isolado. Cd 36 – Cepa-padrão de *C. dubliniensis*.

A similaridade genética entre os isolados bucais de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, apresentada no dendrograma UPGMA, permitiu distinguir quatro grupos moderadamente relacionados de *C. albicans* ($0,684 \leq S_{SM} \leq 0,839$), cada um constituído de isolados altamente relacionados entre si ($0,879 \leq S_{SM} \leq 1,0$), e um grupo de *C. dubliniensis* ($S_{SM} = 1,0$), que apresentou baixo relacionamento com os demais grupos de *C. albicans* ($S_{SM} = 0,284$) (Figura 15):

Grupo I: 148 isolados de *C. albicans* (94,9%), com $0,879 \leq S_{SM} \leq 1,0$, incluindo a linhagem padrão de *C. albicans* (ATCC 90028), distribuídos entre 11 linhagens distintas (ET1, ET3, ET4, ET5, ET6, ET7, ET10, ET11, ET12, ET13 e ET14), encontradas em todos os sítios bucais, e em pacientes de ambos os gêneros. Não houve correlação com os sítios bucais ou com o gênero (Tabelas 5 e 6). Tais linhagens demonstraram atividade fortemente positiva de proteinases, e atividade positiva ou fortemente positiva de fosfolipases (Tabela 7).

Grupo II: três isolados de *C. albicans* (1,91%), com $S_{SM} = 1,0$, pertencentes a uma única linhagem (ET2), encontrada apenas no sítio A e no gênero feminino (Tabelas 5 e 6), demonstraram atividade enzimática fortemente positiva para ambas as exoenzimas (Tabela 7).

Grupo III: três isolados de *C. albicans* (1,91%), distribuídos entre duas linhagens (ET8 e ET9), com $0,958 \leq S_{SM} \leq 1,0$, encontradas apenas no bucal A e no gênero masculino (Tabelas 5 e 6), demonstraram atividade enzimática fortemente positiva para proteinases, mas atividade apenas positiva para fosfolipases (Tabela 7).

Grupo IV: dois isolados de *C. albicans* (1,27%), distribuídos entre duas linhagens (ET15 e ET16), com $0,917 \leq S_{SM} \leq 1,0$, encontrados apenas no sítio A, sendo o ET15 no gênero masculino e o ET16 no gênero feminino (Tabelas 5 e 6), demonstraram atividade enzimática fortemente positiva de proteinases e ambos os graus de atividade enzimática para fosfolipases (Tabela 7).

Grupo V: os 3 isolados de *C. dubliniensis*, incluindo a linhagem padrão CD 36, com $S_{SM} = 1,0$, pertencentes a uma única linhagem, denominada ET1 *Cd*, foram encontrados apenas no sítio bucal A de um único paciente do gênero feminino (Tabelas 5 e 6), e demonstraram atividade fortemente positiva de proteinases, e atividade positiva e fortemente positiva de fosfolipases (Tabela 7).

Figura 15. Relacionamento genético entre as linhagens de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Dendrograma UPGMA gerado a partir da matriz de similaridade. ET (Tipo Eletroforético) corresponde ao subtipo de Ca (*C. albicans*) e Cd (*C. dubliniensis*).

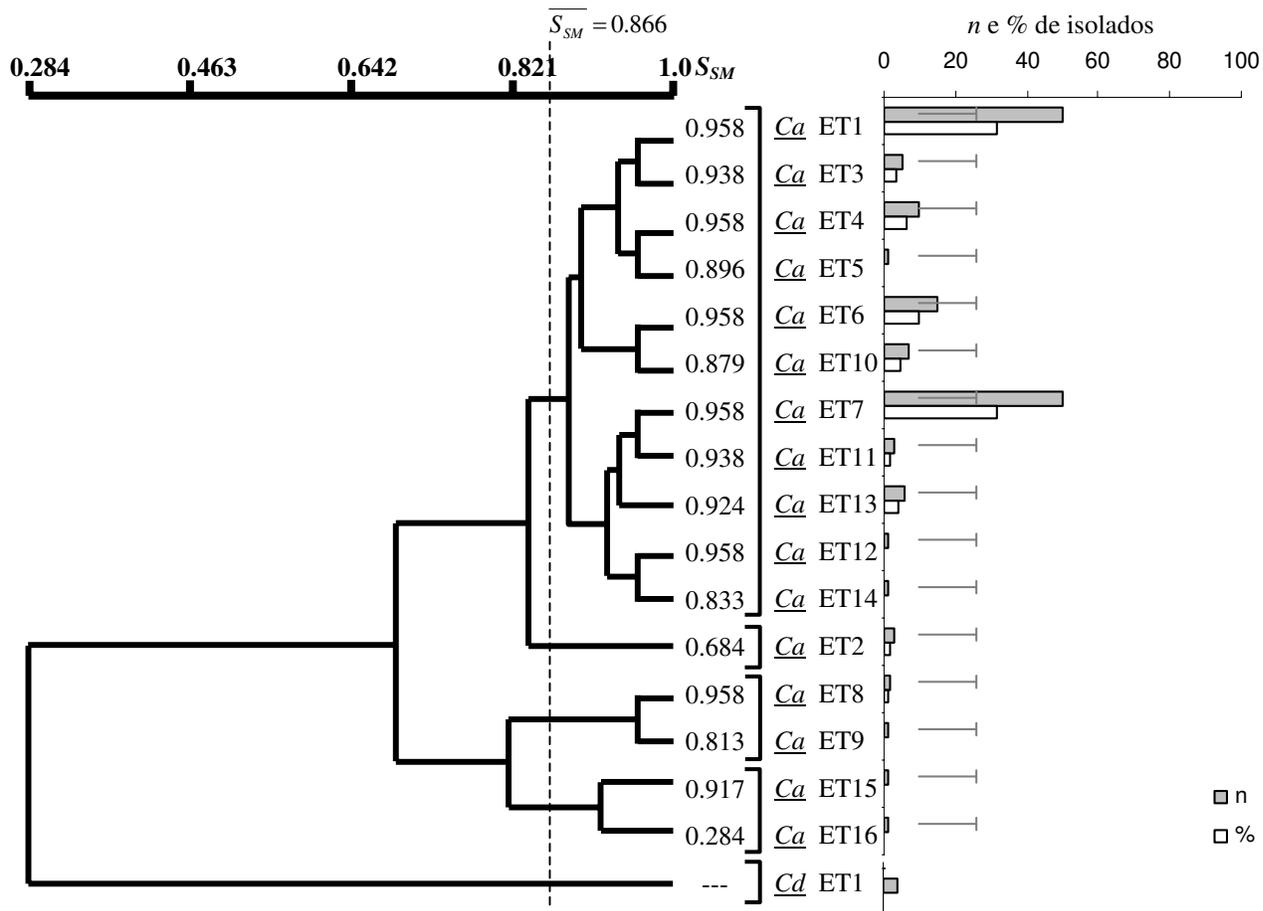


Tabela 5. Correlação entre as linhagens (ET) de *C. albicans* ou *C. dubliniensis* e os sítios bucais (A, B e C), e os gêneros masculino e feminino, com base nos grupos gerados no dendrograma UPGMA de similaridade genética S_{SM} .

Grupo	ET	Sítios Bucais (Feminino)				Sítios Bucais (Masculino)				Isolados		Pacientes [$n = 18$ (12F e 6M)]	
		A	B	C	$n F$	A	B	C	$n M$	Σ ET	%	Σ pacient es	%
I	ET1	9	10	17	8	9	-	4	2	49+CP <i>ca</i>	31,4+CP <i>ca</i>	10	55,5
	ET3	-	-	5	2	-	-	-	-	5	3,2	2	11,1
	ET4	4	-	6	2	-	-	-	-	10	6,4	2	11,1
	ET5	1	-	-	1	-	-	-	-	1	0,6	1	5,5
	ET6	5	5	5	1	-	-	-	-	15	9,6	1	5,5
	ET7	5	6	8	6	12	3	16	4	50	32,0	10	55,5
	ET10	5	-	2	2	-	-	-	-	7	4,4	2	11,1
	ET11	2	1	-	2	-	-	-	-	3	1,9	2	11,1
	ET12	-	-	1	1	-	-	-	-	1	0,6	1	5,5
	ET13	3	-	3	3	-	-	-	-	6	3,8	3	16,6
	ET14	-	-	-	-	-	-	1	1	1	0,6	1	5,5
	Σ	34	22	47	*	21	3	21	*	148+CP <i>ca</i>	94,9+CP <i>ca</i>	-	-
	II	ET2	3	-	-	1	-	-	-	-	3	1,9	1
Σ		3	-	-	-	-	-	-	-	151+CP <i>ca</i>	96,8+CP <i>ca</i>	-	-
III	ET8	-	-	-	-	2	-	-	1	2	1,2	1	5,5
	ET9	-	-	-	-	1	-	-	1	1	0,6	1	5,5
	Σ	-	-	-	-	3	-	-	-	154+CP <i>ca</i>	98,8+CP <i>ca</i>	-	-
IV	ET15	-	-	-	-	1	-	-	1	1	0,6	1	5,5
	ET16	1	-	-	1	-	-	-	-	1	0,6	1	5,5
	Σ	1	-	-	-	1	-	-	-	156+CP <i>ca</i>	100+CP <i>ca</i>	-	-
V	ET1	3	-	-	1	-	-	-	-	3+CP <i>cd</i>	1,8	1	5,5
	Σ	3	-	-	-	-	-	-	-	3+CP <i>cd</i>	1,8+CP <i>cd</i>	1	5,5
Σ Total		41	22	47	12*	25	3	21	6*	159+2CP	100+2CP	18*	100*

* Alguns pacientes abrigavam mais de um tipo eletroforético (ET) de *C. albicans*. CP: Cepa padrão - *ca*: *C. albicans*; *cd*: *C. dubliniensis*. ■ Linhagens predominantes de *C. albicans*.

Tabela 6. Linhagens de *C. albicans*/*C. dubliniensis* em três sítios bucais (A, B e C), de pacientes com doença periodontal, com base nos grupos gerados no dendrograma UPGMA de similaridade genética S_{SM} .

Código dos pacientes	ET	ET 1	ET 2	ET 3	ET 4	ET 5	ET 6	ET 7	ET 8	ET 9	ET1 0	ET1 1	ET1 2	ET1 3	ET1 4	ET1 5	ET1 6
		<i>Cd</i>	<i>Ca</i>														
1	E5	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
3	E2	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	E1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	E5	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
15	E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
26	E1; E2	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	E2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
31	E1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	E2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
36	E3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
41	E3	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
42	E1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	E3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
50	E2	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
53	E3	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
55	E4	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
57	E1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	E1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ET, *Cd*, *Ca*, e ■ correspondem à linhagem (ET – *electrophoretic type*), *C. dubliniensis*, *C. albicans*, e código dos pacientes masculinos, respectivamente.

Tabela 7. Linhagens de *C. albicans*/*C. dubliniensis* produtores de exoenzimas aspartil proteinases e fosfolipases, com base nos grupos gerados no dendrograma UPGMA de similaridade genética S_{SM} .

Exoenzima	P_z	ET1	ET1	ET2	ET3	ET4	ET5	ET6	ET7	ET8	ET9	ET1 0	ET1 1	ET1 2	ET1 3	ET1 4	ET1 5	ET1 6
		<i>Cd</i>	<i>Ca</i>															
Aspartil Proteinase	++	3	49	3	5	10	1	15	50	2	1	7	3	1	6	1	1	1
	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	3	49	3	5	10	1	15	50	2	1	7	3	1	6	1	1	1
Fosfolipase	++	2	38	3	3	9	1	10	32	-	-	-	3	1	2	-	-	1
	+	1	11	-	2	1	-	5	18	2	1	7	-	-	4	1	1	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Σ	3	49	3	5	10	1	15	50	2	1	7	3	1	6	1	1	1

++, + e - correspondem a atividade enzimática fortemente positiva, positiva e negativa, respectivamente.

Os 63 isolados de *C. albicans*, provenientes dos sítios A, foram distribuídos em 13 linhagens distintas (média de $4,85 \pm 5,80$ isolados/linhagem); os 25 isolados dos sítios B foram distribuídos em 4 linhagens (média de $6,25 \pm 4,11$ isolados/linhagem), e os 68 isolados dos sítios C foram distribuídos em 9 linhagens ($7,67 \pm 8,89$ isolados/linhagem). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sítios A, B e C, quanto à diversidade genotípica de *C. albicans* (teste ANOVA, $p=0,6431$). Os 107 isolados de *C. albicans*, provenientes de pacientes do gênero feminino, foram distribuídos em 12 linhagens distintas (média de $8,92 \pm 10,26$ isolados/linhagem). Os 49 isolados provenientes do gênero masculino, foram distribuídos em 6 linhagens (média de $8,17 \pm 12,14$ isolados/linhagem). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros masculino ou feminino, quanto à diversidade genotípica de *C. albicans* (teste t de student, $p=0,892$).

6 DISCUSSÃO

As leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, especialmente *C. albicans*, são consideradas organismos ecologicamente bem sucedidos, pela capacidade de participar da microbiota comensal de vários sítios anatômicos do hospedeiro, bem como de causar infecções oportunistas (De Repentigny *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000). Na cavidade bucal tais leveduras são encontradas em uma parte significativa da população, colonizando os diversos micro-ambientes fornecidos por este *habitat*.

O presente trabalho analisou a ocorrência dessas espécies em um grupo de pacientes adultos (23 a 61 anos de idade), com diagnóstico de periodontite crônica ou agressiva, em três sítios bucais distintos: (A) sítios subgingivais inflamados que manifestavam perda de suporte periodontal (bolsa periodontal); (B) sítios subgingivais sem sinais clínicos de inflamação e sem perda de suporte periodontal (sulco gengival) e (C) mucosa bucal clinicamente saudável, sem manifestação clínica de candidose, com ênfase nas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, com o objetivo de analisar suas características fenotípicas e genotípicas. Dos 53 pacientes examinados, 39,6% foram positivos para espécies de *Candida*, em um ou mais sítios bucais, sendo 37,7% na mucosa, proporção esta semelhante à observada em populações adultas sistemicamente saudáveis (Arendorf & Walker, 1980; Odds, 1988; Masipa *et al.*, 1992; Lynch *et al.*, 1994; Darwazeh & Al-Bashir, 1995; Akpan & Morgan, 2002). No entanto, grandes variações têm sido relatadas na literatura (Hannula *et al.*, 1999; Samaranayake *et al.*, 2001; Campisi *et al.*, 2002).

Segundo Campisi *et al.* (2002), tais variações podem ser decorrentes de fatores como populações heterogêneas, provenientes de diferentes localidades geográficas, com hábitos e condições bucais distintos; além disso, também podem ser consequência dos métodos de amostragem utilizados – *swabs*, saliva, enxágues bucais, impressões em alginato, dentre outros. Para estes autores, as culturas provenientes de enxágues bucais são mais sensíveis para a detecção e quantificação de leveduras, mas de acordo com Arendorf & Walker (1980), a técnica de *imprint* – espátulas estéreis, embebidas em caldo *Sabouraud*, e pressionadas contra as mucosas – fornece os melhores resultados. Estes

autores demonstraram, por este método, uma prevalência de leveduras na mucosa bucal em 44,4% de 54 adultos saudáveis e dentados, proporção maior do que a obtida por outras técnicas empregadas neste mesmo estudo. No entanto, outros pesquisadores têm utilizado *swabs* para a coleta de leveduras nas superfícies mucosas (Rams *et al.*, 1990; Brady *et al.*, 1996; Kleinegger *et al.*, 1996; Xu J *et al.* 1999; Kam & Xu, 2002). Kleinegger *et al.* (1996) isolaram *Candida* spp. em 40% de 172 indivíduos saudáveis e dentados, resultados semelhantes, portanto, aos obtidos por outras técnicas.

No presente estudo, foi utilizado um *swab* estéril, passado repetidas vezes sobre a superfície mucosa dos lábios, bochechas, gengivas, palato duro e, finalmente, por toda a região do dorso da língua, de modo que a amostra constituísse um *pool* de leveduras de toda a mucosa bucal. Embora os resultados não diferissem da média reportada na literatura - para populações sistemicamente saudáveis - pode ser que, por ter sido utilizado o *swab* como método de coleta, a frequência encontrada esteja subestimada.

No estudo de Arendorf & Walker (1980), em indivíduos adultos, fatores como a presença de cáries e de doenças periodontais não influenciaram a prevalência destas leveduras; para estes autores, houve uma maior prevalência em mulheres, porém a diferença não foi significativa; esses dados concordam, portanto, com os da presente pesquisa, em que 42,4% das mulheres e 35% dos homens foram positivos para *Candida* spp., em um ou mais sítios da cavidade bucal. Entretanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,5922$).

Analisando cada sítio isoladamente, foi observado, no presente estudo, que 85,7% dos homens e 57,1% das mulheres foram positivos para leveduras nas bolsas periodontais; entretanto, essa diferença também não foi estatisticamente significativa, nem para este sítio ($p= 0,213$), e nem para os demais sítios analisados (sítio B, $p= 0,132$, sítio C, $p= 0,333$). Do mesmo modo, Kleinegger *et al.* (1996) não observaram diferença significativa entre os gêneros, na colonização das mucosas bucais por *Candida* spp. em relação ao total da população estudada; porém, na faixa etária de 30 a 45 anos, houve uma maior prevalência em mulheres. Tais autores observaram, no entanto, que estes resultados são específicos para uma população sistemicamente saudável, racial e economicamente homogênea, provenientes de uma única localidade geográfica (*Iowa City*, Estados Unidos),

e sem qualquer manifestação de infecção bucal. Masipa *et al.* (1992), analisando uma população de adultos saudáveis, na África, também encontraram maior prevalência bucal de *Candida* spp. em mulheres, em relação aos homens. Pires *et al.* (2002), analisando um grupo de pacientes edêntulos, em Piracicaba, SP, usuários de prótese total, com uma média de idade de 61,7 anos, relataram que a presença assintomática de *Candida* spp. na saliva, bem como a ocorrência de estomatite, foram mais frequentes no gênero feminino. Campisi *et al.* (2001), analisando um grupo de 136 italianos infectados pelo HIV, também concluíram que a candidose orofaríngea é uma lesão associada ao gênero, com uma prevalência significativamente maior em mulheres.

Entretanto, em outros estudos (Oliver & Shillitoe, 1984; Moalic *et al.*, 2001), os homens foram mais frequentemente colonizados. Diz Dios *et al.* (2001) e Feijoo *et al.* (2002), também não encontraram diferenças na prevalência dessa afecção entre os gêneros, em 200 espanhóis HIV-positivos. Segundo Feijoo *et al.* (2002), há muito poucas informações a respeito dos fatores biológicos - condições hormonais, diferenças no pH ambiental, ou uma maior atividade enzimática de proteinases por isolados de *C. albicans* - que poderiam predispor as mulheres a um risco aumentado de manifestarem candidose orofaríngea; além disso, para tais autores, não foi demonstrado haver diferenças significativas, entre homens e mulheres, no pH ou na composição da saliva, e nem há relatos de cepas de *C. albicans*, com maior atividade enzimática, colonizando preferencialmente mulheres. Por outro lado, hábitos comportamentais como uso de tabaco, higiene bucal, dieta rica em carboidratos, deficiências nutricionais como avitaminose B (Akpan & Morgan, 2002), além da possível transmissão de linhagens potencialmente virulentas entre parceiros sexuais (Feijoo *et al.* 2002), são também possíveis fatores de risco, tanto à colonização quanto à manifestação de infecções, em ambos os gêneros.

Portanto, devido à dificuldade de estimar a importância relativa de cada uma dessas condições predisponentes, e o quanto elas variam entre homens e mulheres, os resultados relatados por diferentes pesquisas são controversos, e esta questão ainda permanece inconclusiva. Como a implantação desses microrganismos na cavidade bucal de seres humanos é determinada por inúmeros fatores, atuando em conjunto, as diferenças entre os indivíduos - de uma maneira geral - podem ser mais importantes para a

colonização do que alguma possível predisposição relacionada ao gênero feminino. Além disso, tais fatores podem variar num determinado período de tempo, e, assim, a sobrevivência das espécies de *Candida*, nos sítios bucais, depende de um equilíbrio dinâmico entre as condições propícias oferecidas pelo *habitat*, num dado momento, e a resistência do hospedeiro à colonização. A capacidade destes fungos, principalmente *C. albicans*, de se adaptarem às variações ambientais, resistindo às barreiras naturais (Haynes, 2001), de aderir aos tecidos bucais, ou aos aparatos protéticos e ortodônticos (Nikawa *et al.*, 1998; Cannon *et al.*, 1995; Holmes *et al.*, 2002), bem como de participar da formação dos biofilmes dentais (Grimaudo & Nesbitt, 1997; O' Sullivan *et al.*, 2000; Jabra-Rizk *et al.*, 2001), são fatores ecológicos relevantes, que podem variar entre as diferentes espécies e subespécies de leveduras.

O uso de tabaco é outro fator associado, por alguns autores, com o aumento da frequência e da densidade de leveduras na cavidade bucal (Alkumru & Beydemir, 1992; Rindum *et al.*, 1994; Abu-Elteen & Abu-Alteen, 1998; Kamma *et al.*, 1999). Entretanto, outros estudos não observaram relação significativa entre o uso de tabaco e a prevalência de *C. albicans* (Oliver & Shillitoe, 1984; Borromeo *et al.*, 1999). É também possível que a característica multifatorial da colonização por esses fungos explique a grande variação encontrada por diferentes pesquisas. Na presente pesquisa, 20,7% dos pacientes examinados eram fumantes, sendo que 36,6% foram positivos em cultura para *Candida* spp. Entre os não fumantes a prevalência dessas leveduras foi de 40,4%, diferença não significativa estatisticamente (teste exato de Fischer, $p=0,8039$). No entanto, todos os 4 fumantes positivos para *Candida* foram colonizados nas bolsas periodontais. Em um deles, apenas este sítio foi positivo, em cultura, fato que não se repetiu com os demais 20 indivíduos colonizados. Em três dos quatro fumantes mais de uma espécie de *Candida* foram isoladas, uma das quais identificada como *C. dubliniensis*; entretanto *C. albicans* foi encontrada em todos eles, única ou simultaneamente a outras espécies.

Para possibilitar uma correta comparação da prevalência desses microrganismos, entre diferentes pesquisas, seria ideal que estudos bem controlados, utilizando populações homogêneas, permitissem a análise da influência de cada uma dessas variáveis na colonização por *Candida* spp. Porém, devido à grande diversidade dessas

condições, uma padronização estrita não é fácil de ser conseguida. Foram utilizados, no presente estudo, indivíduos adultos (de 23 a 61 anos; média de $40,5 \pm 10,15$ anos), provenientes de uma única localidade geográfica (Piracicaba-SP), com condições sócio-econômicas semelhantes, todos dentados e com diagnóstico de doença periodontal, não usuários de próteses totais ou parciais, sem sinais de candidose na mucosa bucal e sem relato de enfermidades sistêmicas ou terapias que pudessem influenciar a prevalência dessas espécies. Mais de um terço dos pacientes examinados apresentou *Candida* spp. na mucosa bucal, prevalência esta semelhante à relatada na literatura.

A presença desses fungos, mesmo em populações saudáveis, pode ser um fator de risco à infecção, visto que, quando uma parte dessas populações torna-se deficiente em seus sistemas orgânicos de defesa, nota-se um aumento tanto na colonização assintomática quanto na manifestação de candidoses (Davies *et al.*, 2002). Distintos grupos populacionais, acometidos por enfermidades e/ou submetidos a terapias medicamentosas que produzem um estado de depressão imune, demonstram uma maior prevalência de *Candida* na cavidade bucal (Samaranayake *et al.*, 1984; Odden *et al.*, 1994; Brady *et al.*, 1996; Magalhães *et al.*, 2001; Davies *et al.*, 2002; Fidel, 2002; Campisi *et al.*, 2002; Akpan & Morgan, 2002; Gugni *et al.*, 2003). No entanto, para Moore *et al.* (1993), as comparações diretas entre esses estudos são dificultadas, porque mesmo as populações imunologicamente comprometidas podem ser heterogêneas quanto aos demais aspectos de relevância à colonização.

Muitas pesquisas também têm sido feitas visando a detecção de *Candida* spp. em bolsas periodontais, com ênfase na espécie *C. albicans*, de modo a verificar a capacidade dessas espécies de sobreviverem nesses micro-ambientes, com o objetivo de esclarecer seu papel na patogênese das periodontites (Slots *et al.*, 1988; Dahlen & Wikstrom, 1995; Rams *et al.*, 1997; Reynaud *et al.*, 2001). A doença periodontal é uma das infecções mais comuns em seres humanos (MacCarinelli *et al.*, 2001), mas a progressão e a severidade dessas infecções polimicrobianas depende da ocorrência simultânea de um número de fatores – o hospedeiro deve ser susceptível, local e/ou sistemicamente, e o biofilme subgengival deve conter espécies patogênicas capazes de induzir inflamação e

destruição tecidual. A composição da microbiota tem sido, assim, considerada a principal influência no meio-ambiente subgingival (Kamma *et al.*, 1999).

De acordo com Socransky (1979), alguns requisitos são necessários para que um microrganismo seja considerado um patógeno periodontal potencial - por exemplo, tal microrganismo deve ocorrer em maiores números nos sítios doentes que nos sítios saudáveis; deve possuir fatores de virulência importantes para o início e a progressão das doenças periodontais, e a sua eliminação deveria conter a progressão da doença. As espécies de *Candida* parecem preencher muitos destes requisitos, e, embora seu papel seja ainda pouco conhecido, crescentes evidências têm sugerido uma participação desses fungos na patogênese das doenças periodontais (Slots & Genco, 1984; Epstein *et al.*, 1984; González *et al.*, 1987; Hägewald *et al.*, 2002; Järvensivu *et al.*, 2002).

Porém, exceto para populações imunocomprometidas (Zambon *et al.*, 1990; Rams *et al.*, 1991; Odden *et al.*, 1994; Velegraki *et al.*, 1999; Ryder, 2000), não há ainda uma conclusão definitiva quanto à relevância dessas leveduras nas periodontites que acometem indivíduos sistemicamente saudáveis, visto que são também consideradas comensais comuns da mucosa bucal, cuja presença nesses tecidos não indica, necessariamente, a ocorrência de infecções. Entretanto, tem sido reconhecido que *Candida* spp., particularmente *C. albicans*, possuem muitas características relevantes para a patogênese das doenças periodontais, como a capacidade de participar do biofilme dental (Cannon *et al.*, 1995; Nikawa *et al.*, 1998); de se aderir às células do hospedeiro, e inativar moléculas de defesa (Haynes, 2001); de invadir o tecido conjuntivo gengival (González *et al.*, 1987; Järvensivu *et al.*, 2004), de induzir reações inflamatórias (Haffajee & Socransky, 1994; Robinson, 1997; De Repentigny *et al.*, 2000; Hube & Naglik, 2001; Reynaud *et al.*, 2001); de responder rapidamente a alterações ambientais, como a adaptação a ambientes com diferentes pH (Calderone & Fonzi, 2001), e, principalmente, de produzir fatores de virulência como a secreção de enzimas, cujas principais são as aspartil proteinases e as fosfolipases (McMullan-Vogel *et al.*, 1999).

As espécies de *Candida* vêm sendo isoladas do biofilme subgingival em indivíduos imunocompetentes com diversas manifestações de periodontite, mas têm sido estudadas principalmente, como microrganismos superinfectantes, nos casos resistentes ou

considerados "refratários" à terapia periodontal convencional, e sua proporção aumenta após a administração sistêmica de antibióticos, como a doxiciclina, penicilina, eritromicina e espiramicina (González *et al.*, 1987; Slots *et al.*, 1988; Rams *et al.*, 1990; Helovuo *et al.*, 1993; Listgarten *et al.*, 1993; Olsvik *et al.*, 1995; Rams *et al.*, 1996). Slots *et al.* (1988) observaram que esses fungos, além de bacilos entéricos e *Pseudomonas*, ocorrem na microbiota subgingival de pacientes que continuam a perder suporte periodontal, mesmo após a utilização de antibióticos. Testes de sensibilidade demonstraram que tais leveduras foram resistentes às concentrações terapêuticas de tetraciclina, penicilina G e eritromicina (Slots *et al.*, 1988). Estes pesquisadores encontraram *Candida* spp., nas bolsas periodontais, em 16,8% de uma população de pacientes que manifestavam sítios resistentes à terapia periodontal mecânica, após serem submetidos a antibioticoterapia para a eliminação de bactérias periodontopatogênicas.

Na presente pesquisa, foi observado que 26,4% (14 de 53) dos pacientes abrigavam espécies de *Candida* nas bolsas periodontais. Tais espécies também estavam presentes, nesta população, em 15,1% (oito de 53) dos sulcos gengivais saudáveis, e em 37,7% (20 de 53) das superfícies mucosas. No entanto, nenhum desses pacientes havia recebido medicação antibiótica nos últimos seis meses, nem tratamento periodontal de qualquer espécie no último ano antecedente às coletas. Outros estudos também isolaram *C. albicans* de bolsas periodontais, em indivíduos sem história de antibioticoterapia na época das coletas (Järvensivu *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2001). Desse modo, para Reynaud *et al.* (2001), tais fungos podem ser habitantes comuns da microbiota subgingival, e não associados apenas aos casos de superinfecção periodontal.

Diferentes prevalências populacionais (14 a 29,8%) têm sido relatadas por diversos estudos, quanto ao isolamento de leveduras em bolsas periodontais, em adultos saudáveis sistemicamente. Um dos fatores que talvez pudesse explicar a variação encontrada é o número de sítios amostrados por indivíduo. Estudos examinando três sítios (Slots *et al.*, 1988) e dois sítios por indivíduo (Reynaud *et al.*, 2001), demonstram uma proporção semelhante (16,8% e 17,5%, respectivamente). Uma frequência um pouco maior (23,8%) foi encontrada por Rams *et al.* (1990), examinando quatro sítios por indivíduo, e por Yuan *et al.* (2001) que, examinando "a maioria" dos sítios periodontais inflamados,

obteve uma prevalência de 29,8%. No presente estudo, examinando seis sítios por indivíduo, foi observado que 26,4% da população abrigaram *Candida* spp. nas bolsas periodontais.

Reynaud *et al.* (2001) cultivaram os dois sítios examinados independentemente, e observaram que, em apenas seis dos 22 indivíduos positivos, as leveduras foram encontradas em ambas as bolsas periodontais amostradas. Os demais abrigavam *Candida* spp. em apenas uma das bolsas. Segundo os autores, este fato sugere que essas leveduras não são encontradas ubiqüamente, em todas as bolsas periodontais dos indivíduos positivos. Parece então, lógico, supor que a amostragem de um número maior de sítios aumente a chance de encontrar *Candida* spp. no biofilme subgengival de pacientes com doenças periodontais.

Assim como na mucosa bucal, a ocorrência desses fungos, tanto em bolsas periodontais como em sítios subgengivais não inflamados, também é maior em populações enfermas do que em indivíduos saudáveis. Yuan *et al.* (2001), examinando um grupo de diabéticos não insulino-dependentes e um grupo controle, quanto à ocorrência de *C. albicans* em bolsas periodontais e em sulcos gengivais sem sinais de inflamação, observaram que 18,1% diabéticos abrigavam leveduras nos sulcos gengivais, e 35,2% nas bolsas periodontais, enquanto 15,6% e 29,8% da população controle saudável abrigavam esses microrganismos nos ecossistemas citados, respectivamente, proporções bastante semelhantes, portanto, às encontradas no presente estudo. Para Yuan *et al.* (2001) é importante estudar a contribuição destas leveduras nas infecções periodontais de pacientes diabéticos, visto que a candidose bucal tem sido associada ao pobre controle metabólico da glicose, e que as bolsas periodontais poderiam se constituir num reservatório de leveduras, importante para a manifestação de candidose das mucosas bucais.

A maioria das pesquisas sobre a colonização bucal por *Candida* spp. têm sido feitas para analisar a microbiota periodontal em populações infectadas pelo HIV. Para Ryder (2000), um aspecto particularmente importante é o aumento da prevalência de *C. albicans* que, por vezes, é encontrada invadindo os tecidos bucais e gengivais. Para tais autores, a infecção por esses fungos está associada às doenças periodontais necrosantes, além de contribuir para a perda de suporte nas formas convencionais de periodontite.

Odden *et al.* (1994) encontraram hifas e pseudo-hifas de *C. albicans* em amostras de tecido gengival de HIV-positivos, principalmente em casos de necrose. Portanto, a utilização de anti-fúngicos e/ou clorexidina tem sido recomendada nesses casos, além de cautela na prescrição de antibióticos, pelo risco aumentado de superinfecção. No entanto, para Zambon *et al.* (1990), a utilização de antifúngicos sob a forma de bochechos ou pastilhas, pela dificuldade em atingir o ambiente subgengival, é relativamente ineficaz em eliminar as leveduras subgengivais, que podem persistir mesmo após o tratamento da candidose orofaríngea. Estes pesquisadores encontraram leveduras subgengivais em 62% dos indivíduos infectados pelo HIV. Muitos outros estudos também relatam altas prevalências de *C. albicans* nestas populações. De acordo com Rams *et al.* (1991), 42,8% e 28,6% dos indivíduos HIV-positivos analisados, abrigavam estas espécies em bolsas periodontais e em sítios subgengivais sem sinais de inflamação, respectivamente. Brady *et al.* (1996), examinado 25 mulheres infectadas pelo HIV, encontraram leveduras subgengivais em 46% dessas mulheres, contra 31% do grupo-controle HIV-negativo.

Foi observado por alguns estudos (Rams *et al.*, 1991; Chattin *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2001), que as lesões periodontais, ou seja, sítios que manifestam infecção/inflamação e destruição dos tecidos de suporte dental, são mais frequentemente colonizadas por essas espécies do que os sítios subgengivais sem sinais clínicos de inflamação, tanto em indivíduos saudáveis como em imunocomprometidos; isso pode indicar que o ambiente das bolsas periodontais é bastante favorável para a proliferação de espécies de *Candida*, especialmente de *C. albicans* (Zambon *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 2001; Järvensivu *et al.*, 2004). Reynaud *et al.* (2001) e González *et al.* (1987) encontraram grandes números de leveduras colonizando sítios periodontais.

No presente estudo, o número de UFC/mL nas bolsas periodontais foi estatisticamente maior que nos sulcos gengivais e na mucosa bucal ($p=0,0319$) indicando que as bolsas periodontais podem ser mais densamente povoadas que nos demais sítios, o que vem corroborar a hipótese de que o ambiente subgengival inflamado pode ser um nicho ecológico importante para esses fungos. Para Järvensivu *et al.* (2004), o ambiente subgengival e o fluido crevicular favorecem a proliferação e a germinação de hifas de *C. albicans*, formas com maior potencial de adesão e penetração tecidual. Assim, tais espécies

são capazes de colonizar as bolsas periodontais, em uma proporção significativa de indivíduos, com diversas formas de periodontite (González *et al.*, 1987; Slots *et al.*, 1988; Reynaud *et al.*, 2001; Järvensivu *et al.*, 2004), e a terapia antifúngica vem sendo preconizada no tratamento de alguns casos dessas doenças (Ryder *et al.*, 2000), sendo a eliminação das leveduras correlacionada com a melhora do quadro clínico (Velegraki *et al.*, 1990). Dessa forma, para vários autores, a presença de leveduras em sítios subgingivais pode contribuir para a progressão da doença periodontal, bem como determinar um risco aumentado de candidose sistêmica, em casos de depressão imune (Beighton *et al.*, 1995; Nikawa *et al.*, 1998; Kamma *et al.*, 1999; Hannula *et al.*, 2001; Jabra-Rizk *et al.*, 2001; Reynaud *et al.*, 2001; Al-Karaawi *et al.*, 2002).

Dos 21 pacientes positivos, 95,2% foram colonizados nas mucosas, 66,6% nas bolsas periodontais e 38% nos sulcos gengivais, sendo que a colonização simultânea dos três sítios (A, B e C) ocorreu em 28,5% dessa população, sugerindo que a colonização prévia das mucosas bucais pode ser importante para o acesso das leveduras ao biofilme subgingival. Arendorf & Walker (1980) também observam que os biofilmes dentais não são a fonte primária de leveduras, mas que tais espécies se aderem ao biofilme secundariamente, quando as mucosas da cavidade bucal já se encontram colonizadas. Para tais autores, e também para Kleinegger *et al.* (1996), o dorso da língua é o local mais freqüente e mais intensamente colonizado, provavelmente porque as papilas linguais fornecem uma extensa superfície, favorecendo a adesão microbiana, além de uma maior dificuldade de remoção mecânica do que nas demais superfícies mucosas. Então, além da remoção do biofilme dental, a higiene dessas superfícies poderia, também, ser um hábito importante para o controle das leveduras na cavidade bucal, dificultando a sua implantação nos ambientes subgingivais. Sendo assim, desde que as leveduras tenham acesso às bolsas periodontais, encontram um ambiente favorável à sua proliferação.

Diferentes espécies de *Candida* têm sido encontradas participando da microbiota residente da cavidade bucal, sendo *C. albicans* a mais freqüentemente isolada, pela quase totalidade dos estudos epidemiológicos, tanto em indivíduos saudáveis (Kleinegger *et al.*, 1996; Hannula *et al.*, 1997; Mata *et al.*, 2000; Reynaud *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2002; Järvensivu *et al.*, 2004), como em enfermos

(Chattin *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2001; Campisi *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2003). Na presente pesquisa, *C. albicans* foi também a espécie mais freqüente, identificada em 85,7% dos pacientes colonizados, enquanto que as demais espécies foram encontradas em 47,6%, diferença considerada estatisticamente significativa ($p= 0,0088$); além disso, 52,3% desses pacientes foram colonizados exclusivamente por *C. albicans*.

Candida albicans é considerada a espécie mais virulenta e bem adaptada à cavidade bucal (Kleinegger *et al.*, 1996), competindo com outros microrganismos pela aquisição de nutrientes, sendo capaz de resistir às diferentes pressões seletivas ambientais, sobrevivendo e proliferando em vários nichos ecológicos fornecidos por hospedeiros humanos (Calderone & Fonzi, 2001). Segundo De Bernardis *et al.* (1996), dentre as características fenotípicas de *C. albicans*, que podem contribuir para seu maior potencial patogênico, assim como para seu sucesso como organismo comensal, em relação às demais espécies de leveduras, é a capacidade aumentada de expressar as enzimas aspartil proteinases, relacionadas com a adesão, invasão e destruição tissular.

Embora *C. albicans* seja prevalente nas populações humanas, outras espécies de leveduras também vêm sendo isoladas, principalmente de indivíduos enfermos, e este fato tem sido atribuído principalmente ao uso disseminado de antifúngicos, que, por serem menos eficazes contra as espécies não-*albicans*, possibilita sua proliferação (Campisi *et al.*, 2002; Kam & Xu, 2002; Epstein *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2003). Para Ahmad *et al.* (2003), aproximadamente 30% das candidemias são causadas por outras espécies de *Candida* que não *C. albicans*. Examinando populações saudáveis, Hannula *et al.* (1999) e Contreras *et al.* (1994) relataram que *C. parapsilosis* foi mais freqüentemente isolada em alguns grupos de crianças, e que a diferença da prevalência bucal entre *C. albicans* e *C. parapsilosis* poderia refletir a instabilidade da microbiota em desenvolvimento na população infantil; desse modo, *C. albicans* parece menos capaz de colonizar a cavidade bucal de crianças do que de adultos, nos quais a microbiota é mais estável.

No presente estudo, 5,6% dos pacientes periodontais foram colonizados exclusivamente por outras espécies de *Candida* que não *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, mas este fato ocorreu apenas nas mucosas. Todos os pacientes colonizados nas bolsas periodontais abrigaram *C. albicans* neste sítio, unicamente ou simultaneamente a outras

espécies, assim também como todos os sítios B colonizados, exceto 1 caso. Em contrapartida, para Hannula *et al.* (1997), outras espécies bucais de leveduras, que não *C. albicans*, raramente são isoladas da cavidade bucal de adultos saudáveis.

Outro aspecto de interesse é a ocorrência de diferentes espécies de leveduras em um único indivíduo (Lass-Flörl *et al.*, 2003). Tais autores observaram que o risco de candidose invasiva é maior em multicolonizados, em relação aos indivíduos colonizados por apenas uma espécie. Segundo Odds *et al.* (1988), a frequência do isolamento de culturas mistas não é maior que 10%. Todavia, é possível que estudos, analisando apenas um ou poucos isolados por indivíduo, subestimem a prevalência de multicolonizados na população. Na presente pesquisa, analisando uma média de $9,8 \pm 4,54$ isolados por paciente, foi encontrado que 13,2% (sete de 53) foram multicolonizados. Outros autores também encontraram colonização bucal simultânea por diferentes espécies de leveduras (Kleinegger *et al.*, 1996; Hannula *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2001; Gugnani *et al.*, 2003). Ahmad *et al.* (2003) observaram que 12% de 57 indivíduos internados em uma unidade de tratamento intensivo, no Kuwait, abrigavam, simultaneamente, mais de uma espécie de *Candida*. Hannula *et al.* (1997), relataram que 6,2% de 48 indivíduos saudáveis, provenientes da Finlândia e Estados Unidos, abrigavam, além de *C. albicans*, *C. krusei* ou *C. glabrata* na mucosa bucal. Entretanto, nas amostras subgengivais, estes autores isolaram apenas *C. albicans*.

No presente estudo, outras espécies de *Candida*, que não *C. albicans*, também puderam ser isoladas nas bolsas periodontais de 3 pacientes, mas todos abrigavam também, simultaneamente, *C. albicans*. Porém, como foi feito um *pool* de leveduras, de todos os sítios periodontais coletados num mesmo indivíduo, não foi possível determinar se algum dos seis sítios analisados, em particular, abrigava exclusivamente espécies não-*albicans*. Nos demais 11 pacientes positivos nas bolsas periodontais, foi encontrado exclusivamente *C. albicans*, neste sítio.

Quanto à ocorrência de *C. dubliniensis*, Velegraki *et al.* (1999), isolaram esta espécie de uma criança HIV-positiva, que manifestava intenso eritema linear gengival, e que respondeu favoravelmente à terapia anti-fúngica; Portela *et al.* (1999), também isolaram *C. dubliniensis* de sítios subgengivais, em crianças HIV-positivas, na cidade do

Rio de Janeiro e Jabra-Rizk *et al.* (2001) encontraram esta espécie em bolsas periodontais de pacientes HIV-positivos. Mas há relatos de colonização bucal assintomática (Hannula *et al.*, 1997; Al-Karaawi *et al.*, 2002), assim como de candidoses provocadas por esta espécie em HIV-negativos (Coleman *et al.*, 1997). Al-Karaawi *et al.* (2002) detectaram *C. dubliniensis* na mucosa bucal, em 5,8% de uma população de indivíduos imunocompetentes, mas que manifestavam alterações mucosas como líquen plano, estomatite aftosa recorrente, leucoplasias, doenças vesico-bolhosas, e alguns eram portadores de deficiências físicas ou mentais. Para estes pesquisadores, os fatores locais podem ser mais relevantes do que os sistêmicos, na colonização da cavidade bucal por *C. dubliniensis*. Além disso, esta espécie não foi encontrada, por estes autores, em nenhum indivíduo edêntulo sendo, então, possível, que haja uma predileção de *C. dubliniensis* pelos tecidos duros da cavidade bucal, e por uma coabitação com outros microrganismos do biofilme dental, como por exemplo, *Fusobacterium nucleatum* (Al-Karaawi *et al.*, 2002). Na presente pesquisa, dos 21 pacientes colonizados, *C. dubliniensis* foi isolada em apenas uma paciente, no biofilme das bolsas periodontais.

No presente estudo, foi também observado que 66,6% dos sítios bucais existentes, nos pacientes colonizados (máximo de 3 sítios/paciente), foram positivos para *Candida* spp., sendo 29 sítios em 14 mulheres (média de $2,0 \pm 0,78$ sítios/paciente) e 13 em 7 homens (média de $1,9 \pm 0,69$ sítios/paciente). Não houve diferença significativa entre os gêneros, quanto ao número de sítios colonizados (0,6877). Em que pese as limitações dos métodos de detecção por cultura, este fato sugere que a colonização não ocorre, necessariamente, em todos os nichos, nos indivíduos colonizados por leveduras na cavidade bucal, possivelmente pela pressão seletiva exercida pelos diversos microambientes, em termos de aquisição de nutrientes e interações microbianas (Hannula *et al.*, 2001).

De acordo com Epstein *et al.* (2003), a colonização prévia da orofaringe e o número de sítios anatômicos colonizados são fatores de risco para a ocorrência de candidoses disseminadas, e que as espécies de *Candida* são responsáveis por grande parte das infecções sistêmicas que acometem pacientes que recebem transplantes de células hematopoiéticas, e por um número expressivo de óbitos, devido principalmente aos episódios de neutropenias e à medicação com antibióticos e com esteróides sistêmicos. Tais

autores observam que o diagnóstico precoce e o tratamento das candidoses bucais pode aumentar a sobrevivência dessa população.

Muitos pesquisadores têm sugerido que, dentre as características fenotípicas de *C. albicans*, a secreção enzimática é determinante, tanto para o potencial patogênico, como para a colonização comensal (Ollert *et al.*, 1995; De Bernardis *et al.*, 1996). Segundo McMullan-Vogel *et al.* (1999), as enzimas aspartil proteinases (*Saps*) são o principal foco de investigação na virulência de *C. albicans* (McMullan-Vogel *et al.*, 1999), mas as fosfolipases também têm sido estudadas (Willis *et al.*, 1999; Shimizu *et al.*, 1996). Alguns autores relatam que a secreção enzimática varia entre as diferentes linhagens e procedências dos isolados de *C. albicans*. McMullan-Vogel *et al.* (1999) verificaram a atividade das *Saps* por isolados bucais de *C. albicans*, em usuários de próteses totais, com sinais de candidose, e relataram que todos os isolados secretaram estas enzimas no meio indutor, independente de condições como a idade e o gênero da população estudada, mas foi significativamente menor do que a atividade enzimática dos isolados de *C. albicans* provenientes de indivíduos infectados pelo HIV. Para tais autores, as espécies e linhagens de *Candida* com maior atividade de proteinase são mais capazes de causar infecção do que aquelas com menor atividade, ou que os mutantes enzima-deficientes. Willis *et al.* (1999) relataram uma diferença significativa na produção de fosfolipases por isolados de *C. albicans* provenientes de lesões de candidose, em relação aos isolados de indivíduos portadores assintomáticos. Ao contrário, Shimizu *et al.* (1996) não observaram diferença, quanto à atividade enzimática de proteinases e fosfolipases, entre os isolados de *C. albicans* provenientes da saliva de indivíduos assintomáticos e daqueles com manifestações de candidose bucal.

Na presente pesquisa, também não foi observada diferença significativa, quanto à produção enzimática de proteinases, em relação aos 3 sítios anatômicos bucais. Como as bolsas periodontais eram as únicas regiões que manifestavam, clinicamente, sinais de inflamação, seria esperado que os isolados destes sítios demonstrassem uma maior atividade enzimática. No entanto, todos os isolados de *C. albicans* exibiram forte atividade de aspartil proteinase, independentemente dos sítios bucais e do gênero.

Do mesmo modo, 100% dos isolados de *C. albicans* demonstraram atividade enzimática de fosfolipases, sendo que 67,9% deles possuíam atividade enzimática

fortemente positiva. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada, também, quanto ao grau de atividade enzimática de fosfolipases, entre os gêneros, masculino ou feminino ($p= 0,290$), ou entre os sítios ($p= 0,5505$). Além disso, dentro de uma única linhagem, obtida por RAPD, alguns isolados demonstraram atividade fortemente positiva de fosfolipases, enquanto outros possuíam atividade apenas positiva, embora outras linhagens fossem homogêneas quanto à atividade enzimática de ambas as exoenzimas; entretanto, tais linhagens possuíam apenas pequeno número de isolados, não sendo possível caracterizá-las quanto a este aspecto.

Nossos resultados foram também semelhantes aos obtidos por Mardegan (2002), que, analisando a expressão destas enzimas por isolados bucais de *C. albicans*, em dois grupos de crianças saudáveis, cárie-ativas ou livres de cárie, de uma mesma localidade geográfica (Piracicaba-SP), relatou que mais de 90% do total desses isolados produziram fosfolipases e proteinases. Outros estudos têm demonstrado que, de 30 a 100% dos isolados bucais de *C. albicans* produzem fosfolipases, com graus variados de atividade enzimática (Price *et al.*, 1982; Samaranayake *et al.*, 1984; Williamson *et al.*, 1986; Ibrahim *et al.*, 1995; maffei, 1996; Candido *et al.*, 2000; Hannula *et al.*, 2000). Estas divergências poderiam ser devidas, segundo Williamson *et al.* (1986), a vários fatores, como à alta variabilidade demonstrada - por um mesmo isolado - quando submetido a testes sucessivos do grau de atividade enzimática, pelo método da placa; assim, tais autores sugerem que apenas a presença ou ausência, e não o grau de atividade, seja considerado como um critério preciso na biotipagem dos isolados de *C. albicans*. Além disso, tais diferenças também podem ocorrer devido às distintas procedências dos isolados, ou à variação nas técnicas e nos meios de cultura utilizados.

No presente estudo, os testes foram feitos em duplicata, e não foram observadas diferenças, pelos isolados, no índice de atividade enzimática entre os testes, possivelmente devido à padronização do inóculo em espectrofotômetro, e também dos meios de cultura, além das demais condições experimentais. Todos os isolados testados na presente pesquisa exibiram grande potencial para a secreção de exoenzimas, e, portanto, poderiam participar do processo infeccioso e inflamatório que acomete os tecidos de suporte dental. O fato de que os isolados de *C. albicans* provenientes do sulco gengival e mucosa bucal, também

manifestassem, de forma semelhante aos da bolsa periodontal, atividade de proteinases e fosfolipases, sem que houvesse, contudo, sinais de infecção nestes sítios, poderia ser devido ao fato de que, como patógeno oportunista, as infecções produzidas por *C. albicans* estão relacionadas mais ao *status* imune do hospedeiro do que a qualquer fator de virulência produzido ou mantido pela levedura (McMullan-Vogel *et al.*, 1999). Ao contrário, nos tecidos periodontais inflamados, de acordo com Järvensivu *et al.* (2004), ocorre uma imunodepressão local, causada pela periodontite, capaz de favorecer ecologicamente espécies oportunistas.

Um outro aspecto dessa questão é que, além da capacidade intrínseca do microrganismo, as condições ambientais também são importantes na expressão de uma determinada característica. Para Ibrahim *et al.* (1995), a expressão, *in vitro*, de fatores de virulência, não significa que o fator esteja, necessariamente, atuando *in vivo*, mas tão somente que existe o potencial para tanto. Assim, esses fatores seriam expressos apenas sob condições ambientais favoráveis. No presente caso, outros estudos seriam necessários para verificar se os genes que codificam essas enzimas estão realmente sendo expressos, *in vivo*, pelos isolados de *C. albicans*, e em quais sítios bucais isto está ocorrendo. Por exemplo, estudos para a detecção de mRNA, poderiam ser úteis para esclarecer essa questão (Naglik *et al.*, 1999).

Para McMullan-Vogel *et al.* (1999), dentre as características fenotípicas, a secreção enzimática tem sido considerada um fator crucial para a colonização assintomática e para o potencial patogênico destas leveduras, pois tais enzimas estão implicadas tanto nas adesão, como na invasão e na destruição tecidual. Assim, para tais autores, as espécies e linhagens com maior atividade enzimática possuem maior potencial de causar infecção do que aquelas com menor potencial secretor, ou os mutantes enzima-deficientes. Algumas das propriedades enzimáticas, relatadas na literatura, podem desempenhar um papel importante na agressão aos tecidos periodontais. De maior importância pode ser a indução de reações inflamatórias, a degradação de um número de substratos do hospedeiro, como o colágeno, queratina, e imunoglobulinas, e, conseqüentemente, a diminuição da eficácia da fagocitose pelos neutrófilos polimorfonucleares (Kaminishi *et al.*, 1995; Haynes, 2001; Hube & Naglik, 2001).

Kaminishi *et al.* (1995), num estudo para testar o efeito das proteinases sobre a atividade de opsonização do soro humano, através de uma via mediada por complemento, relataram um decréscimo da atividade bactericida dos neutrófilos polimorfonucleares, quando o soro foi tratado com proteinases de *C. albicans*. Estes autores concluíram que tais enzimas parecem reduzir a opsonização dos microrganismos, através da degradação da IgG e IgM, e da molécula C3 do complemento. Como a opsonização de microrganismos-alvo é necessária para uma fagocitose eficiente, a inativação das opsoninas pode deixar o hospedeiro mais vulnerável às infecções microbianas, e agravar as doenças infecciosas em hospedeiros comprometidos (Kaminishi *et al.*, 1995). Como muitas destas respostas imunes são importantes na defesa dos tecidos periodontais (Hägewald *et al.*, 2002; Slots & Taubman, 1992; Newman *et al.*, 2004), é possível que tais enzimas, produzidas no ambiente subgengival, exerçam uma ação deletéria para o periodonto.

A epidemiologia das infecções por *C. albicans* requer que este patógeno seja caracterizado ao nível de subespécie, de modo a definir, mais precisamente, os processos infecciosos e as vias de transmissão (Sanz *et al.*, 1996). Para a genotipagem dos isolados de *C. albicans*, foram utilizados, no presente estudo, 2 *primers* arbitrários, AP-03 e OPA-03, pelo método de RAPD, o que permitiu distinguir, em 156 isolados de *C. albicans*, 4 grupos moderadamente relacionados entre si ($0,684 \leq S_{SM} \leq 0,839$), e um outro grupo geneticamente distinto, constituído por 3 isolados identificados previamente como *C. dubliniensis*. No entanto, dentro de cada grupo, as linhagens possuíam, entre si, alto grau de similaridade ($0,879 \leq S_{SM} \leq 1,0$).

Os isolados identificados previamente como *C. albicans* exibiram um perfil eletroforético semelhante à cepa de referência desta espécie (ATCC 90028) e distinto do perfil exibido pelos isolados de *C. dubliniensis*, e por sua cepa de referência (CD 36), para ambos os *primers* utilizados. Hannula *et al.* (1997) observaram o mesmo fenómeno, utilizando 2 *primers* arbitrários, um dos quais o OPA-03, para a genotipagem de isolados bucais provenientes de 2 distintas localidades geográficas. Como este fato ocorreu também para outras espécies de *Candida*, além de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, os autores concluíram que os perfis-PCR de uma determinada espécie são muito mais similares entre si do que entre espécies distintas, e, portanto, o método de RAPD pode ser utilizado

também para a identificação de leveduras, ao nível de espécie. Entretanto, pequenas variações nos perfis eletroforéticos, dentro de cada espécie, foram detectadas por estes pesquisadores, o que permitiu a análise da diversidade genética intra-específica. Na presente pesquisa, foram também observadas variações semelhantes e, assim, a partir da análise dos perfis gerados por ambos os *primers*, foi possível distinguir diferentes tipos eletroforéticos, e, conseqüentemente, acessar a diversidade genotípica de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. No entanto, para a identificação das leveduras, foi utilizado, em adição, *primers* específicos, além dos métodos fenotípicos clássicos.

Dos 156 isolados de *C. albicans*, a grande maioria (94,9%) demonstrou alto grau de similaridade genética (S_{SM} entre 0,879 a 1,0), formando um *cluster* denominado Grupo I. Dentro deste grupo geneticamente homogêneo, 2 tipos eletroforéticos (ET1 e ET7) predominaram, constituindo a maioria dos isolados (n= 99), que se distribuíram pelos 3 sítios bucais e por ambos os gêneros, feminino e masculino. Apenas estes 2 ET foram compartilhados entre os gêneros; dos demais 14 ET, 10 foram encontrados exclusivamente em mulheres e quatro em homens. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os gêneros masculino ou feminino, quanto ao grau de diversidade genética entre os isolados de *C. albicans* (p= 0,892).

A existência de alguma especificidade ecológica da cavidade bucal, relacionada aos gêneros, que pudesse influenciar nos processos adaptativos de algumas linhagens de *C. albicans*, ainda não foi descrita (Feijoo *et al.*, 2002). Al-Karaawi *et al.* (2002) também não relataram nenhuma associação entre os gêneros e os genótipos de *C. albicans*. Seriam necessários mais estudos, empregando uma combinação de métodos de análise genômica, na tentativa de esclarecer esta questão, importante em termos de implementação de programas de prevenção à candidose, especialmente em populações de risco.

No presente estudo, também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os sítios A, B e C, e o grau de diversidade genética de *C. albicans* (p= 0,6431). Algumas linhagens dessa espécie foram encontradas nos 3 sítios bucais, indicando uma disseminação das leveduras, provavelmente a partir das superfícies mucosas, em direção aos sítios subgingivais. Porém, alguns tipos eletroforéticos foram encontrados exclusivamente nos sítios bucais A ou C, mas nenhum foi exclusivo para o sítio B. Dessa

forma, a colonização dos sulcos gengivais saudáveis por *C. albicans* pode ser consequência apenas da disseminação das leveduras a partir das mucosas bucais. Isso pôde ser evidenciado, no presente estudo, pelo fato de que as leveduras só foram encontradas neste local quando presentes, concomitantemente, nas mucosas bucais.

Pizzo *et al.* (2002), analisando, por cariotipagem eletroforética, 6 isolados de *C. albicans* de sítios periodontais e 1 isolado da mucosa bucal, em pacientes HIV-positivos, relatam que, na maioria dos casos, houve identidade genética entre os isolados de ambos os sítios bucais, mas algumas linhagens foram detectadas unicamente nas bolsas periodontais. Então, foi concluído que a colonização destes sítios não é o resultado apenas da disseminação das leveduras das superfícies bucais e da saliva, mas que a adaptação de determinadas linhagens de *C. albicans* ao ambiente periodontal também pode ocorrer.

A maioria dos estudos para análise da diversidade genética de *C. albicans* utiliza, aproximadamente, 5 isolados por sítio, ou por indivíduo (Hanulla *et al.*, 1999; Hanulla *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002; Samaranayake *et al.*, 2003), como foi feito também no presente estudo. Mas pode ser que, analisando uma quantidade maior de isolados em cada sítio, fosse possível verificar se essas linhagens exclusivas em relação aos sítios ocorrem devido às pressões ecológicas próprias de cada ambiente, ou se, em consequência de uma amostragem insuficiente, tais linhagens não são detectadas em todos os sítios, por serem em menor número. Kam & Xu (2002), também observaram que os estudos de populações de microrganismos são limitadas pela dificuldade de se analisar geneticamente um número muito grande de isolados, em cada indivíduo.

No estudo de Pizzo *et al.* (2002), algumas linhagens foram compartilhadas entre indivíduos não relacionados, enquanto outras eram exclusivas para um mesmo indivíduo. Hannula *et al.* (2001), utilizando o método de AP-PCR, com o *primer* OPE-03, na genotipagem de isolados bucais de *C. albicans*, em indivíduos saudáveis e não relacionados, provenientes de três países (Estados Unidos, Finlândia e Turquia), relataram que, dos 25 genótipos identificados nos sítios subgengivais, 11 ocorreram em múltiplos indivíduos. Estes dados concordam, de modo geral, com os encontrados na presente pesquisa, onde foi observado, entre pacientes não relacionados entre si, o compartilhamento de uma ou mais linhagens de *C. albicans*, com exceção de um único paciente, do gênero

feminino. Este paciente abrigava, simultaneamente, nos três sítios bucais, apenas um tipo eletroforético de *C. albicans* (ET6), e, ainda, esta linhagem não foi detectada em nenhum outro paciente. Dos 16 ET encontrados, no presente estudo, sete foram compartilhados entre os pacientes.

Para Pizzo *et al.* (2002), é provável que tais linhagens representem subpopulações comuns dentro da espécie *C. albicans*. Estes autores observam que a tipagem molecular auxilia a esclarecer uma variedade de características importantes sobre a colonização subgengival por *C. albicans*, e que a similaridade genética entre os isolados coletados simultaneamente da mucosa bucal e de sítios subgengivais deve ser estudada mais aprofundadamente, pois esta relação ainda é pouco compreendida.

Na presente pesquisa, dos 18 pacientes colonizados por *C. albicans*, seis abrigavam apenas um único tipo eletroforético de *C. albicans*, enquanto os demais possuíam de duas a cinco linhagens bucais dessa levedura. Esses dados são semelhantes aos obtidos por Kleinegger *et al.* (1996), que, empregando a sonda Ca3 na análise genômica de múltiplos isolados bucais de *C. albicans*, em indivíduos saudáveis e dentados, provenientes de uma única localidade geográfica, demonstraram que a maioria das linhagens comensais têm origem clonal, mas que uma proporção dessas linhagens contém pequenas variações genéticas. Os autores relataram que alguns indivíduos portavam mais de 1 padrão de DNA entre os isolados, enquanto outros foram colonizados por uma única linhagem de *C. albicans*, evidenciando, assim, a ocorrência de microevolução em populações clonais de linhagens comensais ou infectantes, nos sítios anatômicos bucais. Também para Berenger *et al.* (1996) e para Xu J *et al.* (1999), um único hospedeiro pode ser colonizado por múltiplas espécies ou por múltiplos genótipos da mesma espécie, no mesmo ou em diferentes sítios do corpo, indicando um processo dinâmico de colonização por leveduras.

Todavia, outros estudos relatam a ocorrência de apenas uma única linhagem bucal de *C. albicans*, por indivíduo. De acordo com Mehta *et al.* (1999) e Hannula *et al.* (2001), a maioria dos indivíduos saudáveis abriga uma única linhagem de *C. albicans* na cavidade bucal, ao contrário de imunocomprometidos, nos quais são detectados, freqüentemente, várias linhagens de *C. albicans*. Hannula *et al.* (2001) analisaram a diversidade genética de leveduras subgengivais, em 60 indivíduos sistemicamente

saudáveis, com periodontite, tomando cinco isolados por indivíduo, e observaram que 58 indivíduos possuíam apenas uma única linhagem de *C. albicans*, mas dois indivíduos possuíam mais de uma linhagem.

Pizzo *et al.*, (2002), relataram que três dos nove indivíduos HIV-positivos estudados foram colonizados por mais de uma linhagem de *C. albicans*. Samaranayake *et al.* (2003), analisando múltiplos isolados de *C. albicans* na cavidade bucal de indivíduos infectados pelo HIV, também demonstraram a ocorrência simultânea de mais de um tipo clonal num mesmo indivíduo; para tais autores, este fato pode ter importantes implicações terapêuticas, como diferenças na susceptibilidade aos antifúngicos, entre as linhagens, possibilitando a seleção das mais resistentes. Assim, pacientes imunocomprometidos deveriam ser monitorados para a presença de múltiplas linhagens de *C. albicans*, durante todo o curso de sua enfermidade.

Como não há um consenso na literatura, sob este aspecto, por haver ainda muito a esclarecer sobre os mecanismos que determinam os processos de colonização e manutenção da microbiota de leveduras em humanos, como a influência de fatores geográficos, populacionais e comportamentais, além de variações devidas, possivelmente, aos diferentes métodos utilizados para a análise genômica das espécies de *Candida*, mais estudos são necessários para elucidar estas e outras questões de importância epidemiológica.

De acordo com Bartie *et al.* (2001) os métodos de genotipagem baseados na análise do ácido nucleico possuem um bom poder discriminatório e reprodutibilidade para a caracterização das linhagens de *Candida*, sendo que as técnicas de genotipagem fundamentadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido as mais utilizadas. As técnicas de PCR são vantajosas por terem aplicabilidade universal, e serem relativamente rápidas e simples, enquanto seu poder discriminatório se mantém comparável a métodos como o PFGE ou REA (Van Belkum *et al.*, 1994; Clemons *et al.*, 1997). Porém, mesmo considerando o alto poder de resolução de cada uma dessas técnicas, pode ser necessário o emprego de mais de um método molecular, para aumentar a capacidade de discriminação de diferentes linhagens de *Candida* spp. (Bart-Delabesse *et al.*, 1995; McCullough *et al.*, 1996). Apesar disso, muitos autores têm utilizado apenas uma técnica molecular em estudos

epidemiológicos, relatando resultados satisfatórios em termos de capacidade de discriminação e reprodutibilidade (Kleinegger *et al.*, 1996; Hannula *et al.*, 1997; Hannula *et al.*, 2001; Pizzo *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2003; Hossain *et al.*, 2003).

Na presente pesquisa, utilizando apenas a técnica de RAPD, com 2 *primers* arbitrários, foi encontrado que a maioria das linhagens de *C. albicans*, provenientes dos sítios saudáveis, foram também isoladas nas bolsas periodontais; além disso, não foi encontrada relação entre os sítios ou as linhagens e a atividade enzimática. Tal fato indica, portanto, a hipótese da persistência, em que as linhagens comensais também são capazes de causar infecção (evidentemente considerando a possibilidade de que tais espécies participem ativamente do processo infeccioso periodontal, o que ainda não foi definitivamente demonstrado). Assim, de acordo com os dados obtidos nesta pesquisa, as condições do hospedeiro, de ordem local ou geral, seriam o fator determinante para a infecção por *Candida*.

Estes dados concordam com os encontrados por alguns autores (Hellstein *et al.*, 1993; McCulough *et al.*, 1994; Xu J *et al.*, 1999; Samaranayake *et al.*, 2003). Entretanto, em populações imunocomprometidas é possível que haja uma substituição de linhagens comensais de *C. albicans* por cepas geneticamente mais homogêneas e potencialmente mais virulentas, principalmente em relação à maior atividade enzimática de aspartil proteinases (Ollert *et al.*, 1995; Ahmad *et al.*, 2003).

Em Piracicaba (SP), localidade onde residiam os voluntários da presente pesquisa, outros autores também estudaram, previamente, a diversidade genética de isolados bucais de *C. albicans*, em outras populações, sendo assim, interessante, a comparação desses estudos com o presente, em que pese o fato de as idades e as condições bucais dos indivíduos serem diferentes. Mardegan (2003), utilizando o método de RAPD com o *primer* AP-03, para a genotipagem de 158 isolados de *C. albicans*, provenientes de 2 grupos de crianças saudáveis, cárie-ativos e livres de cárie, relata que algumas crianças abrigavam múltiplas linhagens dessa espécie na cavidade bucal, e não foi encontrada diferença significativa, entre os 2 grupos, quanto à diversidade genética, entre as linhagens de *C. albicans*. Mata *et al.* (1999) analisaram, por eletroforese de isoenzimas, 49 isolados de *C. albicans* da saliva de 11 crianças saudáveis, com idade variando entre 8 a 11 anos, e

observaram também que algumas crianças possuíam apenas uma linhagem, enquanto outras foram colonizadas por dois ou mais clones desta levedura, numa maneira multiclonal de colonização. Boriollo (2004), analisando, por eletroforese de enzima multiloco, 75 isolados bucais de *C. albicans*, em 75 escolares saudáveis, provenientes de diferentes instituições de ensino, nesta mesma cidade, demonstraram a ocorrência de grupos predominantes de isolados altamente relacionados geneticamente, tanto na população total, como em cada subpopulação de crianças. Segundo este autor, idênticos tipos eletroforéticos foram compartilhados entre alguns escolares não relacionados, provenientes de diferentes instituições de ensino, o que sugere uma possível existência de rotas de disseminação de determinadas linhagens de *C. albicans*; assim, mais pesquisas seriam necessárias para verificar a ocorrência de um grupo ubíquo e geneticamente homogêneo dessa espécie, e de suas vias de transmissão, contribuindo para a prevenção da transmissibilidade entre as populações, assim como das infecções causadas por tais microrganismos.

Foi também encontrado, na presente pesquisa, um grupo de linhagens de *C. albicans*, que demonstraram alto grau de relacionamento genético (S_{SM} entre 0,879 a 1,0), formando um *cluster* denominado Grupo I. Para Al-Karaawi *et al.* (2002), as cepas de *C. albicans* tendem a ser geneticamente mais similares entre si quando provenientes de grupos populacionais semelhantes (ex. HIV-positivos ou negativos), de uma mesma localidade geográfica, ou de um mesmo sítio anatômico (ex. cavidade bucal, vagina, intestino). Os resultados destes autores sugerem que subgrupos geneticamente homogêneos de *C. albicans* têm predileção por condições bucais específicas, ou populações homogêneas de indivíduos. No presente estudo, a padronização, entre os pacientes analisados, quanto às condições bucais, sistêmicas e a localidade geográfica, poderia, talvez, explicar a alta homogeneidade genética encontrada entre a maioria dos isolados de *C. albicans*.

No entanto, é necessário ressaltar as limitações da utilização de apenas um único método de genotipagem, quanto à capacidade discriminatória entre as linhagens, mesmo considerando que o *primer* AP-03 tem sido utilizado, através do método de RAPD, com bons resultados neste aspecto (Sanz *et al.*, 1996; Ahmad *et al.*, 2003; Mardegan, 2003).

Schmid *et al.* (1999), num estudo epidemiológico, utilizando a sonda Ca3, demonstraram que 37% dos isolados patogênicos de *C. albicans*, provenientes de regiões

geográficas distintas, formaram um único *cluster* geneticamente homogêneo. Os autores denominaram este grupo de *general purpose genotype*, e relataram que as linhagens, pertencentes a este *cluster*, poderiam estar amplamente disseminadas geograficamente, agindo como agente etiológico predominante em todas as formas de candidose e em todas as categorias de pacientes, sendo então mais bem sucedidas ecologicamente que as demais linhagens. Segundo estes autores, o sucesso, a longo prazo, de uma determinada cepa, deveria ser maior se esta cepa fosse capaz de se adaptar a uma variedade de ambientes distintos, e assim, estes genótipos *general purpose* seriam capazes de sobreviver num hospedeiro, tanto como comensais, quanto como patógenos.

Outros estudos complementares são necessários, com o objetivo de verificar se as linhagens de *C. albicans* encontradas no presente estudo, que apresentaram alto grau de relacionamento genético (Grupo I), seriam também geograficamente disseminadas, colonizando a cavidade bucal como organismos comensais e/ou produzindo candidose; para tanto, estudos comparativos utilizando diversos grupos populacionais, provenientes de diferentes localidades geográficas e também empregando, além do RAPD, outros métodos moleculares na caracterização genética de *C. albicans*.

Finalmente, a propagação sistêmica de linhagens potencialmente patogênicas de espécies de *Candida*, principalmente de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, poderia ser favorecida em determinados grupos populacionais, especialmente quando as bolsas periodontais se apresentassem densamente colonizadas por tais espécies. Estudos longitudinais seriam necessários de forma a acessar o grau de manutenção dessa diversidade de linhagens, em diferentes populações e formas de periodontite, incluindo a avaliação dos fatores de virulência, da susceptibilidade a agentes antifúngicos, e também, verificar a eficácia das diversas modalidades de terapia periodontal na eliminação ou no controle das espécies de *Candida* da cavidade bucal, especialmente dos sítios subgingivais.

7 CONCLUSÃO

Sob as condições experimentais deste trabalho, foi possível concluir que:

a) A ocorrência de espécies de *Candida* na cavidade bucal pode ser esperada em, aproximadamente, um a cada três pacientes com diagnóstico de doença periodontal, e, nas bolsas periodontais, em um a cada quatro desses pacientes.

b) *Candida albicans* é a espécie mais frequentemente isolada, em ambos os gêneros, e possui a capacidade de colonizar tanto o biofilme subgingival como as superfícies mucosas.

c) O biofilme relacionado às bolsas periodontais abriga maior número de leveduras (UFC/mL), do que os sulcos gengivais e as mucosas bucais.

d) Os isolados bucais de *Candida albicans* e *C. dubliniensis* possuem evidente atividade enzimática, tanto de aspartil proteinases, como de fosfolipases.

e) Ambos os gêneros, masculino e feminino, são semelhantes quanto à colonização bucal por *Candida* spp., quanto à diversidade genotípica de *Candida albicans*, e quanto à atividade enzimática dos isolados.

f) A cavidade bucal pode abrigar uma única ou múltiplas linhagens de *Candida albicans*, assim como uma mesma linhagem pode ser compartilhada entre indivíduos não-relacionados.

g) As bolsas periodontais podem ser colonizadas por *Candida dubliniensis*, em indivíduos sem história de comprometimento imune.

REFERÊNCIAS*

Abu-Elteen KH, Abu-Alteen RM. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. **New Microbiol.** 1998; 21(1): 41-8.

Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Epidemiology of *Candida* colonization in an intensive care unit of a teaching hospital in Kuwait. **Med Mycol.** 2003; 41(6): 487-3.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J.** 2002; 78(922): 455-9.

Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh ACW, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, *et al.* Characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17(1): 44-9.

Alkumru, HN, Beydemir K. The prevalence of *Candida albicans* in complete denture and removable partial denture wearers: a comparative study. **J Marmara Univ Dent Fac.** 1992; 1(3): 218-2.

Almeida OP, Scully P. Fungal infections of the mouth. **Braz J Oral Sci.** 2002; 1(1): 19-26.

Almstahl A, Kroneld U, Tarkowski A. Oral microbial flora in Sjogren's syndrome. **J Rheumatol.** 1999; 26(1): 110-4.

Alpagot T, Duzgunes N, Wolff LF, Lee A. Risk factors for periodontitis in HIV patients. **J Periodontol Res.** 2004; 39(3): 149-57.

Alves A.C.B.A. **Análise da diversidade genética de *Prevotella intermedia* em indivíduos com doença periodontal.** [tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.

Alves SH, Milan EP, Moretti-Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K Oliveira LO, *et al.* First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2001; 39(3): 165-8.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Angiolella L, Facchin M, Stringaro A, Maras B, Simonetti N, Cassone A. Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. **J Infect Dis.** 1996; 173(3): 684-90.

Ansell GB, Hawthorne JN. **Phospholipids: chemistry, metabolism and function.** Amsterdam: Elsevier Publishing; 1964.

Anthony RM, Midgley J, Sweet SP, Howell SA. Multiple strains of *Candida albicans* in the oral cavity of HIV-positive and HIV-negative patients. **Microbiol Ecol Health Dis.** 1995. (8): 23–30.

Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch Oral Biol.** 1980; (25): 1–10.

Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of these enzymes and some biological properties. **Sabouraudia.** 1985; (23): 148-53.

Barchiesi F, Maracci M, Radi B, Arzeni D, Baldassarri I, Giacometti A, *et al.* Point prevalence, microbiology and fluconazole susceptibility patterns of yeast isolates colonizing the oral cavities of HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. **Antimicrob Chemother.** 2002; 50(6): 999-1002.

Bart-Delabesse E, Van Deventer H, Goessens W, Poirot JL, Lioret, N, Van Belkum A, Dromer F. Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. **J Clin Microbiol.** 1995; 33(12): 3278-83.

Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJC, Lewis MAO. PCR Fingerprinting of *Candida albicans* Associated with Chronic Hyperplastic Candidosis and Other Oral Conditions. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(11): 4066-75.

Baumgartner C, Freydiere AM, Gille Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CHROMagar *Candida* plates. **J Clin Microbiol.** 1996; (34): 454–6.

Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontics origin. **J Endodontics.** 2000; 26(12): 695-8.

Beausejour A, Grenier D, Goulet JP, Deslauriers N. Proteolytic activation of the interleukin-1 β precursor by *Candida albicans*. **Infect Immun** 1998; (66): 676-81.

Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, *et al.* Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. **J Clin Microbiol.** 1995; 33(11): 3025-7.

Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC. Genetic characterization of phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequence in *Candida* species other than *Candida albicans*. **Microbiology.** 1998; 144(1): 55-72.

Berenguer J, Diaz-Guerra TM, Ruiz-Diez B, Quiros JCLB, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant *Candida albicans* strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patient. **J Clin Microbiol.** 1996; 34(6): 1542-5.

Borg-Von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D, Monod M. The expression of secreted aspartyl proteinases SAP4 to SAP6 from *Candida albicans* in murine macrophages. **Mol Microbiol.** 1998; 28(3): 543-4.

Boriollo M.F.G. **Análise da diversidade genética de amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis por eletroforese de enzima multiloco.** [tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

Borromeo GL, McCullough MJ, Reade P.C. Quantitation and morphotyping of *Candida albicans* from healthy mouths and from mouths affected by erythematous candidosis. **J Med Vet Mycol.** 1992; 30(6): 477-80.

Brady LJ, Walker C, Oxford GE, Stewart TC, Magnusson I, McArthur W. Oral diseases, mycology and periodontal microbiology of HIV-1-infected women. **Oral Microbiol Immunol.** 1996; (11): 371-80.

Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology.** 2001; 9(7): 327-35.

Campisi G, Pizzo, G, Mancuso S, Margiotta V. Gender differences in HIV-related oral lesions: an Italian study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001; (91): 546-51.

Campisi G, Pizzo G, Millici ME, Mancuso S, Margiotta V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002; 93(3): 281-6.

Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MCE. Enzymotyping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **Rev Soc Med Trop.** 2000; 33(5): 437-42.

Cannon R, Nand AK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. **Microbiology**. 1995; 141(1): 213-9.

Carlstedt K, Krekmanova L, Dahllof G, Ericsson B, Braathen G, Modeer T. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. **Int J Paediatr Den**. 1996; 6(2): 95-100.

Casanova M, Chaffin DWL. Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. **J Gen Microbiol**. 1991; (137): 1045-51.

Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, *et al*. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. **J Infect Dis**. 1999; 180(2): 448-53.

Chakrabarti A, Nayak T, Talwar P. In vitro proteinase production by *Candida* species. **Mycopatologia**. 1991; 114(3): 163-8.

Chattin BR, Ishihara K, Okuda K, Hirai Y, Ishikawa T. Specific microbial colonization in the periodontal sites of HIV-infected subjects. **Microbiol Immunol**. 1999; 43(9): 847-52.

Chen HY, Cox SW, Eley BM, Mantyla P, Ronca H, Sorsa T. Matrix metalloproteinase-8 levels and elastase activities in gingival crevicular fluid from chronic adult periodontitis patients. **J Clin Periodontol**. 2000; (27): 366-9.

Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. **J Clin Microbiol**. 1997; (35): 1332-6.

Coleman D, Sullivan D, Harrington B, Henman M, Shanley D, Bennett D, *et al*. Molecular and phenotypic analysis of *Candida dubliniensis*: a recently identified species linked with oral candidosis in HIV-infected and AIDS patients. **Oral Dis**. 1997; 3 (1): S96-101.

Contreras I, Ponton J, Quindos G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. **Clin Infect Dis**. 1994; (18): 480-1.

Dahl KM, Keath EJ, Fraser VJ, Powderly WG. Molecular epidemiology of mucosal candidiasis in HIV-positive women. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 1997; (13): 485-91.

Dahlen G, Wikström M. Occurrence of enteric rods, Staphylococci and *Candida* in subgingival samples. **Oral Microbiol Immunol**. 1995; (10): 42-6.

Damjanovic V, Connolly CM, Van Saene HK, Cooke RW, Corkill JE, Van Belkum A, *et al.* Selective decontamination with nystatin for control of a *Candida* outbreak in a neonatal intensive care unit. **J Hosp Infect.** 1993; 24(4): 245-59.

Dassanayake RS, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Genomic diversity of oral *Candida krusei* isolates as revealed by DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping. **APMIS.** 2000; (108): 697–704.

Darwazeh AM, Al-Bashir A. Oral candidal flora in healthy infants. **J Oral Pathol Med.** 1995; 24(8): 361-4.

Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17(2): 79-84.

De Backer MD, Magee PT, Pla J. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol.** 2000; (54): 463-98.

De Bernardis F, Chianni P, Ciccozzi M, Pellegrini G, Ceddia T, Quintil DG, *et al.* Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. **Infect Immun.** 1996; (64):466-71.

De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect Immun.** 2000; 68(6): 3172-79.

Diz Dios P, Ocampo A, Otero I, Iglesias I, Martinez C. Changes in oropharyngeal colonization and infection by *Candida albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Dis.** 2001; (183): 355-6.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. **Microbial Pathogenesis.** 2003; 34(4): 169-77.

Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. **Microbiology.** 1999; (145): 1871–82.

Doyle, JTT, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus.** 1990; 12: 13-8.

Edgerton M, Koshlukova SE. Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva. **Adv Dent Res.** 2000; (14): 16-21.

Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Soderfeldt B, Attstrom R The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. **J Clin Periodontol.** 1999; (26): 143-52.

Epstein JB, Truelove EL, Izutzu KT. Oral candidiasis: pathogenesis and host defense. **Infect Dis.** 1984; 6(1): 96-106.

Epstein JB, Hancock PJ, Nantel S. Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: An outcome-based analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003; 26(2):154-63.

Feijoo J, Fernandez MD, Diz Dios P. Oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected women (Letters to the Editor). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002; 93(3): 219.

Fidel PL, Jr. Immunity to *Candida*. **Oral Dis.** 2002; 8(2): 69-75.

Fiehn NE, Westergaard J. Microbial patterns in pooled subgingival plaque samples from young adults with advanced marginal periodontitis. **Scan J Dent Res.** 1990; (98): 412-21.

Fotedar R, Al Hedaithy SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. **Mycoses.** 2004; 47(3/4): 150-5.

Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF, Ghannoum M, et al Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Microbiology.** 1997;143(2): 331-40.

Garcia RI, Henshaw MM, Krall E.A. Relationship between periodontal disease and systemic health. **Periodontol 2000.** 2001; (25): 21-36.

George KS, Falkler WA, Jr. Coaggregation studies of the *Eubacterium* species. **Oral Microbiol Immunol.** 1992; 7(5): 285-90.

Ghannoum MA, Abu-Alteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses.** 1986; 33(6): 265-82.

Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.** 2000; 13(1): 122-143.

Giammanco GM, Pizzo G, Peccorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici ME. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of Human Immunodeficiency Virus-infected (HIV+) subjects. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; (17): 89-94.

González S, Lobos I, Guajardo A, Celis A, Zemelman R, Smith CT. *et al.* Yeasts in juvenile periodontitis. **J Periodontol.** 1987; (58): 119–24.

Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral Actinomyces species. **Oral Microbiol Immunol.** 1996; 11(1): 59-61.

Grimaudo NJ, Nesbitt WE. Coaggregation of *Candida albicans* with oral Fusobacterium species. **Oral Microbiol Immunol.** 1997; 12(3): 168-73.

Groll AH, De Lucca AJ, Walsh TJ. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. **Trends Microbiol.** 1998; 6(3):117-24.

Grossi SG, Genco RJ. Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship. **Ann Periodontol.** 1998; 3(1): 51-61.

Gugnani HC, Becker K, Fegeler W, Basu S, Chattopadhyaya D, Baveja U, *et al.* Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. **Mycoses.** 2003; 46(8): 299-306.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000.** 1994; (5): 78-111.

Hägewald S, Bernimoulin JP, Köttgen E, Kage A. Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis. **J Periodontol Res.** 2002; (37): 333-9.

Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. **Oral Microbiol Immunol.** 1997; (12): 358-65.

Hannula J, Saarela M, Josimies-Somer H, Takala A, Syrjänen R, Könönen E, *et al.* Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. **Oral Microbiol Immunol.** 1999; (14): 176-82.

Hannula, J. **Clonal types of oral yeasts in relation to age, health, and geography.** [Dissertation]. Helsinki: University of Helsinki; 2000. Disponível em URL: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/laa/hamma/vk/hannula> [2005 set 5].

Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kähkölä, P, Pirinen, S, *et al.* Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15(4): 238-44.

- Hannula J, Dogan B, Slots J, Ökte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. **Oral Microbiol Immunol**. 2001; (16): 113-8.
- Haynes K. Virulence in *Candida* species. **Trends in Microbiology**. 2001; 9(12): 591-6.
- Hayrinen-Immonen R, Ikonen TS, Lepantalo M, Lindgren L, Lindqvist C. Oral health of patients scheduled for elective abdominal aortic correction with prosthesis. **Eur J Vasc Endovasc Surg**. 2000; 19(3): 294-8.
- Hellstein J, Vawter-Hugart H, Fotos P, Schmid J, Soll DR. Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. **J Clin Microbiol**. 1993; (3):3190-9.
- Helovuo H, Hakkarainen K, Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, Staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. **Oral Microbiol Immunol**. 1993; (8): 75-9.
- Höfling JF, Rosa EAR. Main techniques employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. **Alpe Adria Microbiol J**. 1999; 8(1): 5-23.
- Höfling J.F, Barros LM, Alves ACBA, Mariano PLS, Gonçalves RB. Oral colonization by *Candida* species. A Review. Part I: Prevalence and colonization. **Rev Odontol Passo Fundo**. 2004; 9(1): 16-21.
- Holmes AR, McNab R, Jenkinson HF. *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. **Infect Immun**. 1996; 64(11): 4680-5.
- Holmes AR, Bandara BM, Cannon R.D. Saliva promotes *Candida albicans* adherence to human epithelial cells. **J Dent Res**. 2002; 81(1): 28-32.
- Holmstrup P. Non-plaque-induced gingival lesions. **Ann Periodontol**. 1999; 4(1): 20-9.
- Hossain H, Aansar F, Schulz-Weidner N, Wetzel WE, Chakraborty T, Domann E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol Immunol**. 2003; 18(5): 302-8.
- Howell SS, Anthony RM, Power E. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to study of oral carriage of *Candida albicans*. **Lett Appl Microbiol**. 1996; 22 (2): 125-8.

Huang YC, Lin TY, Peng HL. *et al.* Outbreak of *Candida albicans* fungaemia in a neonatal intensive care unit. **Scan J Infect Dis.** 1998; (30): 137-42.

Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ, Gow NA. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartic proteinases in *Candida albicans*. **Mol Microbiol.** 1994; 14(1): 87-99.

Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology.** 2001; 147(8): 1997-2005.

Hujoel PP, Drangsholt M, Spiekerman C, DeRouen TA. Periodontal disease and coronary heart disease risk. **JAMA.** 2000; (284): 1406-10.

Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, *et al.* Evidence implicating phospholipase as a virulence factor in *Candida albicans*. **Infect Immun.** 1995; (63):1996-8.

Ibrahim AS, Filler SG, Sanglard D, Edwards JE, Jr., Hube B. Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. **Infect Immun.** 1998; 66(6):3003-5.

Idesawa M, Sugano N, Ikeda K, Oshikawa M, Takane M, Tanaka H, *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. **Oral Microbiol Immunol.** 2004; 19(4): 230-2.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Jr., Merz WG, Kelley JI, Baqui AAMA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. **J Clin Microbiol.** 1999; (37): 1464-8.

Jabra-Rizk MA, Ferreira SMS, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(12): 4520-2.

Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. **Diag Microbiol Infect Dis.** 2001; (41): 113-9.

Jainkittivong A, Johnson DA, Yeh CK. The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. **Oral Microbiol Immunol.** 1998; 13(3): 181-7.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. **Oral Dis.** 2004; (10): 106-12.

Jin LJ, Chiu GK, Corbet EF. Are periodontal diseases risk factors for certain systemic disorders-what matters to medical practitioners? **Hong Kong Med J.** 2003; 9(1): 31-7.

Johansson I, Bratt P, Hay DI, Schluckebier S, Stromberg N. Adhesion of *Candida albicans*, but non *Candida krusei*, to salivary staterin and mimicking host molecules. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15 (2): 112-8.

Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human beta-defensin: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(1): 90-6.

Kam AP, Xu J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diag Microbiol Infect Dis.** 2002; (43):19-28.

Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, *et al.* Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. **Infect Immun.** 1995; 63(3): 984-8.

Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. **J Periodontol Res.** 1999; 34(1): 25-33.

Kindelan SA, Yeoman CM, Douglas CW, Franklin C. Comparison of intraoral *Candida* carriage in Sjogren's syndrome patients with healthy xerostomic controls. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1998; 85(2): 162-7.

Kirkpatrick WR, Revankar SG, McAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, *et al.* Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. **J Clin Microbiol.** 1998; 36(10): 3007-12.

Kirkpatrick WR, Lopez-Ribot JL, McAtee RK, Patterson TF. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(2): 902-4.

Kleinegger C.L, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J Clin Microbiol.** 1996; (34): 2246–54.

Kleinegger CL, Stoeckel DC, Kurago ZB. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2001; 92(1): 62-7.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontol 2000.** 1997; (14): 33-53.

Kretschmar M, Hube B, Bertsch T, Sanglard D, Merker R, Schroder M, *et al.* Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infect Immun.** 1999; (12): 6637-42.

Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ, Coleman DC, Frosch M, Muhlschlegel FA. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from the pH-regulated PHR1 and PHR2 genes of *C. albicans*. **J Clin Microbiol.** 1999; 37(5): 1587-90.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. **Medical mycology.** Philadelphia: Lea and Febiger: 1992.

Lamont RJ, Jenkinson H. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol Mol Biol Rev.** 1998; 62(4): 1244-63.

Lamster IB, Grbic JT, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchelll A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. **Ann Periodontol.** 1998; 3(1): 62-75.

Lane T, Garcia JR. Phospholipase production in morfological variants of *Candida albicans*. **Mycoses.** 1991; 34(5/6): 217-20.

Lass-Flörl C, Gunsilius E, Gastl G, Englisch M, Ulmer H, Dierich MP, *et al.* Fungal colonization in neutropenic patients: a randomized study comparing itraconazole solution and amphotericin B solution. **Ann Hematol.** 2003; 82(9): 565-9.

Lefler E, McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Initial isolation of *Candida dubliniensis* from the Middle East. **Int J Infect Dis.** 2001; 5(1): 40-2.

Leonhardt A, Renvert S, Dahlen G. Microbial findings at failing implants. **Clin Oral Implants Res.** 1999. 10(5): 339-45.

Leung WK, Dassanayake RS, Yau JYY, Jin LJ, Yam WC, Samaranayake LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(6): 2219-26.

Lin AL, Johnson DA, Patterson TF, Wu DL, Lu I, Shi Q, *et al.* Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. **Oral Microbiol Immunol.** 2001; 16(5): 270–8.

Lindhe J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.** 4º. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. **J Periodontol.** 1993; (64): 155-61.

Liu D, Coloe S, Jones SL, Baird R, Pedersen J. Genetic speciation of *Candida* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **J FEMS Microbiol Lett.** 1996; 145(1): 23-6.

Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schroppel K, Srikantha T, Galask R, *et al.* Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. **J Clin Microbiol.** 1995; (33): 1501–9.

Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. **J Dent Res.** 1999; 78(4): 857-68.

Losberger C, Ernst JF. Sequence of the *Candida albicans* gene encoding actin. **Nucleic Acid Res.** 1989; (17): 9488.

Luu LN, Cowen LE, Sirjusingh C, Kohn LM, Anderson JB. Multilocus genotyping indicates that the ability to invade the blood stream is widespread among *Candida albicans* isolates. **J Clin Microbiol.** 2001; (39): 1657-60.

Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1994; 78(2): 189-93.

Maccarinelli G, Belotti R, Savoldi E, Gervasoni M, Cocchi D. Phagocytosis and killing of *Candida albicans* of polymorphonuclear cells in patients with organ transplant or periodontal disease. **Minerva Stomatol.** 2001; 50(11/12): 345-9.

Maffei CML. **Amostras de *Candida albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem genotípica e fenotípica.**

[tese]. São Paulo: USP; 1996. *Apud* Candido RC, Azevedo RVP, Komesu MCE. Enzymotyping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **Rev Soc Med Trop.** 2000; 33(5): 437-42.

Magalhães MG, Bueno DF, Serra E, Gonçalves, R. Oral manifestation of HIV positive children. **J Clin Pediatr Dent.** 2001; 25(2):103-6.

Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, *et al.* Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. **J Clin Microbiol.** 1999; 37(9): 2817-28.

Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* identification in Brazilian yeast stock collection. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2003; 98(4): 533-8.

Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(9): 3135-9.

Mardegan RC. **Enzimotipagem e genotipagem de isolados de *Candida albicans* da cavidade bucal de crianças cárie-ativas e livres de cárie.** [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.

Masipa JN, Hauman CH, Raubenheimer EJ. Oral carriage of *Candida* species in patients visiting the Medunsa. **J Dent Assoc S Afr.** 1992; 47(9): 407-9.

Mata AL, Rosa RT, Rosa EAR, Gonçalves RB, Höfling JF. Clonal variability among oral *Candida albicans* assessed by allozyme electrophoresis analysis. **Oral Microbiol Immunol.** 2000; 15(6): 350-4.

Matilla KJ, Asikainen S, Wolf J, Jousimies-Somer H, Valtonen V, Nieminen M. Age, dental infections and coronary heart disease. **J Dent Res.** 2000; (79): 756-60.

Mattos-Graner RO, De Moraes AB, Rontani RM, Birman EG. Relation of oral yeast infection in Brazilian infants and use of a pacifier. **ASDC J Dent Child.** 2001; 68(1): 33-6.

McCullough MJ, Ross BC, Dwyer BD, Reade PC. Genotype and phenotype of oral *Candida albicans* from patients infected with human immunodeficiency virus. **Microbiology.** 1994; (140): 1195-1202.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolated from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **J Clin Microbiol.** 1995; (33): 696-700.

McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 1996; (25):136-44.

McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **J Clin Microbiol.** 1999; (37): 417-21.

McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1999; 14(3): 183-9.

McLain N, Dolan JW. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. **Microbiology.** 1997; 143(11): 3521-6.

Mehta SK, Stevens DA, Mishra SK, Feroze F, Pierson DL. Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. **Diag Microbiol Infect Dis.** 1999; (34): 19-25.

Milan EP, De Laet Sant'ana P, De Azevedo Melo AS. *et al.* Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2001; 41(1/2): 29-35.

Miyasaki SH, White TC, Agabian NA fourth secreted aspartyl proteinase gene (SAP4) and a CARE 2 repetitive element located upstream of the SAP1 gene in *Candida albicans*. **J Bacteriol.** 1994; (176): 1702-10.

Moalic E, Gestalin A, Quinio, D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic, *et al.* The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. **Caries Res.** 2001; 35(2): 149-55.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J.** 1998; 31(1): 1-7.

Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of SAP8 and SAP9, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. **Microbiology.** 1998; (144): 2731-7.

Montazeri M, Hedrick HG. Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain. **Appl Environ Microbiol.** 1984; 47(6): 1341-2.

Montour L, Tey R, Xu J. Isolation of *Candida dubliniensis* in an aboriginal community in Ontario, Canada. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(7): 3423-6.

Moore LVH, Moore WEC, Riley C, Brooks CN, Burmeister JA, Smibert RM. Periodontal microflora of HIV positive subjects with gingivitis or adult periodontitis. **J Periodontol.** 1993; 64(1): 48-56.

Moreira D, Spolidorio DMP, Rodrigues JAO, Boriollo MFG, Pereira CV, Rosa EAR *et al.* *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. **Pesqui Odontol Bras.** 2001; 15(3): 187-95.

Morrison HI, Ellison LF, Taylor GW. Periodontal disease and risk of fatal coronary heart and cerebrovascular diseases. **J Cardiovasc Risk.** 1999; (6): 7-11.

Na BK, Lee S, Kim SO, Park YK, Bai GH, Kim SJ, *et al.* Purification and characterization of extracellular aspartic proteinase of *Candida albicans*. **J Microbiol.** 1997; 35(2): 109-16.

Naglik JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglik LL, Greenspan JS, Greenspan D, *et al.* In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. **Infect Immun.** 1999; 67(5): 2482-90.

Newman MG, Takei HH, Carranza FA. **Periodontia Clínica.** 9^o. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Arch Oral Biol.** 1993; 38(12): 1057-63.

Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T. Denture plaque-past and recent concerns. **J Dentistry.** 1998; (26): 299-304.

Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses.** 2001; (44): 9-10.

Nobile CJ, Bruno VM, Richard ML, Davis DA, Mitchell AP. Genetic control of chlamydospore formation in *Candida albicans*. **Microbiology.** 2003; 149(12): 3629-37.

Odden K, Schenick K, Koppang HS, Hurlen B. Candidal infection of the gingiva in HIV-infected persons. **J Oral Pathol.** 1994; (23): 178–83.

Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infection. **J American Academic Dermatol.** 1994; (31): S2-S5.

Odds FC. ***Candida* and candidosis – a review of bibliography.** 2nd edn. London: Baillière Tindall-WB Saunders; 1988. *Apud* Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. **Oral Microbiol Immunol.** 1997; (12): 358-65.

Oliveira JC. **Micologia Médica.** Rio de Janeiro: Control-Lab Editora; 1999.

Oliver DE, Shillitoe EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. **J Oral Pathol.** 1984; 13(3): 265-70.

Ollert MW, Wende C, Görlich M, McMullan-Vogel, CG, Borg Von Zepelin M, Vogel CW, *et al.* Increase expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Virus-positive patients. **J Clin Microbiol.** 1995; 33(10): 2543-9.

Olsvik B, Hansen BF, Tenover FC, Olsen I. Tetracycline-resistant microorganisms recovered from patients with refractory periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1995; (32): 391-6.

O’Sullivan JM, Jenkinson HF, Cannon RD. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. **Microbiology.** 2000; (146): 41-8.

Penha SS, Birman EG, Silveira SRX, Paula CR. Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesqui Odontol Bras.** 2000; 14(2): 119-22.

Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes LB, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, *et al.* Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from Human Immunodeficiency Virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002; 46(6): 1695–703.

Peterson DE, Minah GE, Overholser CD, Suzuki JB, DePaola LG, Stansbury DM, *et al.* Microbiology of acute periodontal infection in myelosuppressed cancer patients. **J Clin Oncol.** 1987; 5(9): 1461-8.

Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: The promise of molecular typing. **Clin Infect Dis.** 1995; (20): 1535-9.

Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, TendolKar S, Hollis RJ, *et al.* Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. **J Clin Microbiol.** 2003; 41(12): 5729-31.

Pichová I, Pavlicková L, Dostál J, Dolejsi E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, *et al.* Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, and *Candida lusitaniae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Biochem.** 2001; (268): 2669-77.

Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. **J Oral Rehabilitation.** 2002; (19): 1115-9.

Pizzo G, Di Francesco GG, Millici ME, Giangreco R. Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. **New Microbiol.** 2000, 23(1): 63-71.

Pizzo G, Barchiesi F, Falconi L, Di Francesco GG, Arzenib D, Millici ME, *et al.* Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates. **Arch Oral Biol.** 2002; 47(3): 189-96.

Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnelly S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. **J Clin Microbiol.** 2000; 38(1): 170-4.

Portela MB, Souza IPR, Costa EMMB, Hagler NA, Soares RM, Santos AL. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.** 2004; 42(12): 5925-7.

Poulter RT. Natural auxotrophic heterozygosity in *Candida albicans*. **Crit Rev Microbiol.** 1987; 15(1): 97-101.

Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. **J Infect Dis.** 1993; 168(2): 463-6.

Price MF, Cawson RA. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia.** 1977; 15(2): 179-85.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia.** 1982; 20(1):7-14.

Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 1997; (35): 2348-58.

Raber-Durlacher JE, Epstein JB, Raber J, Van Dissel JT, Van Winkelhoff AJ, Guit HFL, Van der Velden U. Periodontal infection in cancer patients treated with high-dose chemotherapy. **Support Care Cancer.** 2002; (10): 466-73.

Ramage G, Van De Walle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. **J Clin Microbiol.** 2001; 39(9): 3234-40.

Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. **Oral Microbiol Immunol.** 1990; (5): 166-8.

Rams TE, Andriolo JR, Feik D, Abel SN, Mcgovern TM, Slots J. Microbiological study of HIV-related periodontitis. **J Periodontol.** 1991; 62(1): 74-81.

Rams TE, Slots J. *Candida* biotypes in human adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1991; 6(3): 191-2.

Rams TE, Listgarten MA, Slots J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. **J Clin Periodontol.** 1996; (234): 346-54.

Rams TE, Flynn MJ, Slots J. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. **Clin Infect Dis.** 1997; 25 (2): 224-6.

Ray TL, Wuepper KD. Experimental cutaneous candidiasis in rodents. **J Invest Dermatol.** 1976; 66(1): 29-33. *Apud* Mardegan RC. **Enzimotipagem e genotipagem de isolados de *Candida albicans* da cavidade bucal de crianças cárie-ativas e livres de cárie.** [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2003.

Redding SW, Zellars RC, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Caceres MA, Fothergill AW, *et al.* Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. **J Clin Microbiol.** 1999; 37(12): 3896-900.

Remold H, Fasold H, Staib F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochem Biophys Acta.** 1968; 167(2): 399-406.

- Rindum JL, Stenderup A, Holmstrup P. Identification of *Candida albicans* types related to healthy and pathological oral mucosa. **J Oral Pathol Med.** 1994; 23(9): 406-12.
- Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. **J Clin Periodontol.** 2001; 28(9): 860-4.
- Robinson PG. Treatment of HIV-associated periodontal diseases. **Oral Dis.** 1997; 3 (Suppl 1): S238-40.
- Rodero L, Losso M, Canteros C, Rothenfelner F, Davel G. *Candida dubliniensis*: 1st isolation in Argentina. **Rev Argent Microbiol.** 1998; 30(1): 39-41.
- Rodriguez-Galan MC, Correa SG, Iribarren P, Sotomayor CE. Phenotypic and functional changes on phagocytic cells recruited at the site of *Candida albicans* infection after chronic varied stress exposure. **Med Mycol.** 2002; 40(5): 485-92.
- Rohlf FJ. **NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York: Exeter Software Publishing; 1988. *Apud* Boriollo M.F.G. **Análise da diversidade genética de amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças saudáveis por eletroforese de enzima multiloco.** [tese] Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.
- Rosa EAR, Pereira CV, Boriollo MFG, Höfling JF. Analysis of parity between protein-based electrophoretic methods for the characterization of oral *Candida* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2000; 95(6): 801-6.
- Ruchel R, Tegeler R, Trost MA. Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia.** 1982; 20(3): 233-44.
- Ruchel R, Zimmermann F, Bönning-Atutzer B, Helmchen U. Candidiasis visualized by proteinase-directed immunofluorescence. **Virchows Arch A Pathol Anat.** 1991; (419): 199-202.
- Ruchel R., De Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Coleg GT. *Candida* acid proteinases. **J Med Vet Mycol.** 1992; 30 (suppl 1): 123-32.
- Russel C, Lay KM. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavity of infants. **Arch Oral Biol.** 1973; (18): 957-62. *Apud* Kleinegger C.L, Lockhart SR, Vargas K, Soll DR. Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J Clin Microbiol.** 1996; (34): 2246-54.

Ryder M. Periodontal management of HIV-infected patients. **Periodontol** 2000. 2000; (23): 85-93.

Samaranayake LP, Calman KC, Ferguson MM, Kaye SB, McFarlane TW, Mairs RJ. The oral carriage of yeasts and coliforms in patients on cytotoxic therapy. **J Oral Pathol**. 1984; 13(4): 390-3.

Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev**. 2001; 14(2): 398-429.

Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EH, Beena VT, Yeung KW. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. **J Clin Microbiol**. 2001; 39(9): 3296-3302.

Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, Yau JYY, Tsang WK, Cheung BPK, Yeung KWS. 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. **J Med Microbiol**. 2003; 52(4): 349-59.

Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand**. 1990; (48): 27-36.

Sanz P, Gallego L, Arrese E, Pujana I, López F, Cisterna R. Random amplified DNA as a typing method to differentiate *Candida albicans* strains. [Abstract]. **J Microbiol Methods**. 1996; (27):107.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, *et al*. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. 1988; (239): 487-91.

Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. **J Periodontal Res**. 2004; 39(4): 207-12.

Scannapieco FA, Genco RJ. Association of periodontal infections with atherosclerotic and pulmonary diseases. Review. **J Periodontal Res**. 1999; 34(7): 340-5.

Schaller M, Schafer W, Korting HC, Hube B. Differential expression of secreted aspartic proteinases in a model of human oral candidosis in patient samples from the oral cavity. **Mol Microbiol**. 1998; (29): 605-15.

Schmid J, Odds FC, Wiselka MJ, Nicholson KG, Soll DR. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. **J Clin Microbiol.** 1992; (30): 935-41.

Schmid J, Rotman M, Reed B, Pierson CL, Soll DR. Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their partners. **J Clin Microbiol.** 1993; (31): 39-46.

Schmid J, Herd S, Hunter PR, Cannon RD, Yasin MSM, Samad S, *et al.* Evidence for a general-purpose genotype in *Candida albicans*, highly prevalent in multiple geographical regions, patients types and types of infection. **Microbiology.** 1999; (145): 2405-13.

Schröppel K, Rotman M, Galask R. *et al.* The evolution and replacement of *Candida albicans* strains during recurrent vaginitis demonstrated by DNA fingerprinting. **J Clin Microbiol.** 1994; (32): 2646-54.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Wittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Appl Environ Microbiol.** 1986; (51): 873-84.

Shimizu MT. Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. **Rev Microbiol.** 1989; 19(4): 442-5.

Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin-sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses.** 1996; 39(5/6): 161-7.

Silva V, Cabrera M, Diaz MC, Abarca C, Hermosilla G. Prevalence of *Candida albicans* serotypes in blood isolates in Chile, and first report of *Candida dubliniensis* candidemia. **Ver Iberoam Micol.** 2003; 20(2): 46-51.

Siqueira JF, Jr., Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2004; 97(1): 85-94.

Slots J, Genco RJ. Black-pigmented Bacteroides species, Capnocytophaga species, and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. **J Dent Res.** 1984; 63(3): 412-21.

Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol.** 1988; (3): 47-52.

Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol.** 1990; (5): 305-8.

Slots J, Taubman MA. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology.** St. Louis: Mosby Year Book; 1992.

Slots J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. **Oral Microbiol Immunol.** 2004; 19(4): 217-23.

Sneath PHA, Sokal RQ. **Numerical taxonomy.** San Francisco: WH Freeman and Company; 1973.

Socransky SS. Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1979. (6): 16-21. *Apud* Slots J, Taubman MA. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology.** St. Louis: Mosby Year Book; 1992.

Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontol 2000.** 1994; (5): 7-25.

Soll DR, Galask R, Schmid J, Hanna C, Mac K, Morrow B. Genetic dissimilarity of commensal strains of *Candida* spp. carried in different anatomical locations of the same healthy women. **J Clin Microbiol.** 1991; (29): 1702-10.

Soll DR. DNA fingerprinting of *Candida albicans*. **J Mycol Med.** 1993; (3): 37-44.

Souza EMB, Paula CR, Purchio A, Gambale W, Correa B, Cury AE. Aspectos morfofisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *C. albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. **Rev Microbiol.** 1990; (21): 247-53.

Spolidorio DM, Spolidorio LC, Barbeiro RH, Ling JF, Bernardo WLC, Pavan S. Quantitative evaluation of *Streptococcus mutans* and *Candida species* and salivary factors in the oral cavity of patient undergoing radiotherapy. **Pesqui Odontol Bras.** 2001; 15(4): 354-8.

Staib F. Serum protein as nitrogen source for yeast-like fungi. **Sabouraudia.** 1965; (4): 187-93.

Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2000; (97): 6102-7.

Starr JR, White TC, Leroux BG, Luís HS, Bernardo M, Leitão J, *et al.* Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17(5): 304–10.

Steele C, Leigh J, Swoboda R, Ozenci H, Fidel PL Jr. Potential role for a carbohydrate moiety in anti-*Candida* activity of human oral epithelial cells. **Infect Immun.** 2001; 69(11): 7091-9.

Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. **Infect Immun.** 2002; 70(2): 577-83.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology.** 1995; (141): 1507-21.

Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill MC, Bennett DE, Shanley DB, *et al.* Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. **J Med Microbiol.** 1996; (44): 399-408.

Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S, *et al.* Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J Clin Microbiol.** 1997; 35(4): 960-4.

Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. **Curr Top Med Mycol.** 1998; (8): 15–25.

Sweeney MP, Bagg J, Baxter WP, Aitchinson TC. Oral disease in terminally ill cancer patients with xerostomia. **Oral Oncol.** 1998; 34(2):123-6.

Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. **Mycoses.** 2004; 47(7): 315-8.

Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Magalhães FA, Uzeda M, *et al.* Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002; 93(2): 149-54.

Van Belkum A, Melchers W, De Pauw BE, Scherer S, Quint W, Meis JF. Genotypic characterization of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. **J Infect Dis.** 1994; 169 (5): 1062-70.

Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. **Periodontol** 2000. 1996; (10): 45–78.

Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-positive individuals. **J Clin Microbiol.** 2002; 40(2): 341-50.

Velegaki A, Nicolautou O, Teodoridou M, Mostrou G, Legakis NJ. Paediatric AIDS – related linear gingival erythema: a form of erythematous candidiasis? Case report. **J Oral Pathol Med.** 1999; (28): 178-82.

Vidotto V, Koga-Ito CY, Milano R, Fianchino B, Pontón J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. **Ver Iberoam Micol.** 1999; 16(4): 208-10.

Xu YY, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Nikawa H. In vitro susceptibility of *Candida species* to lactoferrin. **Med Mycol.** 1999; 37(1): 35-41.

Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. **J Clin Microbiol.** 1999; 37(12): 3835-43.

Xu J, Ramos A, Vilgalys R, Mitchell TG. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans*. **J Clin Microbiol.** 2000; (38): 1214-20.

Waltimo TM, Dassanayake RS, Orstavik D, Haapasalo MPP, Samaranayake LP. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiol Immunol.** 2001; (16): 106–12.

Webster CE, Odds FC. Growth of pathogenic *Candida* isolates anaerobically and under elevated concentrations of CO₂ in air. [published erratum appears in: **J. Med. Vet. Mycol.** 1988; 26(1): 75]. **J Med Vet Mycol.** 1987; 25(1): 47-53.

Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with random primers. **Nucleic Acids Res.** 1990; (18): 7213-8.

White TC, AGABIAN N. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **J Bacteriol.** 1995; 177(8): 5215-21.

Whittaker RH, Margulis L. Protist classification and the Kingdoms of organisms. **Biosystems**. 1978; 10(1/2): 3-18.

Williams JGK, Kubelik AR, Livac KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res**. 1990; (18): 6531-5.

Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**. 1986; 24(5): 415-7.

Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. **Diabet Med**. 1999; 16(8): 675-9.

Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM, *et al*. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. **J Oral Pathol Med**. 2000; 29(2): 86-90.

Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ, *et al*. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2001; 91(3): 327-31.

Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J. In-vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by antimycotic agents. **J Med Microbiol**. 1996; 44(4): 311-6.

Yuan K, Chang CJ, Hsu PC, Sun HS, Tseng CC, Wang JR. Detection of putative periodontal pathogens in non-insulin-dependent diabetes mellitus and non-diabetes mellitus by polymerase chain reaction. **J Periodontol Res**. 2001; (36): 18-24.

Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J Periodontol**. 1990; 61(11): 699-704.

Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect Immun**. 2001; 69(1): 405-12.