

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

RITA DE CÁSSIA MARDEGAN
Bióloga

ENZIMOTIPAGEM E GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE
Candida albicans DA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS
CÁRIE ATIVAS E LIVRES DE CÁRIE.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Buco Dental, Área de
Concentração em Microbiologia & Imunologia.

PIRACICABA
2003

RITA DE CÁSSIA MARDEGAN
Bióloga

ENZIMOTIPAGEM E GENOTIPAGEM DE ISOLADOS DE
Candida albicans DA CAVIDADE ORAL DE CRIANÇAS
CÁRIE ATIVAS E LIVRES DE CÁRIE.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CPG-036/83
CPG. 30/04/2003
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Biologia Buco Dental, Área de
Concentração em Microbiologia & Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves

Prof. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner

PIRACICABA
2003

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	M334e
V	EX
TOMBO BC/	54270
PROC.	124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	19/06/03
Nº CPD	

CM00185230-0

Bib ID 293080

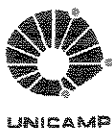
Ficha Catalográfica

M334e Mardegan, Rita de Cássia.
 Enzimotipagem e genotipagem de isolados de *Candida albicans* da cavidade oral de crianças cárie ativas e livres de cárie. / Rita de Cássia Mardegan. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 xix, 132p. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Candida albicans*. 2. Fosfolipase. 3. Proteinase. 4. Cáries dentárias. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata RITA DE CÁSSIA MARDEGAN aprovada.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2. Prof. Dr. REGINALDO BRUNO GONCALVES

3. Profa. Dra. RENATA O. MATTOS GRANER

200320599

Dedicatória

A Deus

Por estar sempre no meu caminho

Obrigado Meu Deus!

Aos meus pais

Dirceu e Sônia, que muitas vezes, deixaram de realizar seus sonhos,

para realizar os meus. Minha eterna gratidão, pelo amor

incondicional, pelo carinho, apoio e incentivo.

Muito obrigado Pai!

Muita obrigada Mãe!

Aos meus irmãos

Cintia, Junior, Amanda, companheiros de todos os momentos

de luta, sempre solícitos, que me deram incentivo para

continuar a caminhar em busca dos meus ideais.

Muito obrigado!

As minhas amigas

*Marlise e Regianne, que sempre estiveram ao
meu lado, ajudaram-me a manter forte o
objetivo e vencer as barreiras...
A vocês o meu muito obrigado!*

Ao Eduardo Sucker

*pela dedicação, carinho, compreensão e,
acima de tudo, amor e respeito.
Seu amor e seu incentivo fizeram-me confiante.
A você meu muito obrigado!*

Ao Prof. Dr. Celso Paulino da Costa

“A morte não existe”... O que se dá é apenas uma transformação em nossa maneira de ser. Não espere que, depois desta, exista outra vida. Não! A vida é a mesma. A vida eterna já está sendo vivida para todos nós. Depois da morte continuaremos ser o que já somos, por que a morte não existe! Ao Sr. o meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. José Francisco Hofling, sempre solícito, a quem respeito e admiro, por ter acreditado em meu potencial, pela orientação, pelo carinho e atenção sempre presentes durante a realização deste trabalho. Ao Sr. o meu muito obrigado!

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, por todas as oportunidades que me foram dadas, proporcionando meu crescimento profissional e individual.

A você, o meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho (Diretor), pelo acolhimento e pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

Aos Profs. Reginaldo Bruno Gonçalves, Antonio Olavo Cardoso Jorge e Renata de Oliveira Mattos-Graner, por aceitarem compor a banca examinadora e avaliar este trabalho de tese.

A Profa. Dra. Silvana Pereira Barros, coordenadora do curso de pós graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP.

A Magda Elizabeth B. Gouvêa que coletou as amostras utilizadas neste estudo, e que gentilmente nos concedeu para essa pesquisa.

A Janaina Rodrigues e Daniel Saito pela participação neste estudo científico e inspiração no início desta pesquisa.

Aos meus amigos de turma da Pós-Graduação Letizia, Ana Claudia, Marcelo Boriollo, Vagner, Marcelo Napimoga, Marcelle, Iriana, Janaina, Rafael e Thais, pela amizade e cumplicidade. A nossa convivência me proporcionou momentos de muita alegria e amadurecimento pessoal.

Aos Funcionários do departamento de Microbiologia e Imunologia Anderson, Vilma, e Flávia, pela amizade, colaboração e disposição durante nossa convivência e pelo respeito que sempre me distinguiram.

Aos amigos Prof. Dr. Edvaldo A. R. Rosa e Rosemeire T. Rosa, obrigado pelos ensinamentos, apoio e amizade sempre dispensados.

A minha amiga Heloisa Maria Ceccotti, pelo companherismo demonstrado a todo instante, incentivo e amizade sempre presente em nossa convivência.

Aos amigos Marli Aparecida Barbosa, Núbia Medeiros, Vagner Rogério Romano, André Chinelatto, Wilson de Almeida Junior, pela amizade e apoio dispensado nos momentos oportunos, minha eterna gratidão.

A minha tia Ada e minha avó Irene, pela força e incentivo a todo o momento, meu muito obrigado.

Ao meu primo Gustavo B. Camille, pelos momentos de alegria, que sempre me proporciona. A você e a toda nossa família, eu dedico os frutos desse trabalho!

A CAPES, pelo apoio financeiro instituído pela concessão de bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	1
LISTAS DE FIGURAS	3
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS GERAIS DE CANDIDA	15
2.2 ESPÉCIES DE CANDIDA ASSOCIADAS À CAVIDADE ORAL	16
2.3 IDADE DO HOSPEDEIRO E COLONIZAÇÃO POR ESPÉCIES DE CANDIDA	18
2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CÁRIE E LEVEDURA	20
2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA	23
2.6 FOSFOLIPASE	24
2.7 PROTEINASE	29
2.8 MÉTODOS PARA TIPAGEM MOLECULAR	35
3 PROPOSIÇÃO	41

4	METODOLOGIA	43
4.1	<i>PROCEDÊNCIA DAS CEPAS</i>	43
4.2	<i>COLETA DAS AMOSTRAS</i>	43
4.3	<i>PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS</i>	44
4.4	<i>IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CANDIDA</i>	45
4.5	<i>CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS</i>	46
4.6	<i>TESTE DE PROTEINASE E FOSFOLIPASE</i>	47
4.7	<i>EXTRAÇÃO DO DNA</i>	48
4.8	<i>AP-PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE UTILIZANDO PRIMER ARBITRÁRIO)</i>	49
5	RESULTADOS	53
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
	BIBLIOGRAFIA	123
	ANEXOS	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Medida da atividade enzimática	48
Tabela 2 -	Perfil da atividade enzimática da proteinase produzida por <i>C. albicans</i> , nos grupos cárie ativos e livres de cárie	56
Tabela 3 -	Perfil da atividade enzimática da fosfolipase produzida por <i>C. albicans</i> , nos grupos cárie ativos e livres de cárie.	56
Tabela 4 -	Número de perfis genotípicos de <i>C. albicans</i> e número total de cepas analisadas pela técnica AP-PCR, em indivíduos cárie ativos.	59
Tabela 5-	Número de perfis genotípicos de <i>C. albicans</i> e número total de cepas analisadas pela técnica AP-PCR, em indivíduos livres de cárie.	59
Tabela 6-	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 7	61
Tabela 7 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 8	63
Tabela 8 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 15	64
Tabela 9 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 28	65
Tabela 10-	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 31	66
Tabela 11 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 32	67
Tabela 12 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 33	69

Tabela 13 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 35	70
Tabela 14 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 59	71
Tabela 15 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 63	72
Tabela 16 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 17	74
Tabela 17 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 18	75
Tabela 18 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 34	76
Tabela 19 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 46	76
Tabela 20 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 56	78
Tabela 21 -	Perfis genotípicos e enzimático de amostras de <i>C. albicans</i> do voluntário 60	79
Tabela 22 -	Características fenotípicas e genotípicas do grupo cárie ativo. Relação entre o número de genótipos e fenótipos de um mesmo voluntário	80
Tabela 23 -	Características fenotípicas e genotípicas do grupo livre de cárie. Relação entre o número de genótipos e fenótipos de um mesmo voluntário	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclos do termociclador	50
Figura 2 -	Cultivo de 4 cepas de <i>Candida albicans</i> em Ágar proteinase (A) e de 8 cepas de <i>C. albicans</i> em Ágar fosfolipase (B). Após o período de incubação, pode-se observar zonas de degradação ao redor da colônias de leveduras.	53
Figura 3 -	Cálculo utilizado para medir a atividade enzimática de colônias de <i>Candida albicans</i> , descrito por Price <i>et al.</i> , 1982.	54
Figura 4 -	Frequência de cepas de <i>Candida albicans</i> com atividade enzimática para proteinase positiva, incluindo índices 1 e 2 e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa (índice 0)	55
Figura 5 -	Frequência de cepas de <i>Candida albicans</i> com atividade enzimática para fosfolipase positiva, incluindo índices 1 e 2 e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa (índice 0)	55
Figura 6 -	Porcentagem de cepas com atividade enzimática da proteinase positiva e negativa, nos grupos cárie ativos e livres de cárie.	57
Figura 7 -	Porcentagem de cepas com atividade enzimática da fosfolipase positiva e negativa, nos grupos cárie ativos e livres de cárie.	57
Figura 8 -	Perfis eletroforéticos de <i>Candida albicans</i> da cavidade oral do voluntário 7, do grupo cárie ativo	58
Figura 9 -	Dendograma representativo do voluntário 7, grupo cárie ativo	60
Figura 10 -	Dendograma representativo do voluntário 8, grupo cárie ativo	62
Figura 11 -	Dendograma representativo do voluntário 15, grupo cárie ativo	63
Figura 12 -	Dendograma representativo do voluntário 28, grupo cárie ativo	65
Figura 13 -	Dendograma representativo do voluntário 31, grupo cárie ativo	66

Figura 14 - Dendograma representativo do voluntário 32, grupo cárie ativo	67
Figura 15 - Dendograma representativo do voluntário 33, grupo cárie ativo	68
Figura 16 - Dendograma representativo do voluntário 35, grupo cárie ativo	69
Figura 17 - Dendograma representativo do voluntário 59, grupo cárie ativo	70
Figura 18 - Dendograma representativo do voluntário 63, grupo cárie ativo	72
Figura 19 - Dendograma representativo do voluntário 17, grupo livre de cárie	73
Figura 20 - Dendograma representativo do voluntário 18, grupo livre de cárie	74
Figura 21 - Dendograma representativo do voluntário 34, grupo livre de cárie	75
Figura 22 - Dendograma representativo do voluntário 46, grupo livre de cárie	76
Figura 23 - Dendograma representativo do voluntário 56, grupo livre de cárie	77
Figura 24 - Dendograma representativo do voluntário 60, grupo livre de cárie	78
Figura 25 - Média do número de linhagens clonais nos grupos cárie ativos e livres de cárie	80
Figura 26 - Média do número de biótipos nos grupos cárie ativos e livres de cárie	80
Figura 27 - Média do número de linhagens clonais e biótipos no grupo cárie ativo	82
Figura 28 - Média do número de linhagens clonais e biótipos no grupo livre de cárie	82
Figura 29 - Dendograma representativo dos voluntários pertencentes ao grupo cárie ativo	83
Figura 30 - Dendograma representativo dos voluntários pertencentes ao grupo livre de cárie	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase com Primers Arbitrários
BSA	-	Albumina do Soro Bovino
<i>C. albicans</i>	-	<i>Candida albicans</i>
dATP	-	deoxionucleosídeo adenina trifosfato
dCTP	-	deoxionucleosídeo citosina trifosfato
dGTP	-	deoxionucleosídeo guanina trifosfato
DNA	-	Ácido deoxiribonucleico
dTTP	-	Deoxionucleosídeo timina trifosfato
<i>et al.</i>	-	E outros (abreviatura de “ <i>et alii</i> ”)
g	-	Gramas
<i>In vitro</i>	-	conjunto de reações que se realizam em condições laboratoriais
<i>In vivo</i>	-	Experimento realizado em seres vivos
M	-	molar
MCL	-	Meio completo para levedura
MgCl ₂	-	Cloreto de magnésio
Mg/mL	-	Microgramas por mililitro
mL	-	Mililitro
mm	-	Milímetro
mM	-	milimolar

NaCL	- Cloreto sódio
ng	- nanograma
°C	- grau Celsius
pb	- Pares de base de DNA
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial hidrogeniônico
PZ	- Zona de precipitação
q.s.q	- Quantidade suficiente para atingir determinado volume
RAPD	- Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso
rpm	- Rotação por minuto
Taq DNA polimerase	- Enzima DNA polimerase proveniente da <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	- Tampão Tris-borato-EDTA
TE	- Tampão Tris-EDTA
UFC	- Unidade formadora de colônias
UPGMA	- Unweighted pair-group method with mathematic average
YPD	- Yest peptone dextrose
µg/mL	- Microgramas por mililitro
µM	- micromolar
RFLP	- Restriction fragment length polymorphism
RAPD	- Randon amplification of polymorphic DNA

RESUMO

Um total de 158 amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de crianças, com idades entre 24 e 36 meses, divididas em dois grupos: Cárie ativas (104 amostras) e Livres de Cárie (54 amostras) foram estudadas. Com base nos dados da literatura, a proposição da presente pesquisa foi: 1) analisar e comparar a produção de proteinases e fosfolipases de *Candida albicans*, entre os dois grupos; 2) relacionar a diversidade fenotípica quanto à produção dessa enzima com o polimorfismo genético, através da técnica de AP-PCR. As amostras isoladas e identificadas como *Candida albicans*, foram processadas para cultivo em meio de cultura Ágar proteinase e Ágar fosfolipase e incubadas a 37°C por 7 e 4 dias, respectivamente. Após esse período, foi medida a atividade enzimática das cepas proteinase e fosfolipase positivas, classificando-as com os índices, 0 (negativa), 1 (positiva) e 2 (positiva elevada). Todas as amostras foram submetidas à técnica de AP-PCR, usando o “primer” arbitrário AP-3. As análises enzimáticas revelaram não haver diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados. A técnica de AP-PCR foi eficaz em demonstrar o polimorfismo genético de *C. albicans* intra indivíduos, revelando maior diversidade clonal em indivíduos cárie ativos em relação aos livres de cárie e a construção de dendogramas de similaridade demonstrou que linhagens clonais semelhantes ocorrem apenas intra indivíduos e não entre indivíduos. Os resultados obtidos permitiram observar que o perfil enzimático independe das características genotípicas das cepas.

ABSTRACT

A total of 158 samples of *Candida albicans* isolated from the oral cavities of healthy children, with ages ranging from 24 to 36 months divided in two groups, caries active and caries free were studied. Based on the literature, the aims of the present study were: 1) to analyze and to compare between the groups, proteinase and phospholipase produced by *Candida albicans*; 2) to correlate the phenotypic diversity of this enzyme with the genetic polymorphism using the AP-PCR method. The samples isolated and identified as *C. albicans* were inoculated in proteinase agar and phospholipase agar media and then incubated at 37 °C for 7 days and 4 days respectively. After the incubation period, the enzymatic activity of the positive proteinase and phospholipase strains was measured according to the indexes 0 (zero) 1 (one) and 2 (two). All the samples were subjected to AP-PCR method, using the arbitrary primer AP-3. The enzymatic analysis showed no statistically significant differences between the groups studied. The AP-PCR method was effective to demonstrate the genetic polymorphism in the *C. albicans* intra individually, revealing a greater clonal diversity in caries actives children in relation to caries free, ones the construction of dendograms of similarity showed clonal lineage intra individual only. The results allowed the observation that the enzymatic profile does not depend on the genotypic characteristics of the strains.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida*, compreende um grupo de leveduras que se encontram amplamente distribuídas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como saprófitas ou parasitas no homem e em outras espécies animais de sangue quente (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

A ocorrência de *Candida* na cavidade bucal se apresenta sob a forma comensal e constitui parte da microbiota bucal residente. As razões para o estabelecimento de infecções são fatores precipitadores, tais como, queda da imunidade do hospedeiro, desordens endócrinas, lesões em mucosas, higiene oral deficiente, tratamento prolongado com antibióticos, corticosteróides e outros. A cavidade bucal, ao contrário de outras cavidades naturais, está constantemente exposta a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, em decorrência dos atos fisiológicos a ela inerentes, destacando-se a mastigação. Desta forma, está propensa a apresentar com frequência, modificações sistêmicas que poderão concorrer para o rompimento do equilíbrio biológico entre população microbiana e hospedeiro (LACAZ, 1980). As espécies de *Candida* se aderem as superfícies do epitélio oral (FUKAYAMA & CALDERONE, 1991), a próteses e aparelhos ortodônticos (BUDTZ-JÖRGENSEN *et al.*, 1975) e em menor intensidade a superfícies dentais limpas, mas ao passo em que se forma a película adquirida, essa colonização aumenta podendo ocorrer tanto através da adesão direta aos receptores da película – atuando como colonizador pioneiro – como indiretamente, pela coagregação a outros microrganismos já aderidos ao biofilme dental (HOLMES *et al.*, 1995; DE REPENTIGNY *et al.*, 2000).

Sendo que após esse evento, futuras interações podem ocorrer entre o hospedeiro e as células fúngicas que são importantes para permanência ou remoção dessa levedura na cavidade bucal. A espécie *Candida albicans*, considerada como uma das mais patogênicas é a mais freqüente levedura isolada desse local (STENDERUP, 1990).

Leveduras pertencentes ao gênero *Candida* fazem parte da microbiota bucal residente tanto de adultos, como de crianças, e a freqüência, intensidade e espécies predominantes variam em função da idade do hospedeiro (KLEINEGGER *et al.*, 1996), e de condições variadas como: presença ou não de cárie (RADFORD *et al.*, 2000), qualidade da dieta (BASU *et al.*, 1961), higiene oral (JORGE *et al.*, 1987), alterações do fluxo salivar e desordens sistêmicas (STENDERUP, 1990).

Para os mecanismos que determinam a patogênicidade do gênero *Candida*, várias hipóteses têm sido sugeridas, como: capacidade de apresentar-se sob diversas formas, chamadas de variações adaptativas, habilidade de formarem hifas, capacidade de aderência às superfícies mucosas, produção de enzimas hidrolíticas, ou resposta inflamatória aos antígenos de *Candida* (BUDTZ-JORGENSEN, 1980). Fungos patogênicos como *Candida albicans* secretam enzimas que são consideradas essenciais para virulência. Estas estão divididas em dois tipos principais: proteinases que hidrolisam peptídeos vinculados à membrana (HUBE *et al.*, 1998) e fosfolipases que hidrolisam fosfolípidios (IBRAHIM *et al.*, 1995). A produção de enzimas hidrolíticas é considerada como uma importante característica de virulência e alguns pesquisadores têm sugerido que essa propriedade pode ser explorada como um critério para biotipagem de *Candida albicans* (PRICE *et al.*, 1982; SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; CANDIDO *et al.*, 2000).

Em adição a esses métodos fenotípicos, para determinação do potencial patogênico, atualmente, tem se tornado importante o uso de métodos moleculares, visto que, a capacidade de distinguir entre isolados distintos da mesma espécie é importante para um melhor conhecimento dessa levedura. Esse tipo de análise pode promover informações valiosas acerca da relação entre isolados da mesma espécie em diferentes sítios no mesmo indivíduo ou em uma determinada população (MELO *et al.*, 1998).

Dentre os métodos moleculares, a técnica AP-PCR (Reação em cadeia da polimerase com *primers* arbitrários) é bastante empregada em estudos sistemáticos ou epidemiológicos. Nesse processo, somente um único *primer* arbitrário é empregado, enquanto que no PCR clássico, dois *primers* que codificam uma sequência conhecida são utilizados (WELSH & McCLELLAND, 1990). Em estudos que aplicam essa técnica é constatado que um ou mais perfis genéticos de *Candida albicans* podem ser encontrados em um mesmo indivíduo (MELO *et al.*, 1998).

Pelo fato dos mecanismos de virulência de *Candida albicans* não estarem totalmente esclarecidos, o propósito da presente pesquisa foi analisar o perfil fenotípico (enzimático) e comparar com o perfil genotípico dessas amostras, o que poderá contribuir para um melhor esclarecimento sobre as características patogênicas relacionada com a diversidade genética dessa espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE CANDIDA

As diferentes espécies que compõem o gênero *Candida*, estão distribuídas em diferentes filos de acordo com as características sexuais de cada uma, podendo estar em estados anamórficos, ou telemórficos. Existem ainda espécies que não apresentam estado perfeito conhecido, como é o caso de *Candida albicans*, principal espécie de interesse médico, e de *Candida tropicalis* (LODDER, 1970). As leveduras desse gênero acham-se amplamente distribuídas na natureza, sendo que algumas espécies vivem como saprófitas ou parasita no homem e em outras espécies animais de sangue quente (BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990).

As espécies que fazem parte da microbiota normal da pele, boca e trato gastro intestinal são a causa mais freqüente de infecções fúngicas humanas e além de estarem presentes na cavidade bucal e peribucal, sua forma leveduriforme vive normalmente na orofaringe, nas dobras da pele, em secreções brônquicas, trato genito-urinário e gastrointestinal de humanos (LACAZ, 1980). Em condições normais, o hospedeiro mantém esses microrganismos como comensais, entretanto, alterações locais ou sistêmicas favorecem o desenvolvimento de sua ação patogênica, causando danos para o homem, particularmente a candidíase (ALY *et al.*, 1975).

Candida albicans é um dos poucos microrganismos eucariotos que desenvolveu uma associação com o homem. Este fungo possui uma variedade de formas capazes de auxiliar sua sobrevivência como microrganismo comensal, mas como e em que circunstâncias os diferentes tipos morfológicos contribuem para sua patogenicidade ainda é pouco conhecida (MICHAEL & STEPHEN, 1995).

2.2 ESPÉCIES DE CANDIDA ASSOCIADAS À CAVIDADE ORAL

A cavidade oral humana tem sido considerada um meio ambiente único, por oferecer uma variedade de nichos ecológicos para colonização microbiana. Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* spp habitam diferentes superfícies epiteliais do corpo, incluindo a mucosa oral, fazendo parte da microbiota residente (McCULLOUGH *et al.*, 1996). Além de *Candida albicans*, outras espécies têm sido isoladas, como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, e estudos relatam que um único hospedeiro pode ser colonizado tanto por uma, como por múltiplas espécies de *Candida* ou ainda por diferentes genótipos da mesma espécie, no mesmo ou em diferentes sítios no organismo (XU *et al.*, 1999).

Segundo STENDERUP (1990) a espécie de maior importância médica, pelo fato de ser agente etiológico de grande parte das infecções fúngicas ocorridas na cavidade oral, é *Candida albicans*, e sua ocorrência neste local representa 60% a 70% dos isolados,

seguida de *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e outras espécies do gênero que ocorrem de maneira mais rara e transitória.

Pelo fato da cavidade oral possuir diversos mecanismos de defesa, uma grande variedade de microrganismos são repetidamente introduzidos e removidos, somente se estabelecendo aqueles que possuem capacidade de aderência às superfícies da cavidade oral ou que de alguma maneira permaneçam retidos. A aderência de *Candida albicans* às células do epitélio oral representa um estado habitual de comensalismo, pois acredita-se que baixos níveis dessa levedura façam parte da microbiota residente normal em humanos. Sendo esse evento, importante para a colonização inicial e persistência dessa levedura (BRASSART *et al.*, 1991). Aderência a diferentes células do hospedeiro incluem: células do epitélio (FUKAYAMA & CALDERONE, 1991), do endotélio (GHANNOUM *et al.*, 1992), a hidroxiapatita dos dentes (CANNON *et al.*, 1999), a próteses e aparelhos ortodônticos (BUDTZ-JÖRGENSEN *et al.*, 1975).

Segundo LAMKIM & OPPENHEIM (1993), *Candida albicans* adere pouco a superfícies dentais limpas, mas à medida que se forma a película adquirida esse evento aumenta, podendo colonizar o esmalte dos dentes e as superfícies radiculares, tanto através da adesão direta aos receptores da película – atuando como colonizador pioneiro - como indiretamente, pela coagregação a outros microrganismos já aderidos ao biofilme dental (HOLMES *et al.*, 1995; DE-REPENTIGNY *et al.*, 2000). Além disso, interações posteriores podem ocorrer entre o hospedeiro e as células fúngicas que são importantes para permanência ou remoção dessa levedura na cavidade oral. SHERWOOD *et al.*, 1992, relatam, que a espécie *Candida albicans* é capaz de apresentar-se sob diversas formas,

chamadas de variações adaptativas, sendo que a forma hifal é mais virulenta e mais aderente em relação à célula leveduriforme, dessa forma a capacidade de *Candida albicans* de formar tubos germinativos parecem contribuir para sua virulência visto que amostras obtidas de tecidos infectados em homens e animais a maioria das vezes contém hifas, pseudo-hifas e células leveduriformes .

2.3 IDADE DO HOSPEDEIRO E COLONIZAÇÃO POR ESPÉCIES DE CANDIDA

Leveduras do gênero *Candida* tem demonstrado serem habitantes comuns da cavidade oral tanto de adultos como de crianças (BARLOW & CHATTAWAY, 1969; DARWAZEH & AL-BASHIR, 1995; HANNULA *et al.*, 1999). A frequência, intensidade e espécies predominantes variam em função da idade do hospedeiro (KLEINEGGER *et al.*, 1996). Durante o período neonatal, as condições que predispõe a instalação de leveduras são provavelmente a imaturidade do sistema imune e circunstâncias de desenvolvimento da microbiota oral (OKSALA, 1990).

As potenciais fontes de leveduras para colonização primária da cavidade bucal de bebês são pouco conhecidas. A cavidade bucal do neonato pode ser infectada por leveduras do gênero *Candida* durante o parto normal. Estudos sobre transmissão horizontal e vertical têm demonstrado que cepas de *Candida* de origem materna e de neonatos são de origem idêntica em 14% das vezes, sendo que em tais ocasiões a espécie mais frequentemente encontrada é *Candida albicans* (WAGGONER-FONTAIN *et al.*, 1996).

Segundo SAIMAN *et al.*, 2001, algumas horas após o nascimento, a cavidade bucal do recém nascido adquire sua colonização pioneira e as possíveis fontes de microrganismos para cavidade bucal deste, são as mãos, pele e cavidade bucal dos pais ou de pessoas diretamente ligadas.

LAY & RUSSEL (1977) salientam que 5% a 7% das crianças apresentam *Candida albicans* durante as primeiras horas após o nascimento e decorrido uma semana, esses valores chegam a 14%. BERDICEVSKY *et al.*, 1984 mencionam a presença de *Candida* spp em 49% das crianças entre 3 e 6 anos e em 65% delas entre 6 e 12 anos. Um estudo longitudinal demonstrou a presença de espécies de *Candida* em torno de 5,7% nas primeiras horas após o nascimento, aumentando para 82% em 4 semanas, e decrescendo para 50% em torno de 1 ano de vida (RUSSEL & LAY, 1973).

A recuperação de leveduras da cavidade bucal na infância, tem sido associada ao uso de chupeta, deficiências nutricionais, irrompimento dos primeiros dentes, uso de mamadeiras, múltiplas lesões de cárie, higiene bucal deficiente, terapia antibiótica, idade e sexo (SEO *et al.*, 1987; PIENIHAQQINEN *et al.*, 1988; DARWAZEL & AL-BASHIR, 1995; OLLILA *et al.*, 1997; HANNULA *et al.*, 1999). Ao passo que em idosos ocorre um aumento na colonização que pode ser devido ao uso de medicamentos e/ ou próteses (ODDS, 1988).

Segundo HANNULA *et al.*, 1999 em estudos para determinarem a ocorrência e estabilidade da colonização bucal por diferentes espécies de *Candida* em 40 crianças saudáveis durante 22 meses, os autores sugerem que em contraste com a colonização bucal

por *Candida* spp em adultos, a colonização em crianças parece ser inconsistente, sugerindo que essas espécies são colonizadores transitórios nesta população.

Em um estudo feito por KLEINEGGER *et al.*, 1996 comparando grupos de indivíduos de diferentes idades, variando de 5 meses a 60 anos, demonstrou-se que a frequência e variações genéticas de *Candida albicans* é particular de cada idade. Mudanças na prevalência de leveduras orais ao longo da primeira infância ocorre devido a mudanças simultâneas no desenvolvimento da microbiota bucal (RUSSELL & LAY, 1973)

2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE CÁRIE E LEVEDURA

A cárie dental é considerada uma doença infecciosa e multifatorial. Os estreptococos do grupo mutans, principalmente *Streptococcus mutans*, são considerados os principais agentes etiológicos da doença cárie, sendo que lactobacilos e outros microrganismos participam da progressão da doença (LOESCHE, 1993).

Na dentição decídua, a cárie dental está entre os mais prevalentes problemas relacionados à saúde de bebês e criança durante a primeira infância (SCHEMMEL *et al.*, 1982).

No Brasil, a prevalência de cavidades de cárie em relação à idade das crianças tem sido estimada em 10% aos 12 meses de idade; 50% aos 36 meses (MORITA *et al.*, 1993); 11% na faixa etária entre 0 e 2 anos e 26% na faixa etária entre 3 e 4 anos (TOMITA *et al.*, 1996). Ainda, em um estudo realizado com 322 crianças entre 6 e 36 meses de idade,

observou-se uma prevalência de cárie em 0% na faixa etária de 6 a 12 meses, 3% de 13 a 18 meses, 14% de 19 a 24 meses, 38% de 25 a 30 meses e 48,5% em crianças de 31 a 36 meses de idade (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996).

Leveduras são mais prevalentes na saliva e biofilme dental de indivíduos cárie ativos, do que em livres de cárie (KRASSE 1954; HODSON & CRAIG, 1972; GÁBRIS *et al.*, 1999; RADFORD *et al.*, 2000). Entretanto, não está estabelecido se leveduras orais desempenham algum papel na etiologia da doença cárie.

A associação entre quantidade de fungos e atividade cariogênica foi amplamente estudada por GLASS (1985); RUSSEL *et al.*, 1991, e estes autores demonstram a presença de espécies de *Candida* spp em cáries dentais e estruturas circunvizinhas, tais como gengiva, placa e canal radicular. Com o intuito de avaliar a correlação de leveduras com o risco de cárie, os mesmos constataram elevada frequência de *Candida* spp em lesões de cárie, sugerindo que tais eventos biológicos atuem como reservatório para essa levedura.

Múltiplas lesões de cárie dental podem representar um fator de risco adicional para proliferação de leveduras na cavidade oral. HODSON & CRAIG, (1972) relataram maior prevalência de *Candida* spp, em particular *Candida albicans* na presença de lesões de cárie. No estudo de RADFORD *et al.*, 2000 a frequência de isolados de *Streptococcus mutans*, lactobacilos e leveduras foi significativamente maior em crianças com cárie em relação às livre de cárie.

MOALIC *et al.*, 2001, realizaram um estudo epidemiológico em 355 estudantes com idade média de 21,3 anos, para determinarem a relação potencial entre a presença de

Candida albicans na cavidade bucal e o estado de saúde dental e encontraram uma relação positiva entre a presença de cárie e a densidade de *Candida albicans*.

SAMARANAYAKE *et al.*, 1986 observaram que a redução do pH causada pela produção de ácidos por *Candida albicans* ativa a produção de suas proteases ácidas, fosfolipases e collagenases, enzimas estas que facilitam a aderência e possibilitam a subsequente invasão tecidual pelo fungo. Os ácidos produzidos por *Candida* spp são acetato, piruvato, formato e propionato, os quais mostram toxicidade tecidual direta. KAMINISHI *et al.*, 1986 relataram a produção de enzimas collagenolíticas por *Candida albicans* e HAGIHARA *et al.*, 1988 mostraram que tais enzimas podem estar envolvidas no desenvolvimento da cárie.

A recuperação de *Candida* de indivíduos cárie ativos tem sido extensivamente estudada em portadores de doenças imunológicas, incluindo diversas síndromes, AIDS, diabetes e câncer, já que essa população sofre frequentemente de lesões buco-dentais, com tendência a apresentarem múltiplas cavidades de cárie e maior prevalência de *Candida* spp na cavidade bucal, favorecendo o surgimento de candidoses (JACOB *et al.*, 1998). São poucos os estudos que relacionam o saprofitismo bucal por espécies de *Candida* e o estado de saúde dental em indivíduos saudáveis.

As causas para a presença de *Candida* spp em portadores sadios são ainda pouco conhecidas. Vários fatores parecem contribuir para o surgimento intraoral dessas leveduras, entre eles: qualidade da dieta (BASU *et al.*, 1961), deficiências nutricionais (JENKINS *et al.*, 1977), higiene oral (JORGE *et al.*, 1987) alterações do fluxo salivar e desordens

sistêmicas (STENDERUP, 1990). Apesar do grande número de pesquisas sobre cárie, há poucos registros sobre *Candida* spp na microbiota do biofilme dental (RAMS & SLOTS, 1991).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os mecanismos que determinam a patogenicidade do gênero *Candida* não estão ainda totalmente esclarecidos. Várias hipóteses tem sido sugeridas: fatores intrínsecos das espécies e amostras, aderência aos tecidos, dimorfismo, composição da parede celular e produção de toxinas e enzimas proteolíticas (ODDS, 1987; GHANNOUM & ABBU-ELTEEN, 1990). A patogenicidade das espécies de *Candida* resultam de características próprias das cepas em questão e do estado imunológico do hospedeiro, assim como as condições locais dos sítios de infecção são de extrema importância (SAMARANAYAKE & MacFARLANE, 1990; OKSALA, 1990).

Dentre as espécies de *Candida*, a reconhecida como mais patogênica é *Candida albicans*, assim como outras espécies desse gênero, elas secretam enzimas proteolíticas que podem degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro induzindo a uma disfunção e ou destruição física, sendo que a invasão das células dos tecidos do hospedeiro por tais microrganismos, implicam em penetração e danos ao envelope externo celular sendo esse processo mediado por meios físicos e enzimáticos ou ainda pela combinação de ambos (SALYES & WITT, 1994).

RUCHEL *et al.*, 1982 relataram que os fatores de virulência de *Candida albicans* estão relacionados com a produção de hialuronidase, condroitina sulfatase, proteinase e fosfolipase. Esses fatores podem ocorrer de maneira conjunta ou separada, determinando a intensidade da virulência. Essas enzimas são consideradas essenciais para a virulência, sendo as proteinases que hidrolisam peptídeos vinculados à membrana (HUBE, 1998) e fosfolipases que hidrolisam fosfolipídeos (IBRAHIM *et al.*, 1995) as principais. Tendo como componentes da membrana os fosfolipídeos e proteínas, essas enzimas, estão provavelmente envolvidas na ruptura da membrana celular, processo que ocorre durante a invasão das células ou tecidos do hospedeiro (MAHMOUD, 2000). Pelo fato de clivar os fosfolipídeos, desestabilizam a membrana resultando em lise celular (SALYERS & WITT, 1994).

2.6 FOSFOLIPASE

O termo fosfolipase refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas com capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações ésteres nos glicerofosfolipídeos (ANSELL & HAWTHORNE, 1966). Alguns estudos evidenciam que as fosfolipases também atuam nos sinais de transdução, estimulação das células do hospedeiro em liberar citocinas e influenciam na resposta inflamatória. Muitos lipídeos e produtos derivados causados pela ação da fosfolipase em fosfolipídeos da membrana da célula do hospedeiro, são implicados como mediadores ou segundo mensageiro dos sinais de transdução (DENNIS *et al.*, 1991; SERHAN *et al.*, 1996).

A produção de citocinas em resposta a enzimas como fosfolipase também descrita por LEIDICH *et al.*, 1998, tem sido demonstrada como um potente agente inflamatório, induzindo ao acúmulo de células inflamatórias, proteínas plasmáticas e na liberação de vários mediadores inflamatórios “in vitro” (MEYERS & BERK, 1990).

Segundo PRICE & CAWSON, (1977) a fosfolipase comum em muitos animais, plantas e células microbianas, são freqüentemente encontradas na membrana da célula ou em vesículas ligadas às membranas.

PRICE *et al.*, 1982, descreveram um método prático para a detecção de fosfolipase produzida por *C. albicans*. Eles propuseram que a gema de ovo, um substrato com grande quantidade de fosfolipídeos, fosse incorporado ao meio Ágar-Sabouraud-dextrose. Quando os isolados de *Candida* fosfolipase positivos eram cultivados neste meio, produziam uma zona de precipitação ao redor das colônias e para quantificar a atividade enzimática, media-se o diâmetro da colônia e dividia-se pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação em torno das colônias de *Candida* fosfolipase positiva. O halo de degradação provavelmente se originaria da formação de complexos de cálcio que os ácidos graxos realizam pela ação da fosfolipase sobre o fosfolipídeo presente na gema do ovo (MacFARLANE & KNIGHT, 1941). Este método de cultivo das amostras tornou-se tradicional para a determinação dessa enzima em espécies de *Candida* (SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; WILLIAMSON *et al.*, 1986; HÄNEL *et al.*, 1988; LANE & GARCIA 1991; CANDIDO *et al.*, 2000).

SAMARANAYAKE *et al.*, 1984 demonstraram que o cultivo de *Candida* spp em Ágar Sabouraud enriquecido com gema de ovo, a produção da fosfolipase é detectada somente com limites de pH em torno de 3.6 a 4.7. O mesmo estudo, demonstrou que ocorreu uma supressão na atividade dessa enzima quando foram adicionados ao meio de cultura carboidratos como sucrose e galactose. Um terceiro carboidrato, a glucose, também foi testado, o que resultou em zonas de precipitação indistinguíveis e num segundo momento, quando aumentou a concentração desse carboidrato ocorreu um completo desaparecimento das zonas de degradação de todos os isolados testados. Pelo fato da gema de ovo acrescido ao meio conter substratos para fosfolipases, que quebram fosfolipídeos e para lipases que quebram triglicerídeos, esse meio enriquecido não é específico e portanto deve ser usado apenas em pesquisas iniciais (FU *et al.*, 1997).

Sendo a capacidade de produzir fosfolipases considerada como uma importante característica de patogenicidade, alguns pesquisadores têm sugerido que essa propriedade pode ser explorada como um critério para biotipagem de *Candida albicans* (PRICE *et al.*, 1982; SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; CANDIDO *et al.*, 2000).

As quantidades de fosfolipases produzidas pelos isolados de *C. albicans* variam bastante, em um estudo feito por WILLIAMSON *et al.*, 1986 envolvendo 100 isolados orais de *C. albicans*, apenas 6% não produziram fosfolipase enquanto que os demais demonstraram vários níveis de atividade, variando os valores de PZ de 0,3 a 0,9. No de SAMARANAYAKE *et al.*, 1984 avaliaram 41 isolados de *Candida* spp e constatou-se que 79% de cepas de *C. albicans* produziam essa enzima, enquanto que as cepas de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não as produziam.

Analisando amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes, MAFFEI (1996), constatou que 51,1% das cepas eram fosfolipase positivas, SOUZA *et al.*, 1990, analisando amostras dessas levedura, sorotipos A e B, verificou que 73,3% das amostras testadas eram produtoras dessa enzima e SHIMIZU (1989) pesquisando diversas espécies de *Candida* spp verificou que 100% das cepas de *C. albicans* eram fosfolipase positivas. PENHA *et al.*, 2000, verificaram que em cepas isoladas da cavidade oral de pacientes com e sem estomatite de dentadura (DS), o índice de cepas com atividade enzimática positiva foi de 83,3%, sendo que não se encontrou diferença na produção dessa enzima em relação aos aspectos clínicos observados nos dois grupos.

HANNULA *et al.*, 2000 comparando fatores de virulência de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, isoladas de pacientes saudáveis e com candidíase crônica, verificaram que 52% e 60% dos isolados produziram fosfolipase respectivamente. CANDIDO (1991) relatou que 96,6 % das amostras de *Candida albicans* da cavidade oral apresentam atividade de fosfolipase e quando comparou amostras de pacientes com lesões bucais características de candidose e de indivíduos clinicamente normais, verificou-se que 83,3% e 71,9% das amostras apresentaram atividade para fosfolipase em cepas isoladas de cavidade oral com e sem lesões respectivamente.

Em um estudo de IBRAHIM *et al.*, 1995 foram comparados 11 isolados de *C. albicans* do sangue e 11 isolados da cavidade oral de indivíduos clinicamente sadios e constatou-se uma produção significativamente maior de fosfolipase nos isolados do sangue em relação aos demais analisados. Nesse mesmo estudo, para avaliar a correlação entre atividade de fosfolipase e patogenicidade, foram testados 9 isolados de *C. albicans* do

sangue que expressavam fatores de virulência incluindo produção de fosfolipases, proteinases, aderência, germinação, disseminação em ratos e habilidade de danificar células endoteliais. Comparando a mortalidade de ratos infectados com cada um desses isolados, foi determinado que somente a fosfolipase extracelular foi motivo de mortalidade.

As fosfolipases foram caracterizadas em A, B, C e D e usadas para indicar a ligação específica que é quebrada na molécula de fosfolípido (ANSELL & HAWTHORNE, 1964). Segundo NIEWERTH & KORTING (2001) diferentes grupos e subgrupos de fosfolipases tem sido detectados e essas diferentes enzimas estão relacionadas com vários tipos de agressão e ação defensiva do hospedeiro. Em *Candida albicans* vários grupos de fosfolipase foram relatados, dentre eles a fosfolipase A, B, C, D, a lisofosfolipase e a lisofosfolipase – transacilase.

O sitio de formação da fosfolipase A (PLA), sugere o papel desta enzima no crescimento da célula e possivelmente na formação do tubo germinativo, por hidrolisar fosfolípidos da célula e da membrana intracelular (PUGH & CAWSON, 1975). A produção desta enzima varia bastante durante o ciclo celular e está localizada na fração microsomal da *C. albicans* (MAGO & KHULLER, 1990).

BANNO *et al.*, 1985 detectou a presença de fosfolipase B (PLB) em filtrados de cultura de *C. albicans*. O pH ótimo para sua atividade é em torno de 4,0 – 5,0 e ela pode ser identificada como a principal fosfolipase secretada por cepas patogênicas dessa espécie (IBRAHIM *et al.*, 1995).

A fosfolipase C (PLC) tem atividade máxima em torno de um pH de 7,5 e segundo BENNETT *et al.*, 1998 sua atividade é maior na fase hifal em relação à fase leveduriforme. A fosfolipase D (PLD) é estimulada quando cultivada em concentrações elevadas de galactose ou acetato, mas é inibida quando em presença de glicerol. Sua atividade é estimulada durante a fase de dimorfismo da célula (McLAIN & DOLAN, 1997). Já a lisofosfolipase tem como ação metabolizar a lisolecitina tóxica, produto da fosfolipase sendo que sua maior atividade é na fase leveduriforme em comparação com a fase micelial (BANNO *et al.*, 1985) e a lisofosfolipase–transacilase é isolada de ambas as formas, leveduriforme e micelial, sendo que elevados níveis de produção desta enzima, podem estar associados com o aumento da aderência dessa levedura em células do hospedeiro.

Esse grupo de fosfolipases em *C. albicans*, são fatores patogênicos de importância multifatorial e a divisão em subgrupos de fosfolipase e seus efeitos particulares promovem conhecimento em relação às suas funções, agressão versus fatores de defesa e interação com tecidos do hospedeiro na infecção e invasão destes, gerando lesões características de candidoses (NIEWERTH & KORTING, 2001).

2.7 PROTEINASES

As proteinases produzidas por *C. albicans* também são indicadas como um dos principais fatores de virulência nas espécies patogênicas. Esta enzima pode ser secretada e ou, pode apresentar-se como proteinase aspartil, associada à membrana da célula, a qual é

predominantemente expressa na maioria das espécies patogênicas do gênero *Candida* (RAY *et al.*, 1991)

STRAIB (1965), foi o primeiro a demonstrar a presença da proteinase ácida em *Candida albicans* e, posteriormente REMOLD *et al.*, 1968 conseguiram purificar essa enzima. Esse mesmo autor também demonstrou aumento na virulência de cepas proteolíticas em relação às não proteolíticas em experimentos com cobaias, promovendo a primeira associação dessa enzima com cepas virulentas.

Vários estudos de caracterização e sistemas de purificação desta enzima tem revelado que a atividade proteolítica ácida extracelular de *C. albicans* é atribuída à aspartil proteinase ácida que é um polipeptídio único de cadeia manoproteína com massa molecular de 41 kilodalton (entre 40 e 45) com atividade ótima em níveis de pH entre 2,2 e 4,0, sendo que sua atividade máxima está em torno de pH 5,5. Geralmente essa aspartil proteinase é inativada em pH neutro e irreversivelmente desnaturada sob condições alcalinas (pH 7.5 a 8.5) e possui afinidade à diversos substratos como albumina, hemoglobina, caseína, IgA (cadeia pesada) queratina e colágeno desnaturado (RUCHEL, 1981; NEGI *et al.*, 1984; RAY & PAYNE, 1990). A aspartil proteinase secretada (SAP), é produzida pela maioria das cepas de *Candida albicans* (RUCHEL *et al.*, 1982) assim como por *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis* e somente ocasionalmente e em menor quantidade, por *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida pseudotropicalis* (MacDONALD, 1984; RUCHEL & BONING, 1983).

Para induzir a secreção dessas enzimas proteolíticas, vários meios de cultura enriquecidos com diferentes proteínas foram sugeridos. A secreção é pequena em meios contendo fontes de nitrogênio simples (aminoácidos ou sais de amônia), mas é elevada quando a única fonte de nitrogênio é uma proteína. A glicólise das fontes de carbono (açúcares) promovem acidificação no meio, gerando um pH ácido obrigatório para sua atividade (RAY & WUEPPER, 1976). As enzimas são secretadas “in vitro”, quando os microrganismos são cultivados na presença de proteínas exógenas (Albumina do Soro Bovino - BSA é o mais utilizado) como fonte de nitrogênio (ANGIOLELLA *et al.*, 1996; DOUGLAS, 1988; HOMMA *et al.*, 1992; RAY & PAYNE, 1990). Entretanto, essas proteínas exógenas no meio de cultura, não são essenciais para indução das proteinases, o pH do meio possui atividade direta sob a síntese dessas enzimas, e não um efeito secundário (HOMMA *et al.*, 1992). Em alguns casos, a indução da SAP por *Candida albicans* parecem envolver sinais de transdução, evento que ocorre a nível de membrana plasmática (LERNER & GOLDMAN, 1993).

Dentre os métodos utilizados para analisar cepas virulentas, o método de cultivo em placa, descrito por RUCHEL *et al.*, 1982, que consiste em cultivar as amostras em meio sólido enriquecido com albumina, tem sido bastante usado em pesquisas científicas, visto que a atividade enzimática das proteinases pode ser utilizada como marcador do potencial de virulência (MacDONALD, 1984; SONO *et al.*, 1992; GRANNOUM & ABU-ELTEEN, 1986; PENHA *et al.*, 2000; CANDIDO *et al.*, 2000).

A frequência na produção de proteinases por cepas de *C. albicans*, pode variar bastante. PENHA *et al.*, 2000, analisando amostras dessa levedura proveniente da cavidade

oral verificou que 100% eram proteinases positivas. CHAKRABARTI *et al.*, 1991 trabalhando com amostras provenientes de diversos sítios anatômicos observou que a atividade enzimática de cepas de *C. albicans* para produção de proteinases, variavam de 44,4% a 84,6% dependendo do sítio de origem.

CANDIDO *et al.*, 2000 comparando a atividade enzimática de cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral de pacientes com e sem lesões bucais características de candidíase relataram que 66,7% e 68,7% foram positivas para proteinase respectivamente nos grupos com e sem lesão.

WU *et al.*, 1996 reportam que *C. albicans* isoladas de pacientes com infecções por HIV, foram mais proteolíticas do que aquelas provenientes de pacientes saudáveis. Da mesma forma, isolados obtidos de pacientes com candidíase foram mais proteolíticos que os provenientes do mesmo sítio de portadores assintomáticos (CASSONE *et al.*, 1995). OLLERT *et al.*, 1995 trabalhando com amostras da cavidade oral de voluntários HIV positivos e HIV negativos, constataram que todos os isolados foram proteolíticos, embora os valores de PZ, tenham demonstrado que isolados provenientes do primeiro grupo eram mais proteolíticos em relação ao grupo controle.

Estudos com o genoma de *C. albicans*, demonstraram que essa levedura contém pelo menos 10 genes distintos que codificam a aspartil proteinase extracelular (MONOD *et al.*, 1994; NIIMI *et al.*, 1997). Cada SAP parece ter um papel específico, ou uma fase em que é mais ativa, assim. SAPS 1-3 contribuem em causar danos ao tecido do epitélio em pacientes com candidíase oral e ou candidíase da orofaringe em pacientes infectados por

HIV (SCHALLER *et al.*, 1990; SCHALLER *et al.*, 1999). Os genes codificados como SAP 1 e 2, respectivamente são freqüentemente expressos na candidíase vaginal (DEBERNARDIS *et al.*, 1999), enquanto que experimentos com cepas mutantes de *Candida albicans* – onde SAPs 4, 5 e 6 foram eliminadas – essas células mostraram maior facilidade em serem fagocitadas por macrófagos em relação a cepas parentais (BORG-VON ZEPELIN *et al.*, 1998).

Em estudos feitos por HUBE *et al.*, 1994 e WRITE & AGABIAN (1995), observou-se que uma única isoenzima, SAP2 é necessária e suficiente para o crescimento de *Candida albicans* em meio contendo proteína como única fonte de nitrogênio. Algumas propriedades da SAP2 têm sido demonstrada “in vitro” e foi constatado que a matriz extracelular e proteínas da superfície do hospedeiro, como, queratina, colágeno, fibronectina e mucinas, são eficientemente degradadas por SAP2, assim como as proteínas de defesa do hospedeiro, como lactoferrina da saliva e imunoglobulinas como IgA secretora, que são resistentes a proteinases de muitas bactérias, podem também ser hidrolizadas por SAP2 (RUCHEL *et al.*, 1992; HUBE, 1996; HUBE, 1998).

O papel das SAPs, pode ser unicamente digerir proteínas do hospedeiro para promover nitrogênio para a célula. A SAP2, capacita o microrganismo a se desenvolver em meios contendo albumina do soro ou outras proteínas como fonte de nitrogênio, o que contribui para adesão aos tecidos do hospedeiro e invasão, por degradar proteínas da membrana celular (HUBE & NAGLIK, 2001)

Diferentes SAPs possuem variações de pH-ótimo para sua atividade (BORG VON ZEPPELIN *et al.*, 1998), sendo que SAP2 atua melhor em pH ao redor de 4.0. SAPs 4 - 6 são significativamente ativas em pH fisiológico, já SAP3 é pouco ativa em pH 2.0, sugerindo que essa variação na atividade proteolítica relacionada com variações de pH, pode ser essencial para adaptação específica de SAPs de *Candida albicans* em diferentes ambientes do hospedeiro. Além disso, a capacidade dessa espécie de produzir ácidos em ambientes circunvizinhos, propicia micronichos com pH ótimo durante a infecção e essas propriedades, podem ser essenciais para a atividade dessa levedura em infecções da mucosa ou na cavidade oral (HUBE & NAGLIK, 2001)

O fato dessa família de genes estar presente somente nas espécies mais patogênicas de *Candida* spp, dentre elas: *C. albicans* (MAGGE *et al.*, 1993), *C. dubliniensis* (GILFILLAN *et al.*, 1998), *C. parapsilosis* (MONOD *et al.*, 1994) e ausente em leveduras não patogênicas como *S. cerevisiae*, sustenta a hipótese dessas enzimas estarem envolvidas no papel da virulência.

Estudos envolvendo análise enzimática utilizando-se dessas enzimas de virulência, tem sido proposto para biotipagem de *C. albicans* (CANDIDO *et al.*, 2000). Atualmente, em adição a esses métodos tradicionais, tem se tornado importante a genotipagem desses patógenos, através de métodos moleculares. Desta forma, a patogenicidade, a transmissibilidade entre indivíduos, o desenvolvimento de resistência, dentro de uma mesma linhagem, podem ser melhor definidos (BECKER, 2000; PFALLER, 2000)

2.8 MÉTODOS PARA TIPAGEM MOLECULAR

Métodos quimiotaxonômicos buscam estabelecer as relações de afinidade entre diferentes linhagens através da comparação das composições químicas de diversas estruturas celulares, como: polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, etc. Entretanto, métodos com base na genética molecular objetivando genes específicos, têm sido bastante usado em pesquisas com microrganismos para se ampliar a identificação desses (CANGELOSI *et al.*, 1994). Dentre elas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica importante que envolve a síntese “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA. A técnica de PCR é baseada na amplificação enzimática e anelamento de “primers” (iniciadores a partir da terminação 5’) que delimitam as seqüências de DNA de dupla fita que se deseja amplificar (SAIKI *et al.*, 1988). Esses “primers” são sintetizados artificialmente de modo que as seqüências de nucleotídeos sejam complementares àquelas que flanqueiam a região que será amplificada. Os produtos de amplificação, “amplicons”, podem ser separados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

Dentre as diferentes aplicações da PCR, a técnica de AP-PCR (Reação da Cadeia em Polimerase com “Primers” arbitrários) é um método bastante empregado, em estudos sistemáticos ou epidemiológicos. Nessa técnica, somente um único *primer* arbitrário é empregado enquanto na técnica de PCR clássica dois *primers* que codificam uma seqüência conhecida são empregados (WELSH & McCLELLAND, 1990).

WILLIAMS *et al.*, 1990 relataram que a diferença de apenas um par de bases (mutações pontuais) são suficientes para causar a não complementaridade do primer com a fita molde, o que impede a amplificação do segmento. Outras fontes de polimorfismo podem incluir deleções ou inserções nos sítios de ligação do *primer* que aumentam as distâncias a serem percorridas pela Taq polimerase. Desta forma, o polimorfismo genético detectado através dos marcadores AP-PCR (polimorfismo do DNA amplificado ao acaso) tem uma natureza binária, podendo o segmento amplificado estar presente ou ausente. O aparecimento de bandas eletroforéticas permite a observação da natureza molecular do polimorfismo genético pesquisado.

O poder de caracterização de linhagens de uma mesma espécie de *Candida* através do uso de *primers* arbitrários, foi demonstrado por HOLMBERG & FEROZE (1996), que obtiveram diferentes perfis de bandejamento eletroforético, para “amplicons” de diversas linhagens de *Candida albicans*. Em um estudo conduzido por MILAN *et al.*, 1997 observou-se que diversos isolados clínicos presuntivamente identificados como *C. guilliermondii*, na realidade apresentavam grande semelhança com *C. fermentati*. Esses autores apontam para o fato de que a técnica de AP-PCR permite discriminações bastante precisas na caracterização dessas leveduras ao nível de espécie.

A capacidade de distinguir entre isolados distintos da mesma espécie de *Candida* é essencial para o conhecimento dos biótipos existentes e para fins epidemiológicos. Esse tipo de análise pode promover informações valiosas acerca da relação entre isolados da mesma espécie de *Candida* em diferentes sítios no mesmo indivíduo ou em uma determinada população (MELO *et al.*, 1998).

HANNULA *et al.*, 2000, investigando clonalidade de *C. albicans* em pacientes com e sem comprometimento imune, não verifica nenhuma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre pacientes saudáveis e doentes, sendo cada indivíduo portador de apenas um único genótipo de *C. albicans*. Da mesma forma, XU *et al.*, 2000 usando a técnica PCR fingerprinting, com 5 primers diferentes, não encontraram diferença genética significativa entre o número de genótipos dos dois grupos HIV positivo e negativo, no entanto, DIAS-GERRA *et al.*, 1997 através da cariotipagem, encontraram uma grande diversidade clonal de *C. albicans* entre isolados provenientes da orofaringe de voluntários HIV positivos que portavam candidíase.

KAM *et al.*, 2002 analisando cepas comensais provenientes de diferentes sítios do corpo de indivíduos saudáveis a fim de avaliar o padrão de distribuição e de cepas destas espécies intra e entre os indivíduos, verificou que um único hospedeiro pode portar múltiplas espécies ou múltiplos genótipos da mesma espécie, no mesmo, ou em diferentes sítios do corpo.

Para examinar os padrões de similaridade genética de cepas de *C. albicans* patogênicas inter e intra grupo, mulheres HIV positivas, grávidas saudáveis e mulheres HIV negativas, foram comparadas. Os três grupos demonstraram diversidade genotípica, no entanto, não houve diferença significativa na média do número de linhagens clonais entre os três grupos, independente das condições do hospedeiro, relatando que um único hospedeiro pode ser colonizado com múltiplos genótipos da mesma espécie no mesmo sítio ou em sítios diferentes, indicando um processo dinâmico de colonização por leveduras em mulheres (XU *et al.*, 1999).

No estudo de BOERLIN *et al.*, 1996, isolados de *C. albicans* provenientes da orofaringe de pacientes saudáveis e com HIV, foram tipados por multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) e os resultados obtidos mostraram que a maioria (exceto um paciente) portavam uma única linhagem clonal de *C. albicans* na orofaringe. No entanto, HOWELL *et al.*, 1996 comparando a similaridade genética de *C. albicans* proveniente de 4 pacientes usando as técnicas RFLP (restriction fragment length polymorphism) e RAPD (Random amplification of polymorphic DNA), observou a presença de mais de um genótipo em alguns indivíduos.

Em um estudo epidemiológico, realizado por SCHIMID *et al.*, 1995 onde usou-se a sonda Ca3 para analisar 266 isolados de *C. albicans* obtidos de infecções, provenientes de 12 regiões geográficas específicas, em 6 países, encontraram que 37% destes isolados formavam um único *cluster* geneticamente homogêneo e o restante dos isolados foram geneticamente diversos. Esses autores sugerem a ocorrência de um genótipo geograficamente disseminado que age como um agente etiológico predominante em todas as formas de candidíase e em todas as categorias de pacientes. Já MEHTA *et al.*, 1999 analisaram 28 indivíduos sistemicamente saudáveis, pertencentes a 12 famílias em relação à presença de *C. albicans* proveniente da cavidade oral e das fezes e através da genotipagem dessas cepas por DNA *fingerprinting*, demonstrou que diferentes famílias não compartilham as mesmas cepas, no entanto, dois ou mais membros da mesma família comumente as compartilham.

A descoberta de um grupo de cepas de *C. albicans* geneticamente mais bem sucedidos que outros genótipos, numa população variada de pacientes e tipos de infecção já

foi relatada por vários autores e não foi uma surpresa, dada as evidências do modo clonal de reprodução de *C. albicans* (ODDS, 1988; CAUGANT & SANDVEN, 1993; TIBAYRENC, 1997). A reprodução clonal de um organismo permite que ele se adapte ao ambiente, linhagens clonais separadas podem evoluir, cada qual para uma adaptação em um nicho ecológico particular, se tal nicho for estável. Em contraste a reprodução clonal deixa o organismo exposto a freqüentes alterações em seu meio ambiente, que então, responde com a evolução e seleção, baseado em sua adaptabilidade a uma variedade de nichos (WHITTAM *et al.*, 1983; TIBAYRENC & AYALA, 1988; FOX *et al.*, 1996; HERMANUTZ & WEAVER, 1996; JACOBSEN & FORBES, 1997; SEMLITSCH *et al.*, 1997).

Com base nos dados obtidos da literatura citada, estudos que venham a relacionar fatores de virulência de *Candida albicans* em indivíduos cárie ativos e livres de cárie, e relacionar características fenotípicas (enzimotipagem) associadas a métodos de tipagem molecular, poderam contribuir para um maior conhecimento dessas enzimas como fatores de virulência.

Cabe mencionar que a escassez de pesquisas envolvendo fatores de virulência e genotipagem de *Candida albicans* em crianças cárie ativas e livres de cárie, limita maiores especulações. Contudo, essa escassez de dados que envolvem a natureza destas especulações, despertou nosso interesse e foi objetivo da nossa atual pesquisa.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como propósito:

- analisar e comparar a produção das enzimas fosfolipases e proteinases de *Candida albicans* isoladas de crianças com faixa etária de 24 a 36 meses divididas em dois grupos, cárie ativos e livres de cárie;
- comparar as características fenotípicas quanto a produção dessas enzimas (através da enzimotipagem) com a diversidade genotípica (através do método molecular AP-PCR) entre os dois grupos estudados;
- verificar o comportamento dos diferentes genótipos quanto à produção de proteinases e fosfolipases;
- analisar a diversidade genotípica intra indivíduos e entre indivíduos nos dois grupos estudados.

4 METODOLOGIA

4.1 PROCEDÊNCIA DAS CEPAS

Na presente pesquisa, foram utilizadas cento e cinquenta e oito (158) cepas de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças do município de Piracicaba, S.P. as quais foram submetidas a tratamento odontológico na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP).

O estudo envolveu amostras recém isoladas de crianças com idade variando entre 24 e 36 meses, de ambos os sexos, divididos em dois grupos: Cárie ativas (10 pacientes-104 amostras) e Livres de cárie (6 pacientes-54 amostras). As amostras foram coletadas da saliva (S), dorso da língua (L), mucosa do palato (PAL), mucosa jugal (B) e biofilme dental (PL). Estas crianças não haviam sido submetidas a nenhum tipo de tratamento com antibiótico ou outros medicamentos nos últimos seis meses antecedentes a coleta.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras da saliva não estimulada foram coletadas de todas as crianças utilizando-se um *swab* de algodão estéril, mantendo-o 10 segundos embaixo da língua (OLLILA *et al.*, 1997). Para coleta das amostras da mucosa bucal (dorso da língua, palato duro e mucosa jugal) um *swab* de algodão estéril, previamente umedecido em salina estéril foi passado várias vezes em movimentos rotatórios, sobre a superfície bucal em particular.

Um “pool” do biofilme dental, foi coletado com o auxílio de uma haste de madeira esterilizada, através da raspagem do terço gengival das faces vestibulares dos quatro incisivos superiores anteriores irrompidos. Imediatamente após a coleta, cada *swab* e haste de madeira foram colocados em tubos estéreis contendo 1 mL de solução salina estéril a 0,9%. As amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, obedecendo ao limite de meia hora. As coletas se deram no período da manhã, entre 8:00 e 11:00 horas.

4.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram submetidas à agitação por 30 segundos em um agitador de tubos (Phoenix AT 56), para obtenção de uma suspensão uniforme. Aliquotas de 100 µL das amostras da saliva, superfícies mucosas e biofilme dental foram imediatamente diluídas em série decimal de 10^{-1} a 10^{-2} em solução salina estéril a 0,9% e aliquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em duplicata, em placas de Petri, contendo meio de cultura Sabouraud Agar Dextrose (S D A), acrescido de 0,1 mg/mL de cloranfenicol (Quemicetina Succinato/Carlos Erba) e incubadas aerobicamente, a 37 °C por 2 a 4 dias. Placas que apresentaram crescimento negativo foram submetidas à incubação por mais 72 horas e então examinadas novamente antes de serem descartadas.

Após a incubação, foram utilizados como critério para obtenção de cultura pura das colônias de *Candida* spp, as características culturais (morfologia das colônias em meio de cultura) e as características celulares (investigada através de observação microscópica de

esfregação da colônia, corado pelo Gram). Quando na microscopia foram observadas células ovaladas, grandes, Gram-positivas, com ou sem brotamento, sugestivas de *Candida* spp, as colônias representativas de cada tipo morfológico sobre o meio de cultura, foram transferidas para dois meios de cultura, simultaneamente: o meio CHROMagar Candida (Probac do Brasil), para identificação preliminar de *Candida* spp, dispensados em placas de Petri e o meio de cultura DAS/Cloranfenicol, dispensados em tubos de ensaio com rosca (13X100 mm), para armazenamento das amostras e posterior especiação. Foram isoladas até 10 colônias, quando presentes, de cada localização bucal da criança positiva para *Candida* spp. As colônias repicadas em ambos os meios foram mantidas a 37 °C por 48 horas. Após esse período, foi adicionado óleo mineral estéril sobre as colônias isoladas em meios de cultura DAS e os tubos de ensaio foram armazenados sob refrigeração (-20 °C). Foram observadas a coloração e morfologia das colônias crescidas sobre o CHROMagar Candida (Meio de cultivo cromogênico para identificação inicial de espécies de *Candida* spp).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE CANDIDA

Além da utilização do meio de cultivo cromogênico CHROMagar Candida (Probac do Brasil), para confirmação e maior segurança no processo de identificação, as amostras foram analisadas observando-se a produção de tubo germinativo em soro estéril de coelho, a presença de hifas/pseudo-hifas, células leveduriformes e clamidósporos em Agar-fubá-tween 80 e a fermentação e assimilação de carboidratos. Para identificação

presuntiva de *Candida dubliniensis*, todas as amostras identificadas como *Candida albicans* foram submetidas à prova de termotolerância a 45 °C.

4.5 CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As cepas de *Candida albicans* (anexo) utilizadas neste estudo foram coletadas, processadas e identificadas em pesquisa anterior (Comitê de Ética em Pesquisa, processo 127/2000) e se encontram disponíveis na Micoteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Departamento de Diagnóstico Oral, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas.

As amostras encontram-se mantidas em duas coleções:

a) em tubos de cultura (13x100 mm) contendo meio completo para levedura–MCL (anexo) e recobertas com óleo mineral estéril em temperatura ambiente;

b) congeladas a –20°C em microtubos (1,5 ml) contendo 750 microlitros da cultura de levedura e 750 microlitros de Yeast Peptone Dextrose – YPD-Glicerol a 30% estéril (anexo), sendo que a concentração final de glicerol foi de 15%.

Nos dois casos, antes da utilização das amostras, foram feitos exames para o reconhecimento da morfologia celular e colonial (aspectos micro e macroscópicos, respectivamente) para detecção de possíveis contaminantes.

4.6 TESTE DE PROTEINASE E FOSFOLIPASE

Amostras de cultura, mantidas conforme o item b foram incubadas em frascos contendo 5 mL de meio de cultura YPD (anexo) e incubadas a 37°C durante 18 horas. Decorrido o tempo de incubação, 1,5 mL do cultivo da levedura foram transferidos para tubos Eppendorf e centrifugados a 3.000 rpm, por 5 minutos. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos em solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugados por mais duas vezes nas mesmas condições para remoção dos restos de meio de cultivo. As concentrações das suspensões das cepas foram padronizadas usando-se o índice 5 da escala MacFarland (aproximadamente 1×10^6 UFC/mL) e volumes de 1 μ L foram inoculados em pontos equidistantes, utilizando-se de um bastão de vidro previamente adaptado, respectivamente nos meios Ágar Fosfolipase (anexo) e Ágar Proteinase (anexo). Os testes foram realizados em duplicata. As placas contendo 4 inóculos de diferentes cepas para detecção de proteinase foram incubadas a 37°C durante 7 dias (RUCHEL *et al.*, 1982) e as usadas para detectar fosfolipase contendo 6 inóculos, cultivadas por 4 dias a mesma temperatura (PRICE *et al.*, 1982). A presença da enzima fosfolipase foi observada pela formação de uma zona opaca ao redor da colônia de levedura e a atividade enzimática (PZ) foi medida dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. PZ foi codificada com um dígito com valores iguais a 0, 1 ou 2 (Tabela 1). A presença da enzima proteinase foi observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia de levedura e a atividade enzimática (PZ) foi medida da mesma forma, conforme descrito acima para fosfolipase.

TABELA 1
Medidas da atividade enzimática

Valores de PZ	Atividade Enzimática	Código/Índice
PZ = 1	Negativa	0
$PZ \geq 0,64 < 1$	Positiva-Média	1
PZ = 0,63	Positiva-Elevada	2

* A medida da atividade enzimática (PZ), proposta por PRICE *et al.*, 1982.

* Zona de Precipitação (PZ) é calculada, dividindo-se o diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a Zona de precipitação.

4.7 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras mantidas conforme o item b, foram inoculadas em frascos com 5 mL de YPD e incubadas a 37°C por 18 horas. Após esse período, 1,5 mL da cultura foi transferido para Eppendorf (1,5 mL) e centrifugadas (HAWK 15/5 Refrigerated Sanyo MSE) a 3.000 rpm por 5 minutos. Os sedimentos obtidos foram posteriormente lavados por duas vezes com Tampão TE – pH 8,0 (anexo) e iniciou-se o processo de extração do DNA.

Ao precipitado de células adicionou-se 700 µL de Tampão de extração (anexo), homogeneizou-se ao vórtex e colocou-se em Banho Maria a 65 °C por 30 minutos, sendo que a cada 10 minutos as amostras eram homogeneizadas por inversão manual. A seguir, acrescentou-se 650 µL de clorofórmio:álcool:isoamílico (24:1), seguida de homogenização até formar uma emulsão, a qual foi centrifugada (12.000 rpm, 7 minutos). Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf (1,5 mL) e adicionou-

se 200 μ L de Tampão de Extração sem Proteinase K (anexo) e 650 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), esta mistura foi homogeneizada e centrifugada (12.000 rpm , 7 minutos).

Novamente a fase aquosa foi transferida para outro Eppendorf (1,5 mL) e recebeu 650 μ L de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguida de centrifugação (12.000 rpm, 7 minutos). O sobrenadante foi retirado e transferido para outro Eppendorf (1,5 mL). O DNA foi precipitado com 500 μ L de isopropanol, homogeneizado e centrifugado por 4 minutos a 12.000 rpm .

A superfície do precipitado foi lavada com 250 μ L de etanol a 70% e colocado em uma estufa a 37 °C, para secar por 6 horas. Passando esse tempo ressuspendeu-se o DNA com uma solução de 40 μ L de TE com 10 μ g/ml de RNase (Sigma). A concentração de DNA e sua pureza foram verificadas através de leitura em espectrofotômetro a 260 / 280 nm (Genesys 10UV).

4.8 AP-PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE UTILIZANDO PRIMER ARBITRÁRIO)

A reação de AP-PCR utilizando-se do primer arbitrário AP-3 (5'TCACGATGCA3') descrito por SANZ *et al.*,1996 foi processada segundo SAARELA *et al.*, 1996 na qual, cerca de 300 ng de DNA foram adicionados a uma mistura de reagentes contendo solução tampão (10x Reaction Buffer Taq Polymerase), 3,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP – dATP, dCTP, dGTP, dTPT (100 mM dNTP Set, PCR Grade InvitrogenTM), 0,4 μ M de primer, 2,5 U de Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM).

Em seguida essa mistura de reagentes foi submetida a um aparelho termociclador convencional (GeneAmp PCR System 2400-Perkin Elmer) de acordo com a seguinte programação: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridização do primer a 36 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos, concluindo com extensão a 72 °C por 5 minutos.

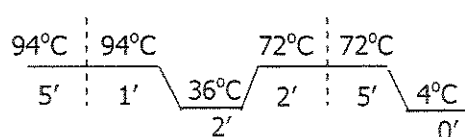


FIGURA 1 - Ciclos do termociclador, processado segundo SAARELA *et al.*, 1996.

Os produtos resultantes da amplificação por AP-PCR foram conservados a -20 °C ou foram analisados imediatamente por eletroforese em gel de agarose 1% (90V por 120 min) em tampão Tris-Borato-EDTA -pH 8,0 (anexo), sendo incluído em cada gel um padrão de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder – InvitrogenTM).

Após o término de cada corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL e as bandas observadas com o auxílio de um transluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB - MacroVue).

4.8.1 ANÁLISE DOS PADRÕES ELETROFORÉTICOS

Os géis obtidos como resultado da aplicação da técnica de AP-PCR, foram fotografados pelo equipamento Image Master-VDS (Pharmacia Biotech) e as imagens capturadas pelo programa computacional LISCAP. As imagens positivas e a demarcação das bandas eletroforéticas foram processadas através do programa Sigma Gel (Jandel CO.) que forneceu a mobilidade relativa de cada banda (valores de Rf.) em função dos valores conhecidos dos padrões de massa molecular.

4.8.2 CONSTRUÇÃO DE MATRIZES E DENDOGRAMAS DE SIMILARIDADE

As bandas eletroforéticas, representadas pelos valores de Rf tiveram suas distâncias de migração convertidas em valores numéricos, que receberam representações 1 (um) para presença e 0 (zero) para a ausência de bandas, numa comparação entre as linhas. O conjunto dessas informações gerou uma matriz de dados binários que foi plotada no sistema NTSYS versão 1.70 (Applied Biostatistics) empregando-se o programa QUALITATIVE e o coeficiente de similaridade de DICE.

Utilizando o mesmo pacote estatístico, essas matrizes de similaridade foram transferidas para o programa SHAN CLUSTERING, onde através do método de agrupamento UPGMA (unweighted pair-group methods with mathematic average) foram gerados dendogramas que possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existentes e o agrupamento das possíveis linhagens clonais obtidas entre as amostras de *Candida albicans*.

5 RESULTADOS

Um total de 158 cepas de *Candida albicans* foram utilizadas no presente estudo, das quais 54, foram isoladas de indivíduos livres de cárie e 104, isoladas de indivíduos cárie ativos. Todos os isolados foram submetidos a testes de atividade enzimática em relação as duas enzimas: 1- fosfolipases e 2- proteinases (Fig. 2).

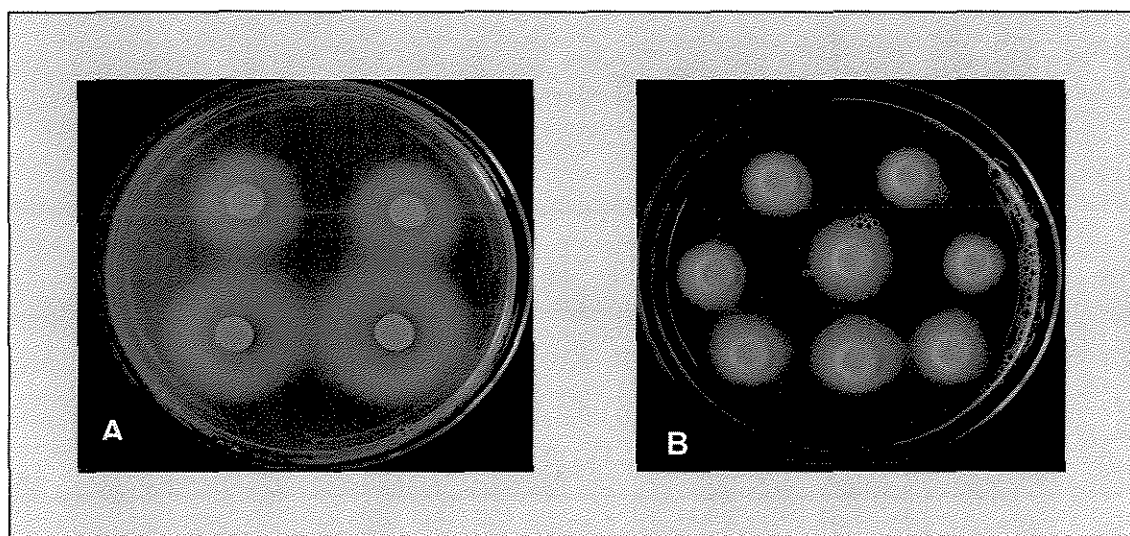


FIGURA 2 – Cultivo de 4 cepas de *Candida albicans* em Ágar proteinase (A) e de 8 cepas de *C. albicans* em Ágar fosfolipase (B); Após o período de incubação, pode-se observar zonas de degradação (A) e ou precipitação (B) ao redor das colônias de leveduras.

Para quantificar a atividade enzimática foi utilizado o cálculo proposto por Price *et al.*, 1982, que consiste em dividir o diâmetro da colônia, pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação ao redor das colônias de leveduras (Fig. 3). Tanto para quantificar a produção de proteinase, como para produção de fosfolipase, foram usados os índices 0 (zero), para aquelas que não demonstraram atividade enzimática, 1 (um), para cepas com

atividade enzimática positiva e 2 (dois), para cepas com atividade enzimática positiva elevada.

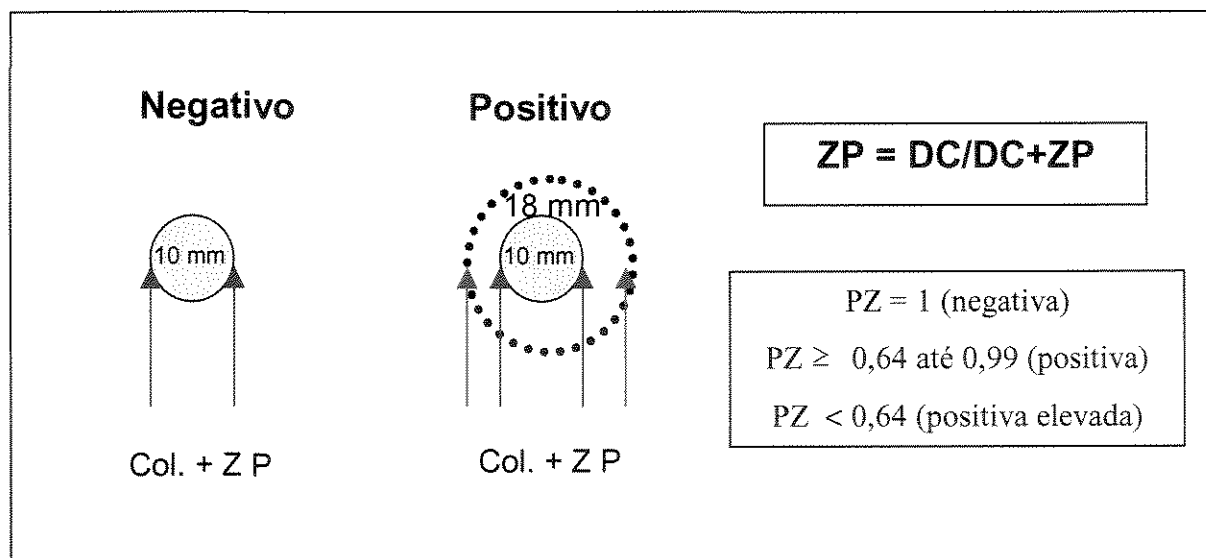


FIGURA 3 – Cálculo utilizado para medir a atividade enzimática de colônias de *Candida albicans*, descrito por PRICE *et al.*, 1982

De todas as cepas testadas (158), de ambos os grupos, cárie ativos e livres de cárie, 94 % foram positivas para produção de proteinase (incluindo índices 1 e 2) e o restante, 6% demonstraram atividade enzimática negativa para essa enzima (Fig. 4). Em relação a atividade enzimática da fosfolipase de todas as cepas analisada (158), de ambos os grupos, um total de 95,2% foram positivas para produção dessa enzima (incluindo índices 1 e 2) e 4,8% demonstraram atividade enzimática negativa (índice 0), como demonstrado na figura 5.

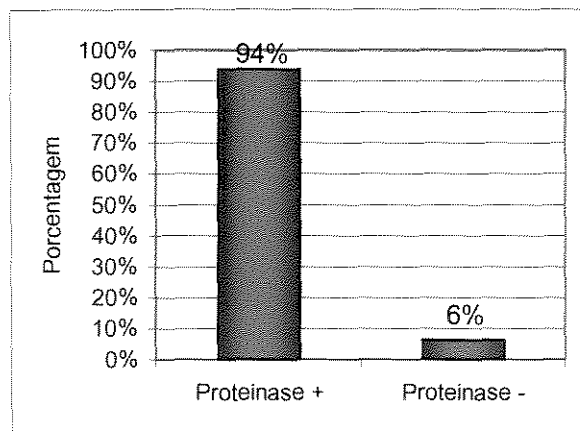


FIGURA 4 - Frequência de cepas de *Candida albicans* com atividade enzimática para proteinase positiva, incluindo índices 1 e 2, e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa, índice 0.

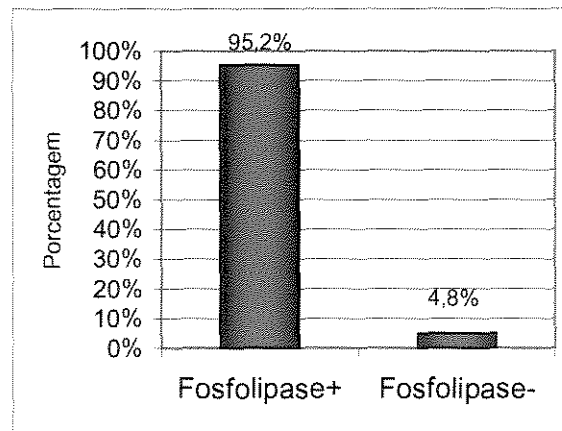


FIGURA 5 - Frequência de cepas de *Candida albicans* com atividade enzimática para fosfolipase positiva, incluindo índices 1 e 2, e de cepas que apresentaram atividade enzimática negativa, índice 0.

Analisando separadamente os grupos cárie ativos (1) e livres de cárie (2), em relação ao perfil de atividade enzimática da proteinase, pôde-se observar que 87,5% das 104 amostras testadas obtiveram índice 2 (dois), 1,9% obtiveram índice 1 (um) e 10,6%, índice 0 (zero) para o grupo 1. Em relação às cepas pertencentes ao grupo dois, 94,4% de um total de 54 amostras, apresentaram índice 2 (dois), 3,7% obtiveram índice 1 (um) e 1,9% receberam índice 0 (zero), (Tab. 2). Através da análise estatística realizada pelo teste Qui- quadrado ($p = 0,0309$) verifica-se uma diferença estatisticamente significativa apenas para o índice 0 (zero), que foi maior em indivíduos cárie ativos. Para os demais índices, 1 e 2, não se observou diferença estatisticamente significativa em relação à produção da enzima proteinase.

TABELA 2
 Perfil da atividade enzimática da proteinase produzida por *C. albicans*,
 nos grupos cárie ativos e livres de cárie

Proteinase	Índice 0	Índice 1	Índice 2
Cárie ativos	10,6%	1,9%	87,5%
Livres de cárie	1,9%	3,7%	94,4%
teste-qui ²	0,0133	0,4528	0,6066

* Índice de significância - teste-qui Quadrado p= 0,0309

Os resultados obtidos em relação à enzima fosfolipase para os dois grupos estudados, acham-se expressos na tabela 3. O teste aplicado Qui- quadrado ($p = 0,1419$) revelou uma diferença estatisticamente significativa apenas para o índice 0 (zero), que foi maior em amostras dos voluntários cárie ativos.

TABELA 3
 Perfil da atividade enzimática da fosfolipase produzida por *C. albicans*,
 nos grupos cárie ativos e livres de cárie

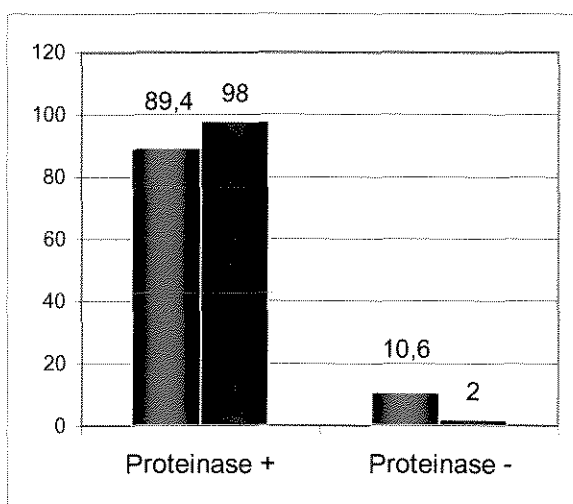
Fosfolipase	Índice 0	Índice 1	Índice 2
Cárie ativo	7,7%	22,1%	70,2%
Livres de cárie	1,9%	25,9%	72,2%
teste-qui ²	0,0586	0,5824	0,8649

* Índice de significância - teste-qui Quadrado p= 0,1419

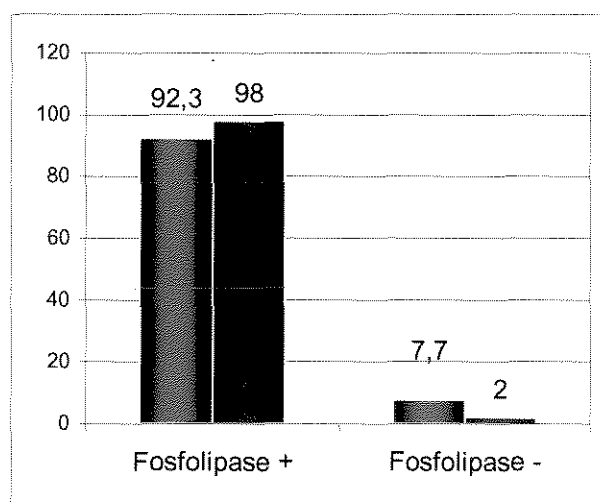
Pode-se constatar que 89,4% e 98% das amostras totais de indivíduos cárie ativos e livres de cáries, respectivamente, foram positivas para produção da enzima proteinase (índices 1 e 2), sendo que apenas 10,6% e 2% das cepas apresentaram atividade enzimática

negativas para os grupos cárie ativos e livres de cárie respectivamente, (Fig. 6). O teste t de Student para duas amostras independentes revelou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0248$) em relação às cepas proteinase negativa (índice 0), nos dois grupos estudados.

Verifica-se que 92,3% das amostras totais de indivíduos cárie ativos e 98% de livres de cárie foram positivas para produção de fosfolipase (índices 1 e 2), enquanto que 7,7% e 2% das amostras, demonstraram atividade enzimática negativa (índice 0) respectivamente. O teste t de Student revelou diferença estatisticamente significativa ($p=0,034$) em relação ao índice 0 (zero), que foi mais freqüente no grupo cárie ativo (Fig. 7).



* Grupos #cárie ativos e # livres de cárie

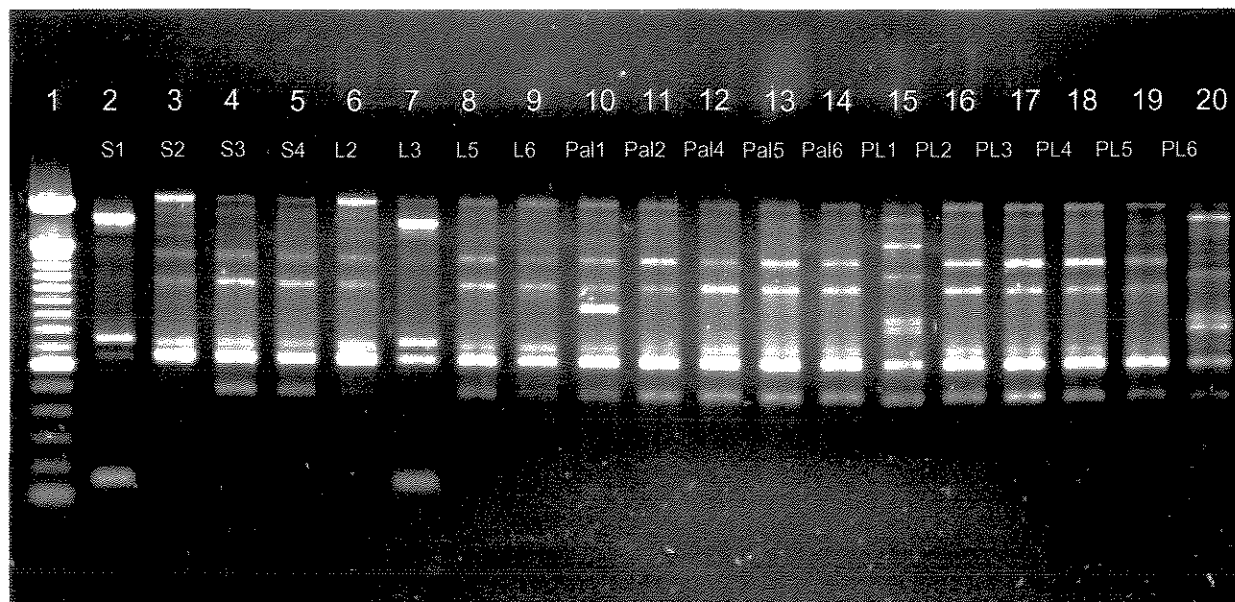


* Grupos #cárie ativos e # livres de cárie.

FIGURA 6 - Porcentagem de cepas com atividade enzimática da proteinase positivas e negativas, nos grupos cárie ativos e livres de cárie.

FIGURA 7 - Porcentagem de cepas com atividade enzimática da fosfolipase positivas e negativas, nos grupos cárie ativos e livres de cárie.

A técnica de AP-PCR foi utilizada para analisar a variabilidade genética existente entre cepas de *Candida albicans* provenientes do mesmo indivíduo. A amplificação do DNA genômico desta espécie pelo “primer” **AP-3** gerou produtos de AP-PCR variando entre 2,1 a 0,5 pb (Fig. 8).



*1- Padrão de peso molecular de 100 pb; 2 –20 amostras de diferentes sitios da cavidade oral.

FIGURA 8 - Perfis eletroforéticos de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral do voluntário 7, do grupo cárie ativo.

A Tabela 4, apresenta o número de perfis genéticos de *C. albicans* encontrados em indivíduos cárie ativos. Comparando-se os voluntários 08 e 31, é possível observar que um número maior de cepas analisadas não implica na obtenção de um polimorfismo genético maior. O número de perfis genético variou de 02 a 06 entre os indivíduos deste grupo.

TABELA 4
Número de perfis genotípicos de *Candida albicans* e número total de cepas analisadas pela técnica AP-PCR, em indivíduos cárie ativos.

Voluntários	07	08	15	28	31	32	33	35	59	63
Perfis genotípicos	06	02	03	03	04	04	03	02	03	03
Total de cepas analisadas	19	17	15	06	06	10	08	04	12	07

Na Tabela 5, está representado o número de perfis genéticos de *C. albicans* encontrados no grupo de voluntários livres de cárie, podendo-se notar que esses números variaram entre 01 e 03 entre os indivíduos. Comparando os voluntários 17 e 60, observar-se que uma maior quantidade de cepas analisadas, não implica na obtenção de maiores números de perfis genéticos.

TABELA 5
Número de perfis genotípicos de *C. albicans* e número de cepas analisadas pela técnica de AP-PCR em indivíduos livre de cáries

Voluntários	17	18	34	46	56	60
Perfis genotípicos	02	01	01	01	03	02
Total de cepas analisadas	14	03	09	03	16	08

A utilização do *coeficiente de associação de Dice* possibilitou a construção de matrizes de similaridade para as amostras. Essas matrizes, analisadas através do método de agrupamento UPGMA, permitiram a obtenção dos dendogramas, os quais possibilitaram as avaliações dos graus de similaridade existente entre os isolados de *Candida albicans* provenientes do mesmo voluntário

Os dendogramas representativos do agrupamento de perfis genéticos de *C. albicans* encontrados em cada voluntário, estão representados nas figuras 9 a 24. Na figura 9 pode-se observar a ocorrência simultânea de seis perfis genéticos de *C. albicans* encontrados na cavidade bucal do voluntário 7, pertencente ao grupo cárie ativo. Os seis “clusters” estão representados no dendograma de similaridade.

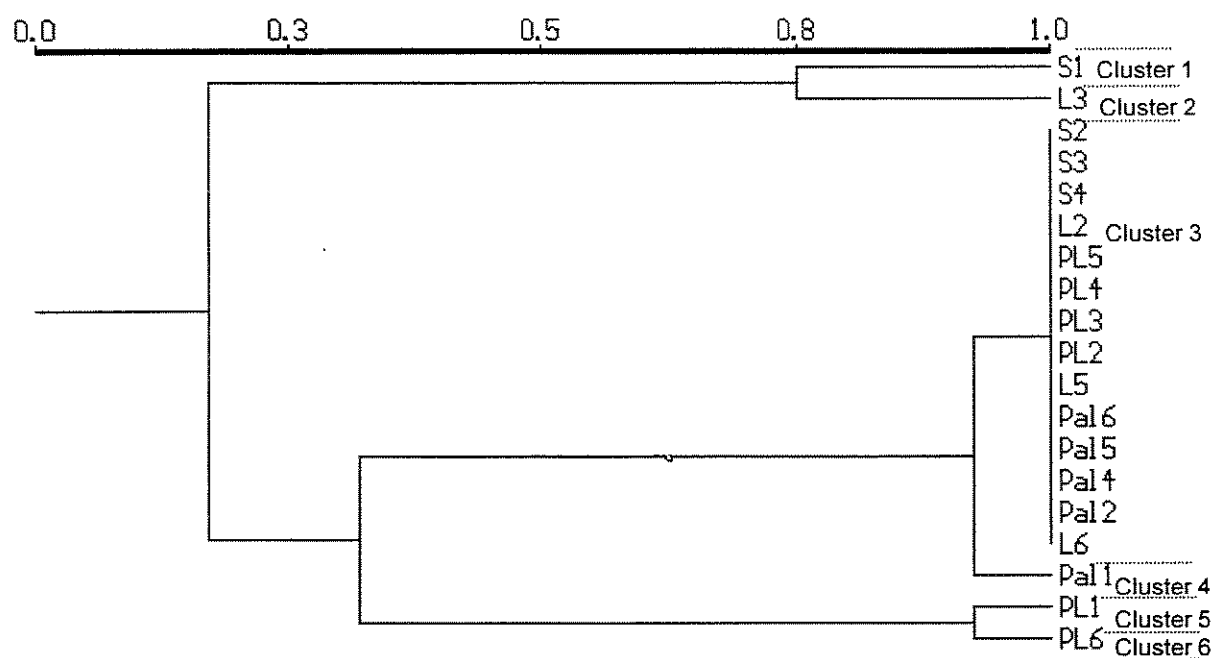


FIGURA 9 - Dendograma representativo do voluntário 7, grupo cárie ativo.

Dentre o extenso polimorfismo genético demonstrado neste voluntário, destaca-se um grupo de linhagem clonal numericamente predominante (cluster 3), distribuído em todos os sítios analisados; na saliva (S), no dorso da língua (L), em amostras da mucosa (Pal) e da placa dental (PL). As demais variantes genéticas apresentaram-se com localização sítio específica.

Comparando-se os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab.6) das cepas deste voluntário, podemos observar que a mesma linhagem clonal, representadas pelas amostras L2, Pal2 e Pal4, expressam perfis diferentes para produção de fosfolipase. Da mesma forma, linhagens clonais diferentes, podem apresentar o mesmo perfil enzimático (PL6, PL2 e Pal1). Neste voluntário a atividade enzimática das proteinases, foram iguais para todas as amostras testadas. O enzimatipo predominante foi P₂ F₂ (Proteinase positiva elevada e fosfolipase positiva elevada), seguido por P₂ F₁ (Proteinase positiva elevada e fosfolipase positiva) e P₂ F₀ (Proteinase positiva elevada e fosfolipase negativa).

TABELA 6
Perfis genotípicos e enzimáticos de amostras de *C. albicans* do voluntário 7

	S1	S2	S3	S4	L2	L3	L5	L6	Pal 1	Pal 2	Pal 4	Pal 5	Pal 6	PL 1	PL 2	PL 3	PL 4	PL 5	PL 6
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	0	2	2	2	0	2	2	2	2	1	2	1	1	0	2	1	2	1	2
Clusters	1	3	3	3	3	2	3	3	4	3	3	3	3	5	3	3	3	3	6

* S = Saliva; L= Dorso da língua; Pal = Mucosa; PL= Placa dental

Entre as duas linhagens genéticas de *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal do voluntário 8, do grupo cárie ativo (Fig. 10) a que se apresenta como predominante, encontrou-se dispersa nos diferentes sítios bucais analisados, uma segunda linhagem clonal apresentou-se com localização sítio específica na placa dental.

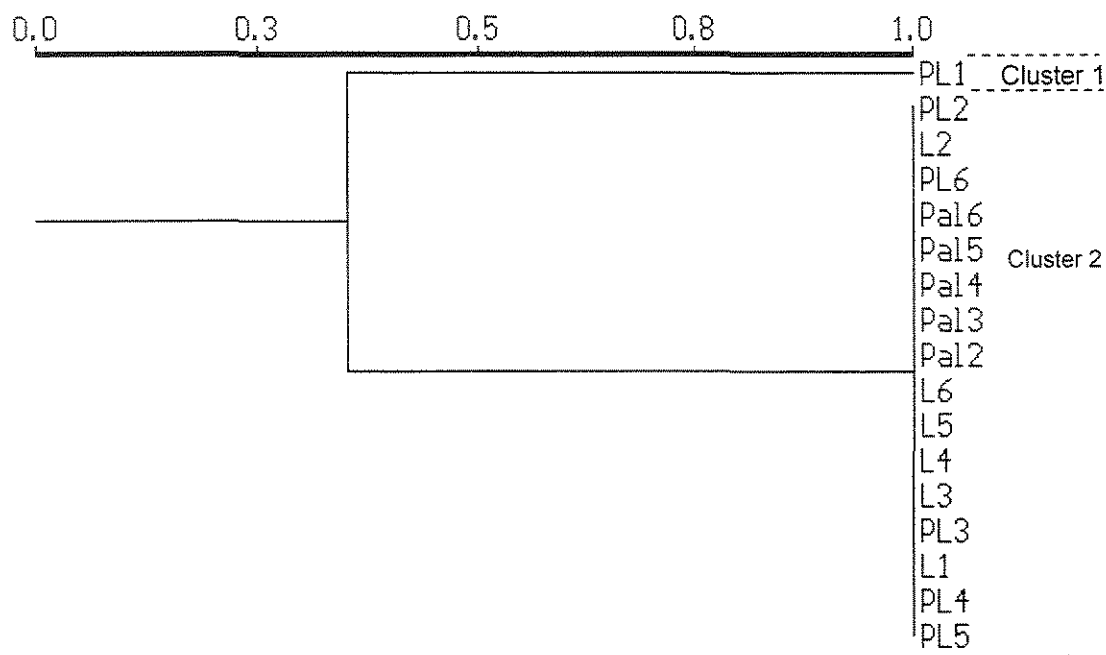


FIGURA 10 - Dendrograma representativo do voluntário 8, grupo cárie ativo.

Comparando os perfis genotípicos e fenotípicos dessas cepas (Tab.7), podemos observar que a mesma linhagem clonal apresenta perfis enzimáticos diferentes para produção, tanto de fosfolipase, como de proteinase, que pode ser evidenciado, nas cepas Pal2, Pal4 e Pal5. O único genótipo diferente (cluster 1), demonstrou atividade enzimática semelhante a algumas cepas pertencentes ao cluster 2. O enzimatipo predominante foi $P_2 F_2$, seguido por $P_0 F_2$ (proteinase negativa e fosfolipase positiva elevada) e em menor número pode-se observar a ocorrência de $P_2 F_1$.

TABELA 7
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 8

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	Pal 2	Pal 3	Pal 4	Pal 5	Pal 6	PL 1	PL 2	PL 3	PL 4	PL 5	PL 6
Proteinase	2	2	2	2	0	2	0	0	2	2	2	2	0	2	0	2	0
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
clusters	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2

* L= Dorso da língua; Pal= Mucosa; PL= Placa dental.

Na cavidade bucal do voluntário 15, foi possível detectar 3 variantes genéticas de *C. albicans* (Fig. 11) destacando-se um grupo de linhagem clonal numericamente predominante (cluster 2), distribuídos no dorso da língua (L), na placa dental (PL), na mucosa (Pal) e na saliva (S) e duas linhagens sítio específica L1 e PL5, pertencentes aos clusters 1 e 3 respectivamente.

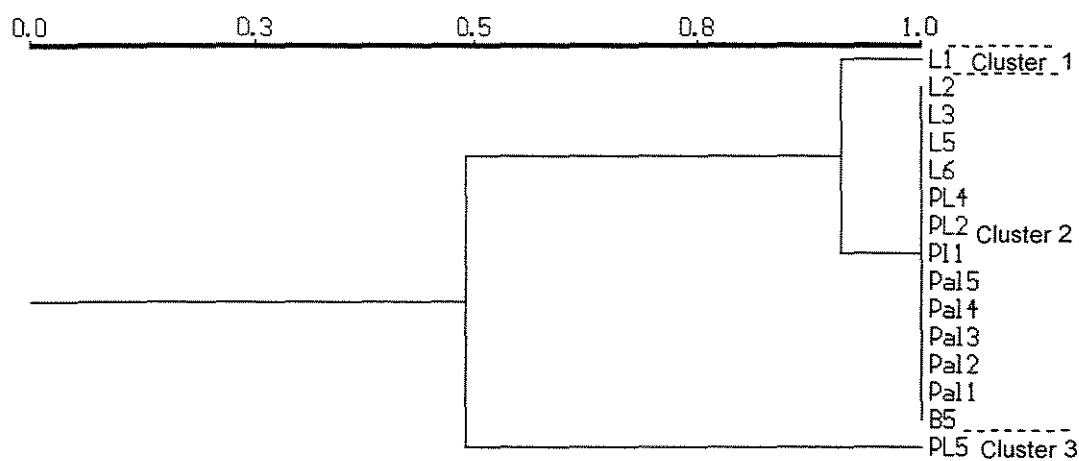


FIGURA 11 - Dendrograma representativo do voluntário 15, grupo cárie ativo

Relacionando-se os perfis genotípicos e fenotípicos destas amostras (Tab. 8), podemos observar que a mesma linhagem clonal possui perfis diferentes para produção de fosfolipase (ex: L2, Pal1 e B5), mas não difere na produção de proteinase. Da mesma forma, amostras geneticamente diferentes, podem apresentar o perfil enzimático semelhante, que observa-se comparando L1, PL4 e PL5. O enzimatipo predominante foi P₂ F₂, seguido por P₂ F₁ e P₂ F₀.

TABELA 8
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 15

	L1	L2	L3	L5	L6	B5	Pal 1	Pal 2	Pal 3	Pal 4	Pal 5	PL 1	PL 2	PL 4	PL 5
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	2	2	2	1	1	1	0	2	2	2	2	2	1	2	2
clusters	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3

* L= Dorso da língua; B = mucosa jugal; Pal= mucosa; PL= placa dental

As amostras de *C. albicans*, isoladas da cavidade bucal do voluntário 28 demonstraram polimorfismo genético e apresentaram-se em três linhagens clonais, sendo que todas as cepas analisadas foram provenientes da placa dental (Fig. 12).

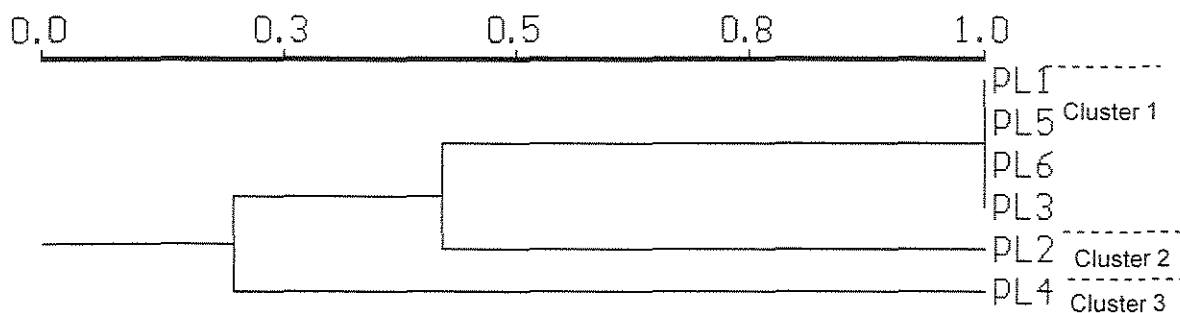


FIGURA 12 - Dendrograma representativo do voluntário 28, cárie ativo.

Na comparação entre o genótipo e as características fenotípicas desses isolados (Tab.9), podemos observar que diferentes linhagens clonais possuem o perfil de atividade enzimática semelhante (PL2 e PL4), e que a mesma linhagem clonal pode apresentar atividade enzimática diferente, mesmo estando presente no mesmo sítio (PL1 e PL5). Neste voluntário o enzimatipo predominante foi $P_2 F_2$, seguido por $P_2 F_1$.

TABELA 9
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 28

	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6
Proteinase	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	1	2	1	2	2	2
clusters	1	2	1	3	1	1

* PL = Placa dental

O total de cepas de *C. albicans* isoladas do voluntário 31, foram agrupados em quatro clusters diferentes (Fig. 13). A linhagem clonal predominante esteve presente na

placa dental e na mucosa jugal (cluster 1) e as demais foram encontradas apenas na placa dental.

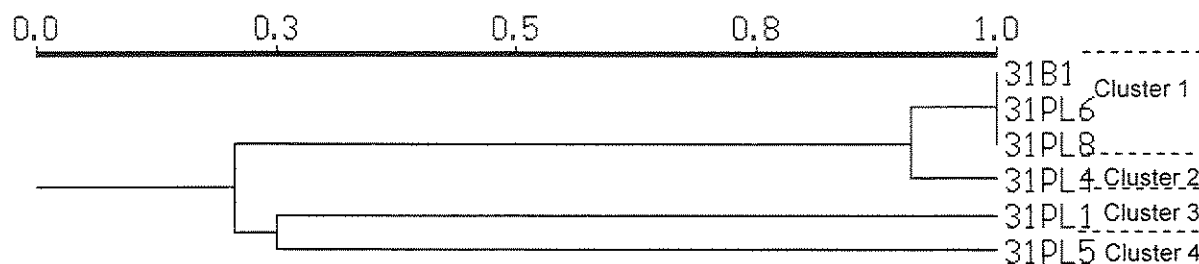


FIGURA 13 - Dendrograma representativo do voluntário 31, grupo cárie ativo.

Analisando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 10) das amostras deste voluntário, podemos observar que as atividades enzimáticas para proteinase e fosfolipase foram semelhantes para todas as cepas testadas, independentemente das características genotípicas. O único enzimatipo encontrado foi $P_2 F_2$.

TABELA 10
Perfis genotípicos e enzimáticos de amostras de *C. albicans* do voluntário 31

	B1	PL1	PL4	PL5	PL6	PL8
Proteinase	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2
clusters	1	3	2	4	1	1

* B= mucosa jugal; PL= placa dental.

Na cavidade bucal do voluntário 32, o total de *C. albicans* isoladas apresentaram quatro perfis genotípicos diferentes (Fig. 14).

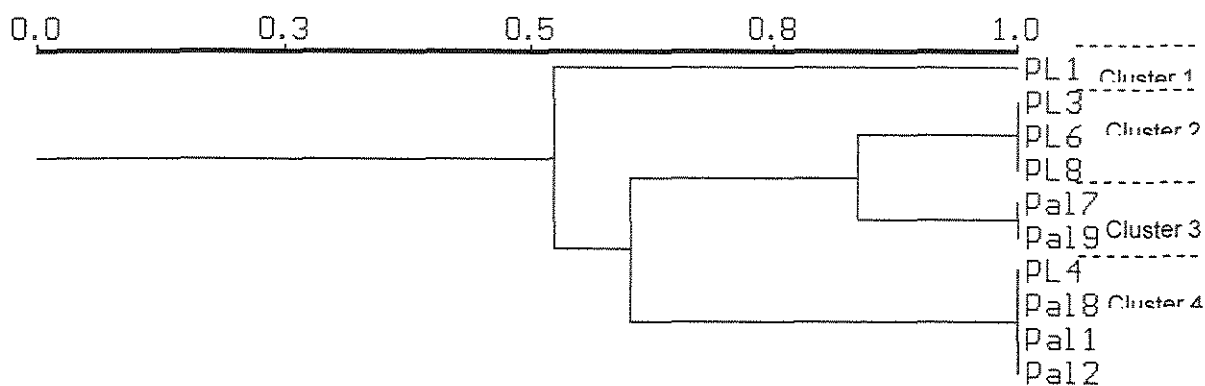


FIGURA 14 - Dendrograma representativo do voluntário 32, grupo cárie ativo.

As linhagens clonais agrupadas nos clusters 2 e 3 apresentaram-se com localização sítio específica na placa dental (PL) e na mucosa (Pal) respectivamente. As amostras agrupadas no cluster 4 estiveram presentes nos dois sítios estudados e uma única linhagem clonal (cluster 1) foi encontrada na placa dental. Através da análise dos perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 11) observa-se que as cepas com características genotípicas iguais, podem apresentar iguais ou diferentes perfis enzimáticos. Observa-se ainda, que cepas geneticamente diferentes, podem ter o mesmo perfil enzimático. Neste voluntário o enzimatipo predominante foi $P_2 F_2$, seguido por $P_2 F_1$ e $P_2 F_0$.

TABELA 11
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 32

	PL1	PL3	PL4	PL6	PL8	Pal1	Pal2	Pal7	Pal8	Pal9
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	1	2	0	2	2	0	2	1	2	2
clusters	1	2	4	2	2	4	4	3	4	3

* PL= Placa dental; Pal= Mucosa

O polimorfismo genético demonstrado representativamente no dendograma de similaridade (Fig. 15), destaca a ocorrência de três linhagens clonais, presentes na cavidade bucal do voluntário 33, sendo que o grupo numericamente predominante (cluster 2) foi encontrado em dois sítios analisados, placa dental e mucosa jugal. As linhagens clonais, representadas (clusters 1 e 3), apresentaram-se com localização sítio específica na mucosa e na placa dental respectivamente.

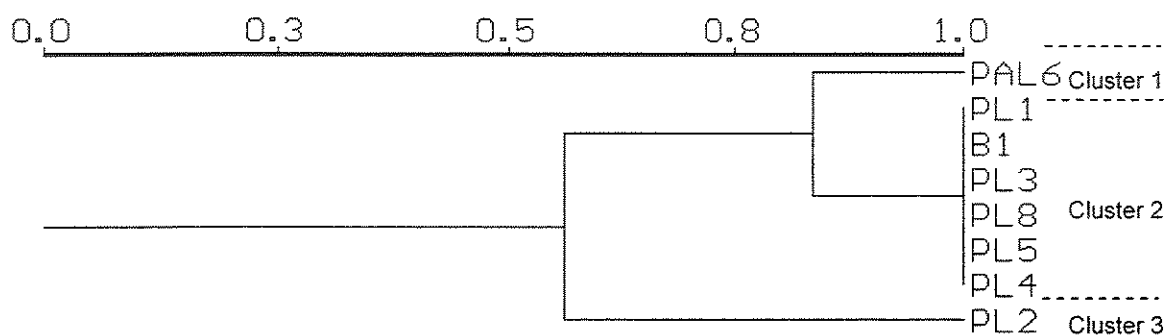


FIGURA 15 - Dendograma representativo do voluntário 33, grupo cárie ativo.

Comparando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 12), podemos observar que todas as cepas apresentaram perfil enzimático para a produção de fosfolipase semelhantes, independentemente da linhagem clonal a que pertencem. Em relação a produção da enzima proteinase, cepas geneticamente iguais apresentaram diferentes perfis enzimáticos, como pode ser observada nas amostras B1, PL8 e PL4, e cepas geneticamente diferentes apresentaram perfis enzimáticos idênticos, que pode ser observada comparando-se as amostras B1 e Pal6. Neste voluntário o enzimatipo predominante foi $P_0 F_2$, seguido por $P_1 F_2$ e $P_2 F_2$.

TABELA 12
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 33

	B1	Pal6	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL8
Proteinase	1	1	0	0	0	0	0	2
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2	2	2
clusters	2	1	2	3	2	2	2	2

* B= mucosa jugal; Pal= mucosa; PL= placa dental

As amostras de *C. albicans*, isoladas da cavidade bucal do voluntário 35, apresentaram duas linhagens genéticas diferentes, as agrupadas no cluster 2, encontraram-se dispersas nos diferentes sítios analisados, e uma única cepa, geneticamente diferente das demais (cluster 1) foi detectada na placa dental (Fig. 16).

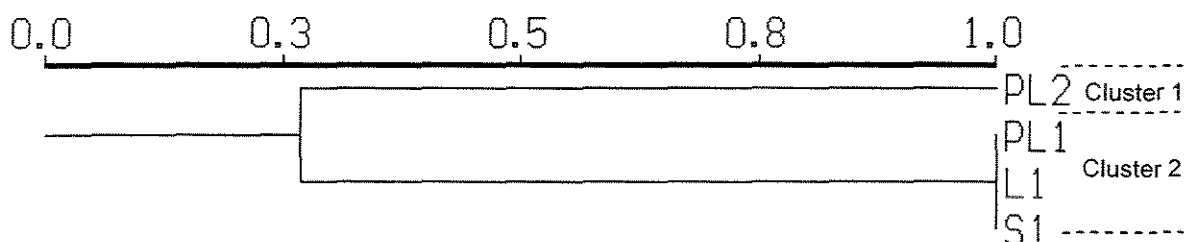


FIGURA 16 - Dendrograma representativo do voluntário 35, grupo cárie ativo.

A relação entre os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 13) demonstram que, embora todas as cepas testadas apresentem o mesmo perfil enzimático para produção de proteinase, em relação a produção da fosfolipase esses perfis diferem. Cepas geneticamente iguais apresentam perfis enzimáticos distintos, e cepas geneticamente diferentes podem apresentar o mesmo perfil enzimático, como pode ser observado comparando-se as

amostras PL1 e PL2. O enzimatipo predominante neste voluntário foi P₂ F₁, seguido por P₂ F₀.

TABELA 13
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 35

	PL1	PL2	L1	S1
Proteinase	2	2	2	2
Fosfolipase	1	1	1	0
clusters	2	1	2	2

* PL= placa dental; L= dorso da língua; S= saliva

O total de amostras de *C. albicans*, isoladas da cavidade bucal do voluntário 59, foram agrupados em 3 clusters diferentes (Fig. 17).

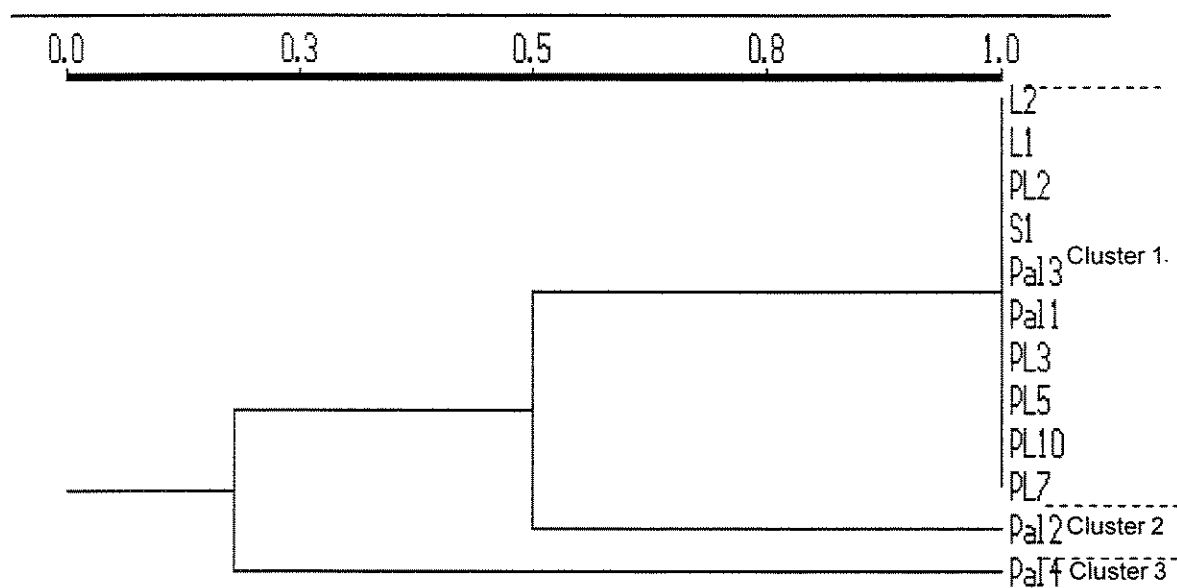


FIGURA 17 – Dendrograma representativo do voluntário 59, grupo cárie ativo.

A linhagem clonal predominante (cluster 1), encontrou-se dispersa em todos os sítios analisados, sendo que as outras duas linhagens clonais, enquadradas nos clusters 2 e 3, encontraram-se presentes na mucosa. Na relação entre a fenotipagem e a genotipagem (Tab. 14), pode-se observar que o perfil enzimático para produção de proteinase foi semelhante em todas as cepas analisadas, independente da linhagem clonal a que pertencem. Em relação a produção da fosfolipase, a mesma linhagem clonal apresentou diferentes perfis enzimáticos que podem ser observadas comparando-se as amostras S1 e Pal1, e linhagens clonais diferentes apresentaram o mesmo perfil enzimático, como visto nas amostras Pal2 e S1. O enzimatipo predominante neste voluntário foi $P_2 F_2$, seguido por $P_2 F_1$ e $P_2 F_0$.

TABELA 14
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 59

	L1	L2	PL2	PL3	PL5	PL7	PL10	Pal1	Pal2	Pal3	Pal4	S1
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	0	1
clusters	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1

* L= dorso da língua; PL= placa dental; Pal= mucosa; S=saliva.

Na cavidade bucal do voluntário 63, embora todas as cepas sejam provenientes do mesmo sítio (placa dental), pode-se verificar um polimorfismo genético, demonstrado representativamente no dendograma de similaridade (Fig. 18), destacando-se uma linhagem clonal numericamente predominante (cluster 2) e duas outras, encontradas com menor intensidade.

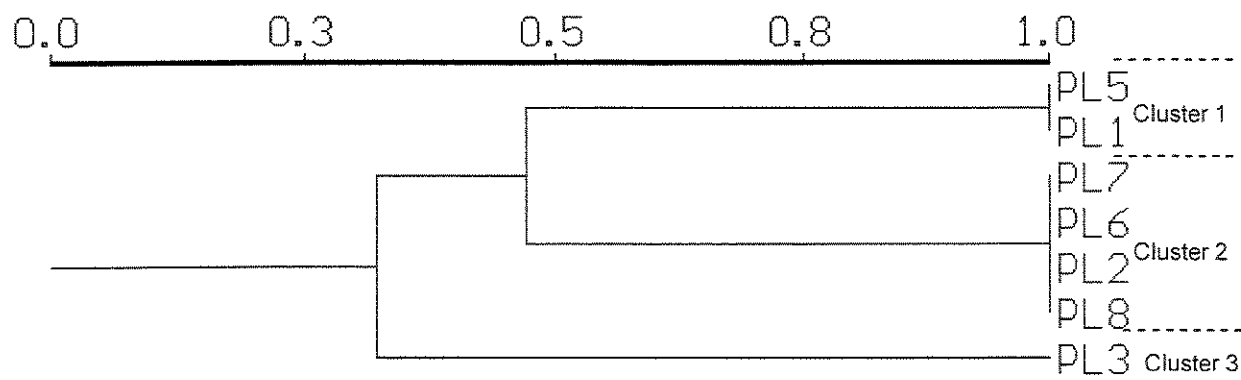


FIGURA 18 - Dendrograma representativo do voluntário 63, grupo cárie ativo.

Comparando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 15) das amostras deste voluntário, podemos observar que as atividades enzimática para proteinase, foram iguais para todas as cepas, independentemente da linhagem clonal a que pertencem, em relação a enzima fosfolipase, observou-se variações em sua produção, entre cepas iguais geneticamente, como pode ser observada comparando as amostras PL6 e PL7, e entre cepas diferentes geneticamente como PL3 e PL5. Neste voluntário o enzimatipo predominante foi $P_2 F_2$, seguido por $P_2 F_1$.

TABELA 15
Perfis genotípicos e enzimáticos das amostras de *C. albicans* do voluntário 63

	PL1	PL2	PL3	PL5	PL6	PL7	PL8
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	1	2	2	1	2	1	2
clusters	1	2	3	1	2	2	2

*PL= placa dental.

Analisando os perfis genotípico e fenotípico de *C. albicans* dos voluntários livres de cárie, pode-se constatar que no voluntário 17, duas linhagens genéticas foram encontradas (Fig.19). A numericamente predominante (cluster 1), encontrou-se dispersa em todos os diferentes sítios-bucais analisados, e uma segunda linhagem clonal (cluster 2), foi encontrada na mucosa e na placa dental.

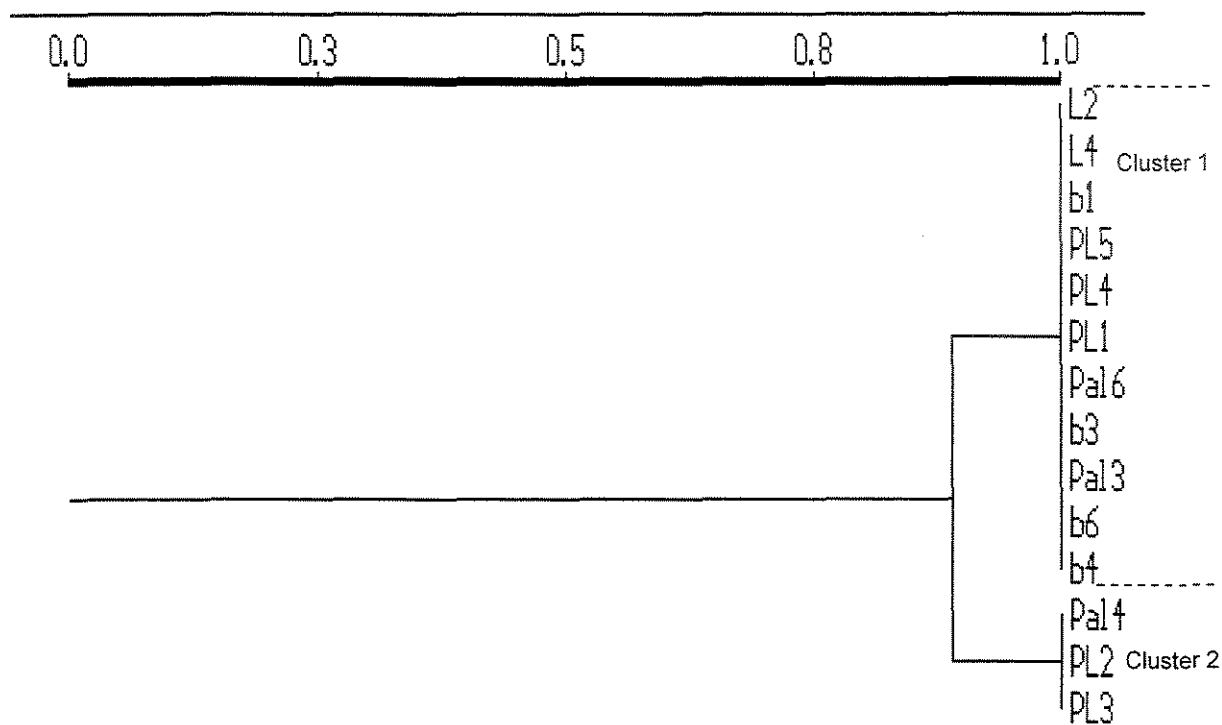


FIGURA 19 – Dendrograma representativo do voluntário 17, grupo livre de cárie.

Comparando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab.16) das amostras deste voluntário, podemos observar que a atividade enzimática para produção de proteinase foi semelhante para todas as cepas testadas, independentemente da linhagem clonal a que pertencem, já em relação à produção de fosfolipase, cepas iguais geneticamente apresentaram perfis enzimáticos diferentes (ex: PL2 e PL3) e cepas diferentes

geneticamente apresentaram perfis enzimáticos idênticos (ex: PL3 e PL4). O enzimatipo predominante neste voluntário foi $P_2 F_2$, seguido em menor número por $P_2 F_1$.

TABELA 16
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 17

	L2	L4	B1	B3	B4	B6	Pal3	Pal4	Pal6	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2
clusters	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1

* L= dorso da língua; B= mucosa jugal; Pal=mucosa; PL=placa dental

As amostras de *C. albicans*, isoladas da cavidade bucal do voluntário 18, são provenientes do mesmo sítio e encontraram-se agrupadas em um único cluster (Fig. 20).

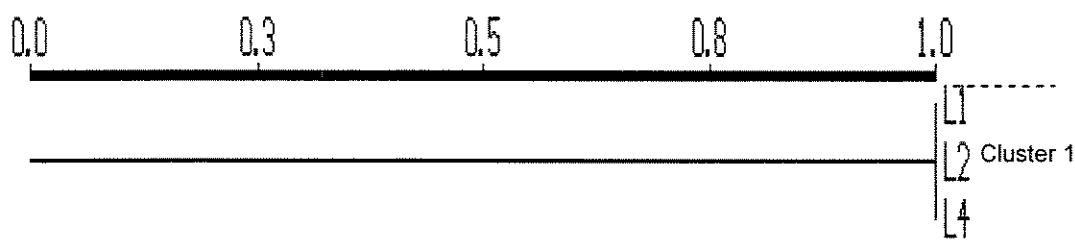


FIGURA 20 – Dendograma representativo do voluntário 18, grupo livre de cárie.

Comparando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab.17) das cepas de *Candida albicans* deste voluntário, podemos observar que as atividades enzimáticas para cepas geneticamente iguais, foram diferentes tanto para a produção de proteinase, como para a produção de fosfolipase. Este voluntário apresentou 2 cepas com enzimatipo $P_1 F_1$ e uma cepa $P_0 F_2$.

TABELA 17
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 18

	L1	L2	L4
Proteinase	1	0	1
Fosfolipase	1	2	1
clusters	1	1	1

* L= dorso da língua

O total de amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal do voluntário 34, foram provenientes do mesmo sítio, e apresentaram-se agrupados em um único cluster (Fig. 21).

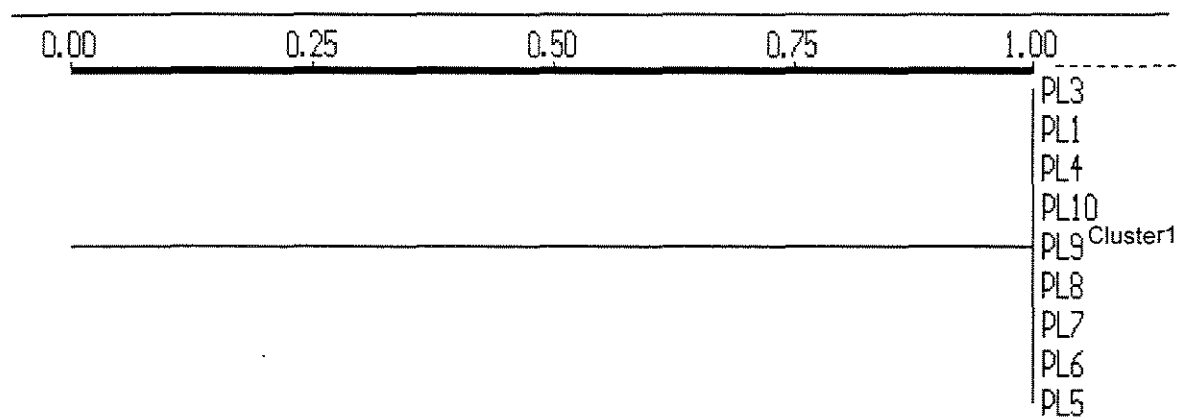


FIGURA 21 - Dendograma representativo do voluntário 34, grupo livre de cárie.

Relacionando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab.18), podemos observar que o perfil genético, assim como as atividades enzimáticas foram iguais para todas as amostras testadas. O único enzimatipo encontrado neste voluntário foi $P_2 F_2$.

TABELA 18
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 34

	PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6	PL7	PL8	PL9	PL10
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
clusters	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

* PL= placa dental

Dentre as amostras isoladas do voluntário 46, foi detectada cepas de *C. albicans* pertencentes a uma única linhagem clonal (Fig. 22).

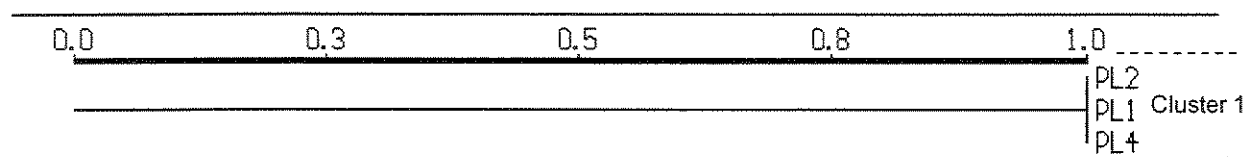


FIGURA 22 - Dendrograma representativo do voluntário 46, grupo livre de cárie.

Relacionando os perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 19), observa-se que embora as cepas sejam geneticamente iguais, o perfil enzimático para produção da enzima fosfolipase é diferente entre elas, que pode ser observado quando se comparam as cepas PL2 e PL4. O enzimotipo predominante foi P₂ F₂.

TABELA 19
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 46

	PL1	PL2	PL4
Proteinase	2	2	2
Fosfolipase	2	2	0
clusters	1	1	1

* PL= placa dental

Dentre o polimorfismo genético de *C. albicans*, demonstrado representativamente no dendograma de similaridade (Fig. 23) do voluntário 56, a linhagem clonal, numericamente dominante (cluster 1), encontrou-se dispersa nos dois sítios-bucais analisados. Uma segunda linhagem clonal (cluster 2), foi isolada da mucosa, e amostras de outra linhagem clonal (cluster 3), foram isoladas da placa dental e da mucosa.

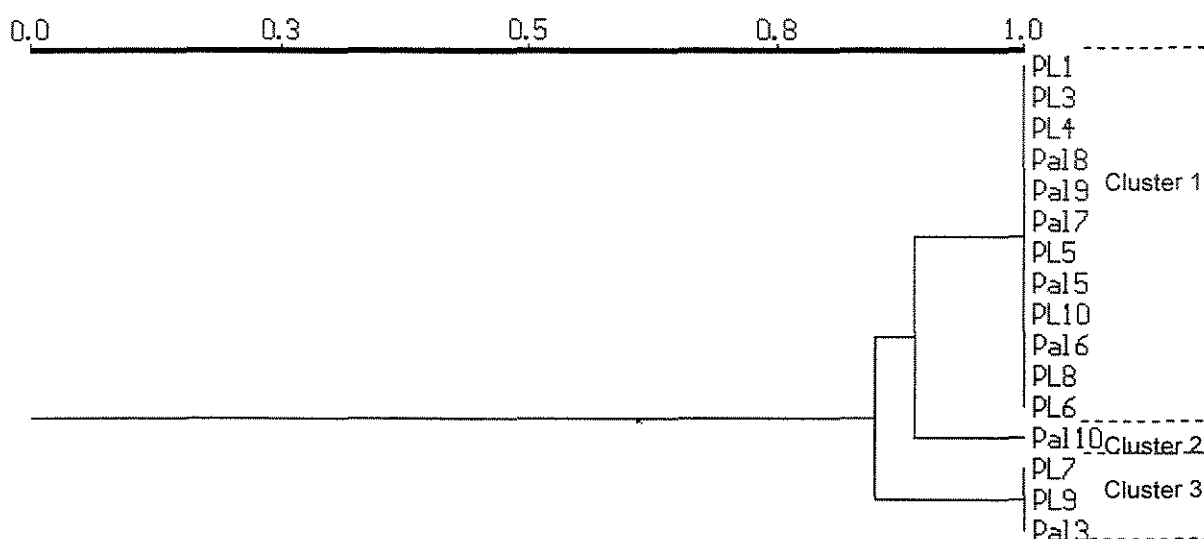


FIGURA 23 – Dendograma representativo voluntário 56, grupo livre de cárie.

A análise genotípica e fenotípica (Tab. 20), demonstram que o perfil enzimático para produção da enzima proteinase foi igual para todas as cepas testadas, independentemente da linhagem clonal a que pertencem. Já o perfil enzimático da fosfolipase, diferiu entre as cepas pertencentes à mesma linhagem clonal (ex: Pal5 e Pal9) assim como, cepas de linhagens clonais diferentes apresentaram perfis enzimáticos semelhantes, que pode ser observada quando comparadas às cepas PL7 e Pal5. Neste voluntário a frequência dos enzimatipos $P_2 F_2$ e $P_2 F_1$, foram iguais.

TABELA 20
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 56

	PL 1	PL 3	PL 4	PL 5	PL 6	PL 7	PL 8	PL 9	PL 10	Pal 3	Pal 5	Pal 6	Pal 7	Pal 8	Pal 9	Pal 10
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1
clusters	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	1	1	1	1	1	2

* PL= placa dental; Pal= mucosa

O total de amostras de *C. albicans*, isoladas da cavidade bucal do voluntário 60, apresentam duas linhagens clonais (Fig. 24), destacando-se uma numericamente predominante, representada pelo cluster 2, dispersas nos dois sítios analisados neste contexto, e outra com colonização sítio específica na mucosa (cluster 1), presente na mucosa.

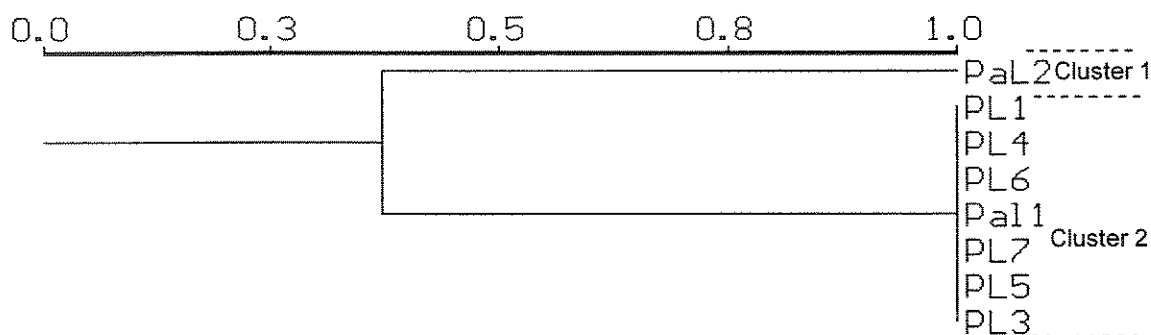


FIGURA 24 – Dendrograma representativo do voluntário 60, grupo livre de cárie.

Na análise dos perfis genotípicos e fenotípicos (Tab. 21), observa-se que a atividade enzimática para produção de proteinase foi semelhante para todas as cepas testadas, independentemente da linhagem clonal a que pertencem. Já em relação a produção

da enzima fosfolipase, cepas diferentes genéticamente apresentaram o mesmo perfil enzimático, assim como cepas iguais genéticamente apresentaram perfis enzimáticos diferentes. O enzimotipo predominante foi $P_2 F_2$ seguido por $P_2 F_1$.

TABELA 21
Perfis genotípicos e enzimático de amostras de *C. albicans* do voluntário 60

	PL1	PL3	PL4	PL5	PL6	PL7	Pal1	Pal2
Proteinase	2	2	2	2	2	2	2	2
Fosfolipase	2	2	2	2	2	2	1	1
clusters	2	2	2	2	2	2	2	1

* PL= placa dental; Pal= mucosa.

Através da análise genotípica, obtida pela técnica de AP-PCR, foi possível detectar o número de linhagens clonais presentes em cada voluntário. A média do número de clones, dos dois grupos estudados (Fig. 25), demonstra uma maior quantidade de linhagens clonais no grupo de voluntários cárie ativos, em relação ao grupo livre de cárie. Através da análise pelo teste T de Student, ($p= 0.4532$), não observou-se diferença estatisticamente significativa entre a média do número de clones entre os dois grupos estudados. A média do número de biótipos encontrados através da enzimotipagem, (Fig. 26), demonstra uma maior quantidade de biótipos no grupo carie ativo em relação ao grupo livre de cárie. Da mesma forma, através da análise pelo teste T de Student, ($p= 0.4555$), não observou-se diferença estatisticamente significativa entre a média do número de biótipos entre os dois grupos estudados.

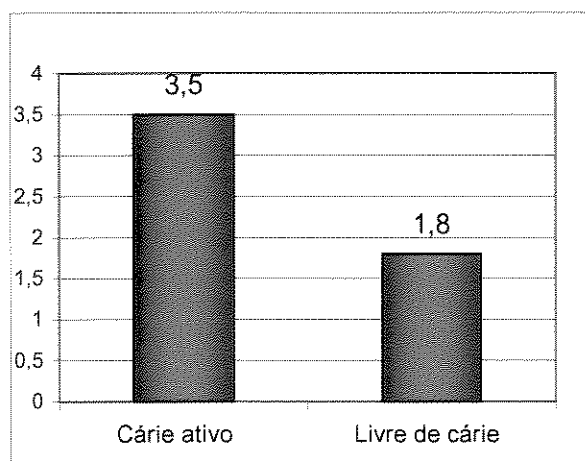


FIGURA 25 - Média do número de linhagens clonais nos grupos cárie ativos e livres de cárie.

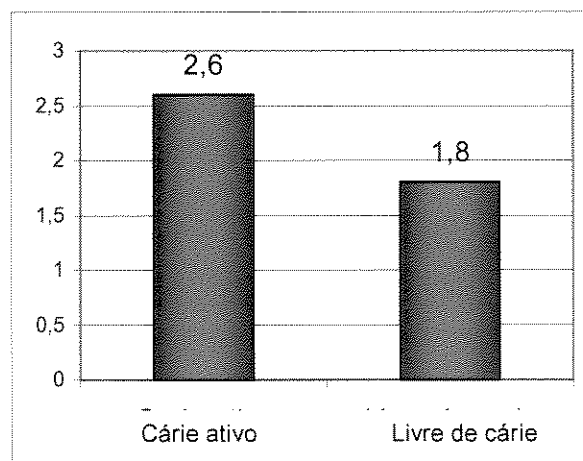


FIGURA 26 - Média do número de biótipos nos grupos cárie ativos e livres de cárie.

Ao correlacionar o agrupamento genotípico, obtido por AP-PCR, com o fenotípico, obtido por enzimatipagem dos voluntários do grupo cárie ativo, pode-se observar que existe uma diferença em relação ao número de genótipos e fenótipos em um mesmo voluntário. O número de genótipos em voluntários cárie ativos variou de 02 a 06, e o número de fenótipos de 01 a 03, no mesmo grupo (Tab. 22).

TABELA 22
Características fenotípicas e genotípicas do grupo cárie ativo.
Relação entre o número de genótipos e fenótipos de um mesmo voluntário.

<i>Voluntários</i>	07	08	15	28	31	32	33	35	59	63
Genótipo AP-PCR	06	02	03	03	04	04	03	02	03	03
Fenótipo FxPx	03	03	03	03	01	03	03	02	03	02
Cepas analisadas	19	17	15	06	06	10	08	04	12	07

A figura 27, expressa a média do número de linhagens clonais e fenótipos de *C. albicans*, nos voluntários cárie ativos, Se observa através da análise estatística realizada pelo teste T de Student ($p= 1$) que a média do número de clones obtidos através da técnica molecular de AP-PCR, não seja estatisticamente diferente da média do número de fenótipos, obtidos pela técnica de enzimotipagem.

A relação entre as características fenotípicas com as características genotípicas do grupo de voluntários livre de cáries (Tab. 23), demonstram que existe uma diferença em relação ao número de genótipos e fenótipos de um mesmo voluntário. O número de genótipos neste grupo de voluntários, variou entre 01 e 03 e o número de fenótipos (obtidos pela enzimotipagem) entre 01 e 02, no mesmo grupo.

TABELA 23
Características fenotípicas e genotípicas do grupo cárie ativo.
Relação entre o número de genótipos e fenótipos de um mesmo voluntário.

Voluntários	17	18	34	46	56	60
Genótipo AP-PCR	02	01	01	01	03	03
Biotipos PxFx	02	02	01	02	02	02
Total de cepas	14	03	09	03	16	08

A figura 28, demonstra a média do número de linhagens clonais e fenótipos de *C. albicans*, nos voluntários livres de cárie, não revela indícios de que a média do número de clones obtidos através da técnica molecular de AP-PCR, seja estatisticamente diferente

da média do número de fenótipos, obtidos pela técnica de enzimotipagem, através do teste T de Student ($p= 0.07$)

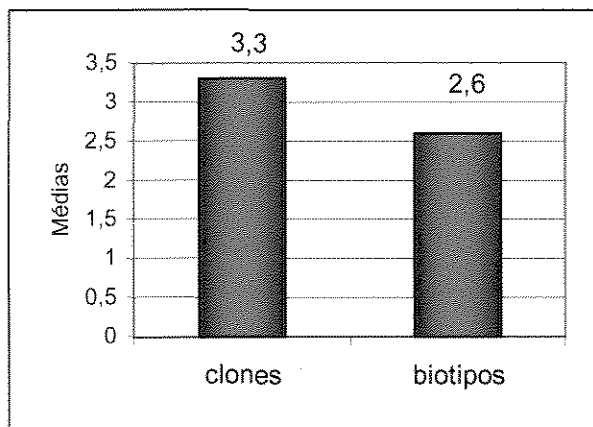


FIGURA 27 - Média do número de linhagens clonais e biótipos no grupo cárie ativo.

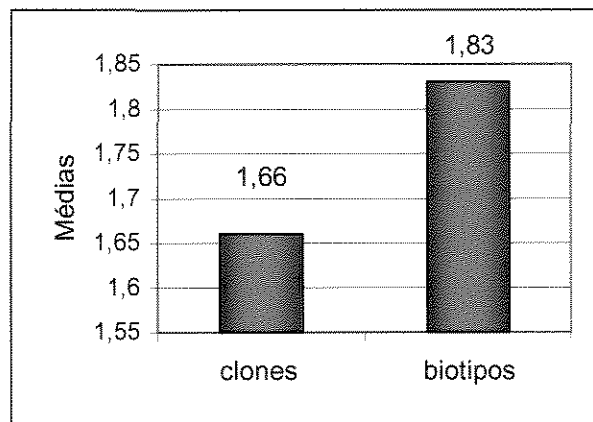


FIGURA 28 - Média do número linhagens clonais e biótipos no grupo livre de cárie.

Após a determinação dos perfis pela técnica da AP-PCR de *Candida albicans* de todos os voluntários carie ativos, um representante de cada linhagem clonal foi utilizado para se obter o dendograma apresentado na figura 29. O valor de similaridade máxima ($S_{SM}= 1,0$) não foi encontrado em nenhum tipo clonal oriundo de indivíduos diferentes.

Da mesma forma, após a determinação dos perfis AP-PCR de *Candida albicans* de todos os voluntários livres de cárie, um representante de cada linhagem clonal foi utilizado para se obter o dendograma apresentado na figura 30. O valor de similaridade máxima ($S_{SM}= 1,0$), também não foi encontrado em nenhuma linhagem clonal oriunda de indivíduos diferentes.

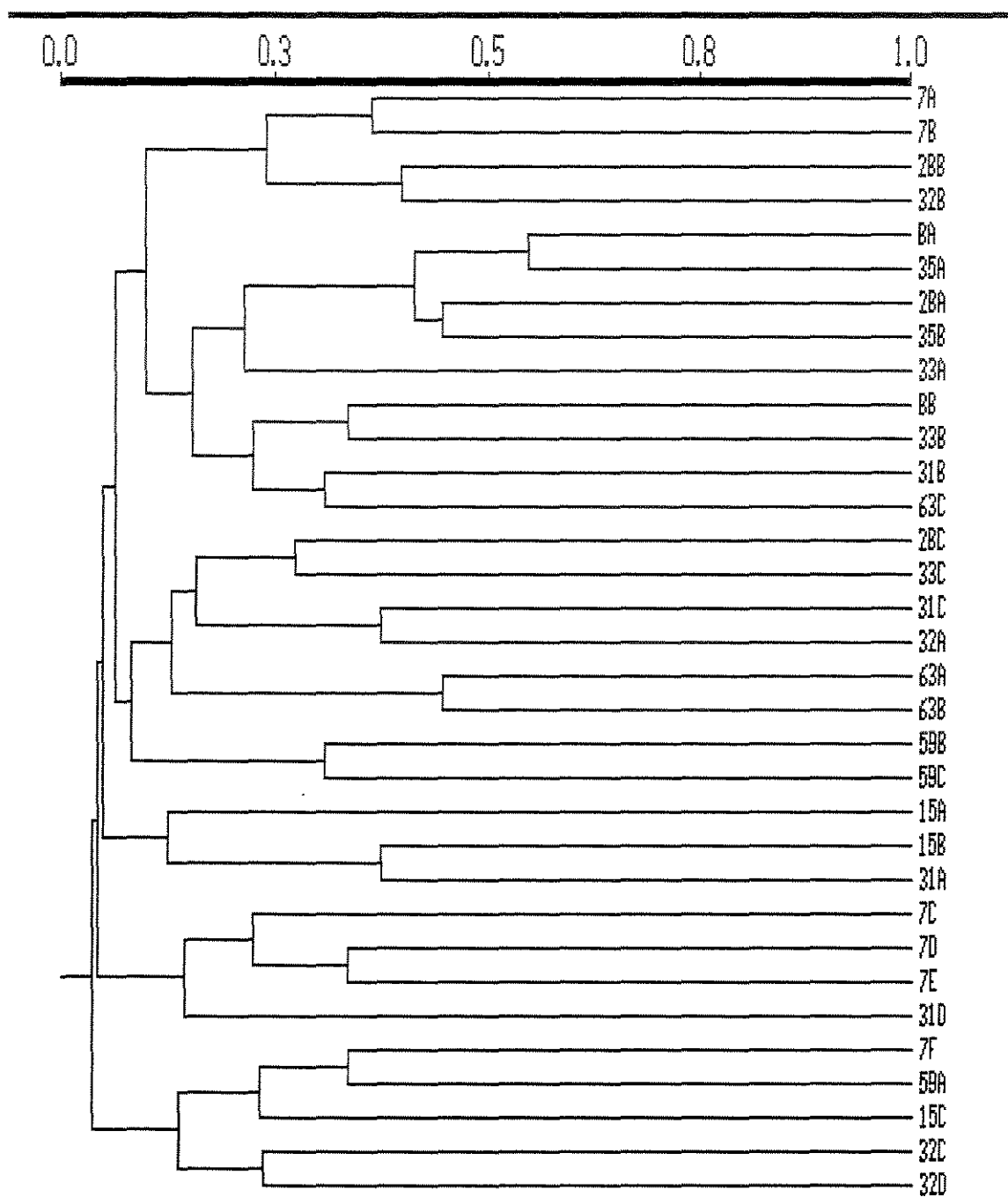


FIGURA 29 - Dendograma representativo dos genótipos obtidos de todos os voluntários pertencentes ao grupo cárie ativo.

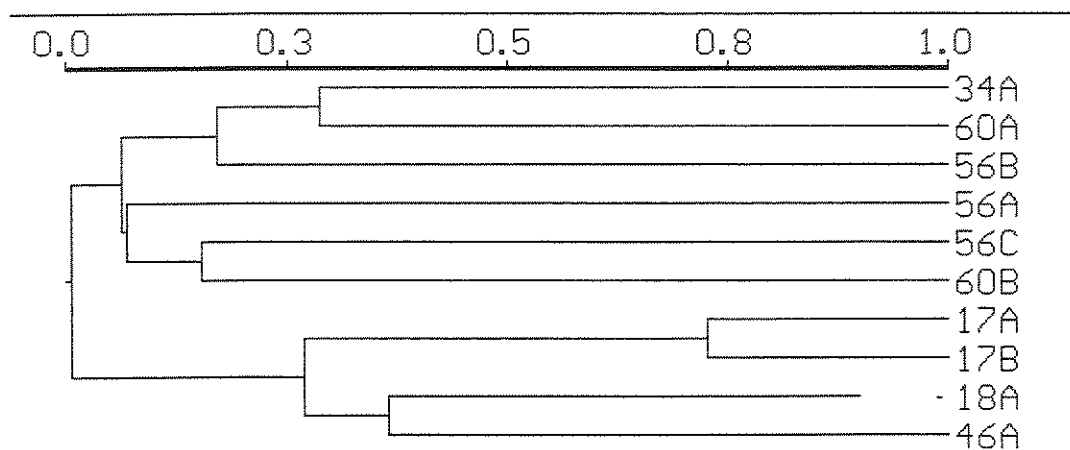


FIGURA 30 - Dendrograma representativo dos genótipos obtidos de todos os voluntários pertencentes ao grupo livre de cárie.

6 DISCUSSÃO

Os mecanismos que determinam a patogenicidade do gênero *Candida* spp, não estão totalmente esclarecidos. Várias hipóteses tem sido sugeridas: fatores intrínsecos das espécies ainda não determinados, aderência aos tecidos, dimorfismo, composição da parede celular e produção de toxinas e enzimas hidrolíticas (ODDS, 1987; GRANNOUM & ABBU-ELTEEN, 1990). Ainda a patogenicidade das espécies de *Candida* spp, resultam de características próprias das amostras em questão, do estado imunológico do hospedeiro, e das condições locais dos sítios de infecção (SAMARANAYAKE & MacFARLANE, 1990; OKSALA, 1990).

Para auxiliar na invasão dos tecidos do hospedeiro, as células microbianas possuem um conjunto de enzimas hidrolíticas que lesam ou destroem os constituintes das membranas celulares, levando a uma disfunção e ou destruição física (SALYES & WITT, 1994). Uma vez que as membranas são constituídas de lipídeos e proteínas, estes constituintes bioquímicos podem servir como um receptor para enzimas microbianas. Fungos patogênicos como *Candida albicans*, secretam enzimas que são consideradas essenciais para sua patogenicidade, como proteinases (HUBE *et al.*, 1998; HUBE 1998), que hidrolisam ligações peptídicas e fosfolipases, que hidrolisam fosfolipídios (IBRAHIM *et al.*, 1995).

O termo fosfolipase refere-se a um grupo heterogêneo de enzimas, com capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações ésteres nos glicerofosfolipídeos (ANSELL

& HAWTHORNE, 1964), que através da clivagem de fosfolipídios, desestabilizam a membrana, resultando em lise celular (SALYERS & WITT, 1994). A quantidade de fosfolipase produzida por *C. albicans* varia conforme o isolado específico e foi relacionada aos sítios de infecção. Segundo PRICE *et al.*, 1982, os isolados sanguíneos, geralmente produzem maiores níveis de fosfolipase que os isolados da pele ou urina. Ainda WILLIAMSON *et al.*, 1986, envolvendo 100 isolados orais de *C. albicans* verificou que 94% das amostras testadas eram fosfolipase positiva (PZ de 0,3 a 0,9). SAMARANAYAKE, *et al.*, 1984 avaliaram isolados de *Candida* spp para detectar a atividade enzimática e constatando-se que 79% das cepas de *C. albicans* produziam fosfolipase, enquanto, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não as produziam. Do mesmo modo CANDIDO *et al.*, 2000, relataram que 96% das amostras de *C. albicans* da cavidade oral apresentaram atividade positiva em relação a fosfolipase. Alguns estudos anteriores sobre fosfolipases já haviam demonstrado que 30% a 100% das cepas de *C. albicans* são produtoras dessa enzima (PRICE *et al.* 1982; SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; SHIMIZU, 1989).

Pesquisadores brasileiros como MAFFEI (1996) analisando amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes, constatou que 51,1% das cepas eram fosfolipase positivas. No estudo de SOUZA *et al.*, 1990 analisando amostras de *C. albicans* sorotipo A e B, esse percentual atingiu 73,3%; no de CANDIDO, 1991, amostras de diferentes materiais biológicos obtiveram um índice de 96,6%, e SHIMIZU (1989) analisando diversas espécies de *Candida* spp encontrou que 100% das cepas de *C. albicans* são produtoras de

fosfolipase. PENHA *et al.*, 2000, verificou que entre as cepas provenientes da cavidade oral, 83,3% tiveram atividade enzimática positiva para essa enzima.

Os testes de atividade enzimática no presente trabalho, demonstraram que 95,2% das cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade oral possuem atividade enzimática positiva para fosfolipase (PZ de 0,3 a 0,9), estando dentro dos parâmetros encontrados por autores estrangeiros (PRICE *et al.*, 1982; SAMARANAYAKE *et al.*, 1984).

Nosso percentual, no entanto, foi maior do que o obtido por MAFFEI (1996) e SOUZA *et al.*, 1990, estando bem próximo dos resultados descritos por CANDIDO *et al.*, 1991 que foi de 96%; de SHIMIZU (1989) que foi 100% e de PENHA *et al.*, 2000 que foi de 83,3%.

Esses resultados sugerem em princípio, que espécies de *C. albicans* são fosfolipase positivas como um fator intrínscio dessa espécie, com graus variados de atividade. A presença de isolados fosfolipase negativo neste trabalho foi muito pequena (4,8%), quando comparada a um estudo anterior demonstrando que 23% dos isolados orais, 45% dos isolados de sangue, 50% dos isolados de lesões e 70% dos isolados de urina, foram negativos (PRICE *et al.*, 1982).

As variações na atividade enzimática obtida nos diferentes trabalhos, podem ter sido refletidas por variações de metodologias que envolvem o tratamento da amostragem de modo geral.

Comparando-se a atividade enzimática da fosfolipase de cepas provenientes da cavidade oral nos dois grupos estudados, (um dos objetivos deste estudo), pode-se observar que 92,3% das 104 amostras de voluntários cárie ativos e 98 % das 54 amostras de voluntários livres de cárie, foram positivas para produção dessa enzima (incluindo índices 1 e 2), enquanto que 7,7% e 2% respectivamente demonstraram atividade enzimática negativa (índice 0). Entre os dois grupos estudados, houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,025$) apenas em relação ao índice 0 (zero) que foi mais freqüente no grupo cárie ativo.

Nossos resultados estão parcialmente de acordo com os encontrados por PENHA *et al.*, 2000 que ao avaliar a atividade enzimática da fosfolipase de isolados orais de pacientes com e sem estomatite de dentadura (DS) sugere que não existe diferença na produção dessa enzima em relação aos aspectos clínicos observados nos dois grupos estudados, e com o de CANDIDO *et al.*, 2000, que verificou que 83,3% e 71,9% das cepas de *C. albicans* foram produtoras dessa enzima, quando isoladas de nichos com e sem lesões características de candidíase, respectivamente.

HANNULA *et al.*, 2000, comparando fatores de virulência de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, isoladas de pacientes saudáveis e com candidíase crônica, verificou que 52% das cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes imunocomprometidos e 60% dos isolados de pacientes saudáveis produziram fosfolipase.

Autores como IBRAHIM *et al.*, 1995 os quais analisaram isolados clínicos de sangue com isolados comensais da cavidade oral de voluntários clinicamente sadios,

observaram que isolados do sangue eram mais produtores de fosfolipase que isolados orais, sugerindo que essa enzima possa ser um fator de virulência de infecções disseminadas do sangue.

Embora o número de amostras com atividade enzimática positiva tenha sido maior em relação a alguns trabalhos, nossos resultados, no entanto confirmam os obtidos por PENHA *et al.*, 2000; CANDIDO *et al.*, 2000 e HANNULA *et al.*, 2000 que não demonstraram diferenças na produção dessa enzima em relação as amostras clínicas da cavidade oral divergindo portanto dos resultados de IBRAHIM *et al.*, 1995. É possível que amostras comensais expressem uma menor capacidade de produção dessas enzimas, quando comparadas com isolados clínicos, permitindo a estes uma maior patogenicidade. Diferenças nas técnicas de detecção destas enzimas, no entanto, não devem ser excluídas.

O fato de termos encontrado uma maior quantidade de cepas com atividade enzimática negativa (índice 0), no grupo de voluntários cárie ativos, podem estar relacionada ao tipo de dieta, que provavelmente é mais rica em açúcares. Segundo SAMARANAYAKE *et al.*, 1984, a produção de fosfolipase por *C. albicans* “in vitro” decresce com altas concentração de sacarose e galactose, e é totalmente inibida por uma alta concentração de glicose. Em termos clínicos, elevada concentração intra-oral dessa dieta rica em açúcares, pode suprir a formação da fosfolipase, reduzindo assim o potencial patogênico dessa levedura. Em contraste, se esse efeito é benéfico para o hospedeiro, outro efeito prejudicial como a dieta pode aumentar a proliferação de leveduras orais (KNIGHT & FLETCHER, 1971) e aumentar sua adesão ao epitélio (SAMARANAYAKE & MacFARLANE, 1982).

A atividade enzimática das proteinases (Saps- proteinase aspartil secretora) produzida por *C. albicans*, também é apontada como um indicador de cepas virulentas. Esse grupo de enzimas exibe ampla especificidade por substratos e são capazes de degradar muitas proteínas humanas encontradas nos sítios das lesões, como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucinas e IgA secretora (COLINA *et al.*, 1996; HUBE, 1996; RÜCHEL, 1984). A importância das proteinases secretadas como fatores de virulência de *C. albicans* tem sido amplamente investigada em modelos de candidíase (AGATENSI *et al.*, 1991; CASSONE *et al.*, 1995; DE BERNARDIS *et al.*, 1995; HUBE, 1996; SANGLARD *et al.*, 1997).

A frequência na produção de proteinases por cepas de *C. albicans* pode também variar bastante. No presente estudo, do total de cepas analisadas nos dois grupos, 94% foram positivas para produção dessa enzima e 6% demonstraram atividade enzimática negativa. Esses dados se aproximam daqueles obtidos por PENHA *et al.*, 2000 que analisando amostras de *C. albicans* da cavidade oral, verificaram que 100% dessas cepas eram produtoras de proteinases. CHAKRABARTI *et al.*, 1991 observando cepas de *C. albicans* de diferentes sítios anatômicos, encontrou uma variação de 44,4% a 84,6% de cepas com atividade enzimática positiva, dependendo do sítio de origem. Diferentes ecossistemas, com suas características específicas, podem conter fatores presentes nestes microambientes que limitem ou ampliem a expressão dessas enzimas, e conseqüentemente, determinem graus variáveis de atividade enzimática.

Os diferentes padrões de produção de proteinases por cepas de *C. albicans* provenientes de indivíduos pertencentes aos dois grupos, demonstraram que 98% e 89,4%

das cepas dos grupos livre de cárie e cárie ativo respectivamente possuem atividade enzimática positiva, enquanto que 10,6% obtiveram índice zero (negativa) no grupo carie ativo e 2% no livre de carie. Houve uma diferença estatisticamente significativa apenas para o índice 0 (zero) que foi maior no grupo de voluntários cárie ativos. Esses resultados, foram maiores do que os de CANDIDO *et al.*, 2000, que comparando a atividade enzimática dessa enzima em pacientes com lesões bucais características de candidose e clinicamente saudáveis, relataram que 66,7% e 68,7% foram positivas para proteinase respectivamente, dos grupos com e sem lesões, no entanto, concordam com nossos resultados, por não apresentar diferença na atividade enzimática entre os dois grupos estudados.

Em contraposição, WU *et al.*, 1996 reporta que *C. albicans* isoladas de pacientes com infecções por HIV, foram significativamente mais proteolíticas do que aquelas provenientes de sujeitos HIV negativos que apresentavam quelite angular. Do total de amostras analisadas, 100% e 56% demonstraram atividade enzimática positiva, para pacientes HIV positivos e negativos respectivamente e CASSONE *et al.*, 1995 ao correlacionarem proteinase e candidíase, demonstraram que isolados de *C. albicans* obtidos de pacientes com candidíase vaginal foram mais proteolíticos que os provenientes do mesmo sítio de portadores assintomáticos.

Ainda OLLERT *et al.*, 1995 analisando amostras da cavidade oral de voluntários HIV positivos e HIV negativos, constataram que todos os isolados foram proteolíticos, sendo que a atividade secretora (valores de PZ), revelou ainda que, isolados provenientes de HIV positivos eram mais proteolíticos em relação ao grupo controle.

Esses resultados, de modo geral, independe de pequenas variações, à semelhança de outras enzimas, e indicam que amostras patogênicas podem apresentar uma maior atividade enzimática, ou determinando grau de virulência em relação ao hospedeiro.

Assim a possibilidade de isolados de *Candida* spp passarem por alterações fenotípicas e fisiológicas, e secretarem enzimas virulentas, podem promover a esse organismo eucarioto, um grande potencial de adaptação. Mudanças fenotípicas podem contribuir para o sucesso de *Candida* spp em se transformar de comensal para patogênica, por gerarem uma diversidade necessária para adaptar-se aos diferentes ambientes e mecanismos de defesa do hospedeiro (RAY *et al.*, 1991). O dimorfismo dessas cepas, acontece devido a certas condições ambientais, como temperatura, pH, osmolaridade, anaerobiose e ou fatores químicos (MEKALANOS, 1992; HÖFLING *et al.*, 2001). Em relação a expressão dos fatores de virulência, não somente fatores dependentes do microrganismo estão envolvidos, mas também outros que são fortemente dependentes do hospedeiro, como diferenças específicas nos tecidos, formação de hifas, que variam entre os hospedeiros, devido a variações no meio ambiente, estado imunológico entre outros. Na verdade a patogenicidade de *C. albicans*, é um processo complexo, envolvendo diferentes estágios, aderência, invasão, fagocitose, colonização, danos as células do hospedeiro e outros. Todos os diferentes fatores, presentes nos tecidos ou órgãos, assim como a competição com outros microrganismos do mesmo nicho, pode influenciar a colonização, sobrevivência e o estado como comensal ou patogênico dessa levedura, induzindo a um aumento ou diminuição do perfil enzimático desses microrganismos.

A técnica da enzimotipagem tem sido sugerida por vários autores, como uma forma para biotipagem de *C. albicans* (CANDIDO *et al.*, 2000; SAMARANAYAKE *et al.*, 1984; PRICE *et al.*, 1982.) mas outros autores no entanto, indicam que a atividade enzimática pode ser apenas um indicador do potencial de virulência (CASSONE *et al.*, 1968; REMOLD *et al.*, 1968; HATTORI *et al.*, 1984).

A comparação da diversidade fenotípica e genotípica de *C. albicans* entre os indivíduos com e sem cárie foi um dos propósitos deste trabalho, já que existem poucas informações sobre o impacto da diversidade clonal de *C. albicans* e os fatores de virulência. Embora a enzimotipagem apresente algumas limitações e menor poder discriminatório, quando comparada com alguns métodos de tipagem molecular, o número de genótipo e fenótipos para cada grupo de amostragem se aproximaram, não demonstrando uma diferença estatisticamente significativa entre a média do número de perfis genotípicos e enzimáticos. Porém, a mesma linhagem clonal muitas vezes não demonstrou atividade enzimática semelhante.

Através da técnica de genotipagem por AP-PCR pode-se observar maior capacidade discriminatória para diferenciação das cepas em relação a enzimotipagem. O número de linhagens clonais obtidas pela AP-PCR nos dois grupos, revelou uma média maior no grupo cárie ativo em relação ao livre de cárie, embora estatisticamente não significativa.

Estes resultados estão parcialmente de acordo com os resultados de HANNULA *et al.*, 2000, que com o propósito de analisar diferenças clonais de *C. albicans* de pacientes

com e sem comprometimento imune, não verificou nenhuma diferença significativa na distribuição dos genótipos entre pacientes saudáveis e doentes, abrigando apenas um único genótipo de *C. albicans* por indivíduo. Em contraposição, nossos resultados demonstraram em alguns pacientes múltiplos genótipos.

XU *et al.*, 2000 usando a técnica de PCR “*fingerprinting*”, com 5 *primers* diferentes, também não encontraram diferença genética significante entre o número de genótipos entre dois grupos HIV positivo e negativo. Já DIAS-GERRA *et al.*, 1997 através da cariotipagem, encontraram uma grande diversidade clonal de *C. albicans*, entre isolados provenientes da orofaringe de voluntários HIV positivos que portavam candidíase. Do mesmo modo KAM *et al.*, 2002 analisando cepas comensais provenientes de diferentes sítios do organismo de indivíduos saudáveis, verificaram que um único hospedeiro pode portar múltiplas espécies ou múltiplos genótipos no mesmo, ou em diferentes sítios do corpo. Nesta linha de investigação, XU *et al.*, 1999, examinando os padrões de similaridade genética de cepas de *C. albicans* patogênicas em mulheres HIV positivas, grávidas saudáveis e HIV negativas, demonstraram nos três grupos diversidade genotípica, no entanto, não houve diferença significativa na média do número de linhagens clonais entre estes, independente das condições do hospedeiro, confirmando que um único hospedeiro pode ser colonizado por múltiplos genótipos da mesma espécie no mesmo sítio ou em sítios diferentes, indicando um processo dinâmico de colonização por leveduras em mulheres. Ainda HOWELL *et al.*, 1996 comparando a similaridade genética de *C. albicans* proveniente de 4 pacientes observaram a presença de mais de um genótipo em alguns indivíduos. As amostras foram comparadas por RFLP e por RAPD.

Por outro lado, nas pesquisas de BOERLIN *et al.*, 1996, isolados de *C. albicans* provenientes da orofaringe de pacientes saudáveis e com HIV, foram tipados por MLEE, mostrando que a maioria (exceto um paciente) portava um único clone de *C. albicans* na orofaringe.

Esses dados quando analisados em conjunto demonstram que, pode um único genótipo predominar em todos os sítios de um mesmo indivíduo (LOCKHART *et al.*, 1996; STEVENS *et al.*, 1990), alguns pacientes podem apresentar isolados com reduzida diversidade genética (HANNULA *et al.*, 2000; XU *et al.*, 2000; BOERLIN *et al.*, 1996) e outros pacientes ainda podem apresentar alterações na frequência de fenótipos e genótipos de *C. albicans* (DIAS-GERRA *et al.*, 1997; KAM *et al.*, 2002; XU *et al.*, 1999; HOWELL *et al.*, 1996), o que pode confirmar a existência de um processo dinâmico de colonização dessas espécies por um lado, ou a impossibilidade de se estabelecer correlação definidas pelos métodos ainda disponíveis.

Com o objetivo de se avaliar a presença ou não de cepas da mesma linhagem clonal entre os voluntários do grupo cárie ativos e livres de cárie, um representante de cada linhagem foi selecionado para a construção de dendogramas representativos de cada grupo de voluntários. Os dados obtidos demonstram que não houve nenhuma similaridade clonal ($S_{SM} = 1,0$) em indivíduos diferentes pertencentes ao mesmo grupo. Em contraposição SCHIMID *et al.*, 1999 usando a sonda Ca3 para analisar 266 isolados de *C. albicans* obtidos de infecções, provenientes de 12 regiões geográficas específicas, em 6 países, demonstraram que 37% destes isolados formavam um único *cluster* geneticamente homogêneo e o restante dos isolados foram geneticamente diversos. Este fato evidencia a

ocorrência de um genótipo geograficamente disseminado que age como um agente etiológico predominante em todas as formas de candidíase e em todas as categorias de pacientes.

Por outro lado, MEHTA *et al.*, 1999 analisaram 28 indivíduos sistemicamente saudáveis, pertencentes a 12 famílias em relação à presença de *C. albicans* proveniente da cavidade oral e das fezes, e a genotipagem dessas cepas através de DNA “*fingerprinting*”, demonstrou que diferentes famílias não compartilhavam as mesmas cepas, no entanto, dois ou mais membros da mesma família comumente as compartilham.

As crianças analisadas no presente estudo, não possuíam nenhum grau de parentesco, e não partilhavam do mesmo ambiente. Esse fato pode ser essencial para comprovar a diferença dos nossos resultados, com os obtidos por MEHTA *et al.*, 1999 e a concordância com os achados de DIAS-GUERRA *et al.*, 1997, KAM *et al.*, 2002; XU *et al.*, 1999 e HOWELL *et al.*, 1996.

Alguns autores têm demonstrado que um único “*cluster*” geneticamente relacionado à infecção por *Candida albicans*, usualmente predomina numa determinada população de pacientes e em um dado local geográfico (SCHIMID *et al.*, 1993, 1995 ; HELLSTEIN *et al.*, 1993; PFALLER *et al.*, 1998). A descoberta de um grupo de cepas de *C. albicans* geneticamente mais bem sucedidos que outros genótipos, numa população variada de pacientes e tipos de infecção, já foi relatada por vários autores e não foi uma surpresa, dada as evidências do modo clonal de reprodução de *C. albicans* (ODDS, 1988; CAUGANT & SANDVEN, 1993; TIBAYRENC, 1997). A reprodução clonal de um

organismo permite que ele se adapte ao ambiente, enquanto que linhagens clonais separadas podem evoluir, cada qual, para uma adaptação em um nicho ecológico particular, se tal nicho for estável. Em contraste a reprodução clonal deixa o organismo exposto a freqüentes alterações em seu meio ambiente, que então, responde com a evolução e seleção, baseado em sua adaptabilidade a uma variedade de nichos ecológicos. O tempo que a espécie *Candida albicans* pode permanecer ocupando um nicho particular em um paciente é limitado pelo tempo de vida e pelas alterações fisiológicas que ocorrem nesse indivíduo, as quais podem alterar esse microambiente. O sucesso a longo prazo de uma dada cepa, pode ser conseguido com uma ampla capacidade de adaptação (WHITTAM *et al.*, 1983; TIBAYRENC & AYALA, 1988; FOX *et al.*, 1996 HERMANUTZ & WEAVER, 1996; JACOBSEN & FORBES, 1997; SEMLITSCH *et al.*, 1997).

Embora diferentes pessoas possam abrigar o mesmo genótipo ou genótipos muito semelhantes, os dados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com a maioria dos estudos citados, os quais demonstram que cepas de diferentes locais do corpo de um mesmo indivíduo, possuem normalmente maior similaridade entre si, que aquelas provenientes de diferentes hospedeiros.

Esses dados quando analisados em conjunto, demonstram que os mecanismos que envolvem a patogenicidade dessa espécie, necessitam ainda maiores esclarecimentos, os quais serão provavelmente obtidos em pesquisas diversificadas, que permitam um maior entendimento das relações destes parasitas oportunistas com os hospedeiros. É preciso considerar que, a atividade enzimática expressa por esses microrganismos, é um elemento parcial de sua capacidade patogênica e que outros fatores já descritos, que determinam a

sua virulência, devem ser incluídos, o que torna o fenômeno ainda mais complexo. Há ainda poucos dados disponíveis em relação ao grupo cárie ativo e livres de cárie. Os resultados aqui obtidos, abrem perspectivas de novas pesquisas que vizem estabelecer e ampliar o conhecimento destas relações através do estudo de um maior número de amostras e o emprego de outras técnicas moleculares, que permitam um maior discernimento entre as condições genotípicas deste organismo e seu perfil enzimático.

7 CONCLUSÃO

Sob as condições experimentais utilizadas nesse estudo, é válido concluir que:

- a) As amostras de *C. albicans* provenientes da cavidade oral possuem uma evidente atividade enzimática para proteinases e fosfolipases.
- b) As amostras provenientes dos grupos cárie ativos e livres de cárie, não são diferentes em relação à produção de proteinases e fosfolipases.
- c) O perfil de produção enzimática independe das características genotípicas. O mesmo genótipo pode possuir diferentes perfis enzimáticos.
- d) Um único ou múltiplos genótipos de *C. albicans* estão presentes na cavidade oral de um indivíduo.
- e) Linhagens clonais semelhantes estão presentes no mesmo indivíduo e não entre indivíduos nos dois grupos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AGATENSI, L. *et al.* Vaginopathic and proteolytic *Candida* species in outpatients attending a gynaecology clinic. **J Clin Pathol**, London, v.44, n.10, p.826-830, Oct. 1991.

ALALUUSUA, S. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of *mutans streptococcus* in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.41, n.2, p.167-173, Feb. 1996.

ALY, R. *et al.* Correlation of human "in vivo" and "in vitro" cutaneous antimicrobial factors. **J Infect Dis**, Chicago, v.131, n.5, p.579-583, May 1975.

ANGIOLELLA, L. *et al.* Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimicrobials. **J Infect Dis**, Chicago, v.173, n.3, p.684-690, Mar. 1996.

ANSELL, G.B.; HAWTHORNE, J.N. **Phospholipids: chemistry, metabolism and function**. Amsterdam: Elsevier Publishing, 1964. p.152-174.

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

BARLOW, A.J.; CHATTAWAY, F.W. Observations on the carriage of *Candida albicans* in man. **Br J Dermatol**, Oxford, v.81, n.2, p.103-106, Feb. 1969.

* Baseada na NBR6023, de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

BARRETT-BEE, K. *et al.* A comparison os phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, Reading, v.131, n.5, p.1217-1221, May 1985.

BASU, R. *et al.* Incidence of oral *Candida* in oral cavity. **Bull Calcutta Sch Trop Med Hyg**, Calcuta, v.9, p.20-21, 1961.

BECKER, K. Molecular biological differentiation of yasts. **Mycoses**, Berlin, v.43, Suppl.1, p.40-47, 2000.

BENNETT, D.E.; MCCREARY, C.E.; COLEMAN, D.C. Genetic characterization of phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequence in *Candida* species other than *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.144, n.1, p.55-72, Jan. 1998.

BERDICEVSKY, I. *et al.* Oral *Candida* in children. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v.57, v.1, p.37-40, Jan. 1984.

BOERLIN, P. *et al.* Typing candida albicans oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. **J Clin Microbiol**, Washington, v.34, n.5, p.1235-1248, May 1996.

BORG-VON ZEPELIN, M. *et al.* The expression of the secreted aspartyl proteinases SAP4 to SAP6 from *Candida albicans* in murine macrophazes. **Mol Microbiol**, Oxford, v.28, n.3, p.543-554, May 1998.

BRASSART, D. *et al.* In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cell by Fuc α 1-2 G al β -bearing complex carbohydrates. **Infect Immun**, Bethesda, v.59, n.5, p.1605-1613, May 1991.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Histopathology, immunology and serology of oral yeasts infections. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.37-43, Feb. 1990.

BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; STENDERUP, A.; GRABOWSKI, M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.3, n.3, p.115-119, May 1975.

CANDIDO, R.C. ***Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos**. São Paulo, 1991. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo.

CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C. Enzymotiping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v.33, n.5, p.437-442, set./out. 2000.

CANGELOSI, G.A. *et al.* Oligonucleotide probes for mutans streptococci. **Mol Cell Probes**, London, v.8, n.1, p.73-80, Feb. 1994.

CANNON, M.L. *et al.* A clinical study of adhesive amalgam in pediatric dental practice. **Compend Contin Educ Dent**, Lawrenceville, v.20, n.4, p.331-334, Apr. 1999.

CANNON, R.D.; CHAFFIN, W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.10, n.3, p.359-383, 1999.

CASSONE, A. *et al.* Rays clearing a vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antobory-mediated resistance to vaginal reintection. **Infect Immun**, Bethesda, v.63, n.7, p.2619-2624, July 1995.

CAUGANT, D.A.; SANDVEN, P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis. **J Clin Microbiol**, Washington, v.31, n.2, p.215-220, Feb. 1993.

CHAKRABARTI, A.; NAYAK, T.; TALWAR, P. In vitro proteinase production by *Candida* species. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.114, n.3, p.163-168, June 1991.

CLANCY, C.J. *et al.* Production of phospholipase by various candidal species. *In: ANNUAL MEETING OF THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY FOR AMERICA*, 36., 1998, Denver. **Abstracts ...** Chicago: IDSA, 1998. Abstract 317.

COLINA, A.R. *et al.* Evidence for degradation of gastrointestinal mucin by *Candida albicans* secretory aspartyl proteinase. **Infect Immun**, Washington, v.64, n.11, p 4514-4519, Nov. 1996.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DARWAZED, A. M.; AL-BASHIR, A. Oral candidal flora in healthy infants. **J. Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.24, n. 8, p. 361-364, sep. 1995.

DAVENPORT, J.C. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. **Br Dent J**, London, v.129, n.4, p.151-156, Aug. 1970.

DE BERNARDIS, F. *et al.* Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. **Infect Immun**, Washington, v.63, n.5, p.1887-1892, May 1995.

DE BERNARDIS, F. *et al.* High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. **J Clin Microbiol**, Washington, v.37, n.5, p.1376-1380, May 1999.

DENNIS, E.A. *et al.* Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **FASEB J**, Bethesda, v.5, n.7, p.2068-2077, Apr. 1991.

DIAZ-GERRA, T. M. *et al.* Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. **J Clin Microbiol**, Washington, v.35, n.4, p.856-861, Apr. 1997.

DOUGLAS, L.J. *Candida* proteinases and candidosis. **Crit Rev Biotechnol**, Boca Raton, v.8, n.2, p.121-129, 1988.

DOYLE, J. J. T; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. Gaithersburg, V. 12 p. 13-18, 1990.

FOX, J.A. *et al.* Genetic structure of coexisting sexual and clonal subpopulations in a freshwater snail (*Potamopyrgus antipodarum*). **Evolution**, Lancaster, v.50, p.1541-1548, 1996.

FU, Y. *et al.* Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.143, n.2, p.331-340, Feb. 1997.

FUKAYAMA, M.; CALDERONE, R.A. Adherence of cell surface mutants of *Candida albicans* to buccal epithelial cells and analyses of the cell surface proteins of the mutants. **Infect Immun**, Washington, v.59, n.4, p.1341-1345, Apr. 1991.

GÁBRIS, K. *et al.*, Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. **Caries Res**, Basel, v. 33, n. 3, p. 191-195, May-Jun. 1999.

GHANNOUM, M.A. Potential role of phospholipases in virulence and Fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v.13, n.1, p.122-143, Jan. 2000.

GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, Abingdon, v.24, n.5, p.407-413, Oct. 1986.

GHANNOUM, M.A.; ABBU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, Berlin, v.33, n.6, p.265-282, June 1990.

GHANNOUM, M.A. *et al.* Modulation of interactions of *Candida albicans* and endothelial cells by fluconazole and amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.36, n.10, p.2239-2244, Oct. 1992.

GILFILLAN, G.D. *et al.* *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiolgy**, Reading, v.144, n.4, p.829-838, Apr. 1998.

HAGIHARA, Y. *et al.* Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.33, n.8, p.617-619, 1988.

HÄNEL, H.; MENZEL, I.; HOLZMANN, H. High phospholipase A activity of *Candida albicans* isolated from the intestine on psoriatic patients. **Mycoses**, Berlin, v.31, n.9, p.451-453, Sept. 1988.

HANNULA, J. *et al.* Age-related acquisition of oral and nasopharyngeal yeast species and stability of colonization in young children. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 176-182, Jun. 1999.

HANNULA, J. *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**, Copenhagen, v.15, n.4, p.238-244, Aug. 2000.

HANNULA, J. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.12, n.6, p.358-365, Dec. 1997.

HATTORI, A. *et al.* Isolation and chemical properties of acidic proteins in whole human saliva. **Shigaku**, Tokyo, v.71, n. 5, p.735-749, Feb. 1984.

HELLSTEIN, J. *et al.* Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strain of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. **J. Clin Microbiol**, Washington, v. 31, n. 12, p. 3190-3199, Dec. 1993.

HODSON, J.J.; CRAIG, G.T. The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. **Dent Pract Dent Rec**, Bristol, v.22, 8, p.296-301, Apr. 1972.

HOFLING, J.F. *et al.* Differentiation and numerical analysis of oral yeasts based on SDS-PAGE profiles. Influence of the culture media on the whole-cell protein extracts. **Braz J Biol**, São Carlos, v.61, n.3, p.507-516, Aug. 2001.

HÖFLING, J.F. *et al.* Salivary counts of *Cândida* species and byotypes in Brazilian children aged 6-8 year old having a socio economic background. **Acta Odontol Venez**, Cararas, v.37, n.2, p.1-11, 2000.

HOLMBERG, K.; FEROZE, F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD) – analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. **J Clin Lab Anal**, New.York, v.10, n.2, p.59-69, 1996.

HOLMES, A.R. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Ind Microbiol**, Amsterdam, v.15, n.3, p.208-213, Sept. 1995.

HOMMA, M.; CHIBANA, H.; TANAKA, K. Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**, Reading, v.139, n.6, p.1187-1193, June 1993.

HOMMA, M. *et al.* Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans*. **J Gen Microbiol**, Reading, v.138, n.3, p.627-633, Mar. 1992.

HOWELL, S.S., ANTHONY, R.M.; POWER, E. Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*. **Lett Appl Microbiol**, Oxford, v.22, n.2, p.125-128, Feb. 1996.

HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases. **Curr Top Med Mycol**, New York, v.7, n.1, p.55-69, Dec. 1996.

HUBE, B. Possible role of proteinases in *Candida* infections. **Rev Iberoam Micol**, Barcelona, v.15, p.68-71, 1998.

HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, Reading, v.147, n.8, p.1997-2005, Aug. 2001.

HUBE, B. *et al.* Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartic proteinases in *Candida albicans*. **Mol Microbiol**, Oxford, v.14, n.1, p.87-99, Oct. 1994.

HUBE, B. *et al.* Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. **Adv Exp Med Biol**, New York, v.436, p.339-344, 1998.

IBRAHIM, A.S. *et al.* Evidence implicating phospholipase as a virulence factor os *Candida albicans*. **Infect Immun**, Bethesda, v.63, n.5, p.1993-1998, May 1995.

JACOB, L. S. *et al.* Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infections. **J. Am Dent Assoc**, Chicago, v. 129, n. 2, p. 187-194, Feb. 1998.

JACOBSEN, R.; FORBES, V. E. Clonal variation in life-history traits and feeding rates in the gastropod, *Potamopyrgus antipodarum*: performance across a salinity gradient. **Funct Ecol**, Oxford, v.11, p.260-267, 1997.

JENKINS, W.M. *et al.* Nutricional deficiency in oral candidosis. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v.6, n.4, p.204-210, Aug. 1977.

JORGE, A.O.C. **Presença de Candida e de anticorpos Anti-Candida na cavidade bucal de pacientes com periodontite crônica do adulto**. São José dos Campos, 1995. Tese (Livre docência) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho.

JORGE, A.O.C. *et al.* Influência do uso de aparelho ortodôntico sobre a presença de *Candida albicans* na cavidade oral. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v.41, p.308-310, 1987.

KAM, A.P.; XU, J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diagn Microbiol Infect Dis**, Bethesda, v.43, n.1, p.19-28, May 2002.

KAMINISHI, H. *et al.* Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infect Immun**, Washington, v.53, n.2, p.312-316, Aug. 1986.

KLEINEGGER, C.L. *et al.* Frequency, intensity, species, and strains of oral *Candida* vary as a function of host age. **J Clin Microbiol**, Washington, v.34, n.9, p.2246-2254, Sept. 1996.

KNIGHT, L.; FLETCHER, J. Growth of *Candida albicans* in saliva: stimulation by glucose associated with antibiotics, corticosteroids, and diabetes mellitus. **J Infect Dis**, Chicago, v.123, n.4, p.371-377, Apr. 1971.

LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo: EPU-EDUSP, 1980. 190p.

LAMKIN, M.S.; OPPENHEIM, F.G. Structural features of salivary function. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, n.4, v.3/4, p.251-259, 1993

LANE, T.; GARCIA, J.R. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v.34, 5/6, p.217-220, May/June 1991.

LAY, K.M.; RUSSEL, C. *Candida* species and yeasts in mouth of infants from special care of maternity hospital. **Arch Dis Child**, London, v.52, n.10, p.794-796, Oct. 1977.

LEIDICH, S.D. *et al.* Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the patogenicity of *Candida albicans*. **J Biol Chem**, Baltimore, v.273, n.40, p.26078-26086, Oct. 1998.

LERNER, C.G.; GOLDMAN, R.C. Stimuli that induce production of *Candida albicans* extracellular aspartyl proteinase. **J Gen Microbiol**, Reading, v.139, n.7, p.1643-1651, July 1993.

LOCKHART, R.D. *et al.* Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with “sbstrain shuffling”: demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1 and CARE2. **J Clin Microbiol**, Washington, v.34, n.4, p.767-777, Apr. 1996.

LODDER, J. **The Yeasts**. Amsterdam: North Holland, 1970.

LOESCHE, W. J. **Cárie dental: Uma infecção tratável**. São Paulo: editora Cultura médica, 1993.

MacDONALD, F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. **Sabouraudia**, Oxford, v.22, n.1, p.79-82, 1984.

MACFARLANE, M.G.; KNIGHT, B.C.J.G. The biochemistry of bacterial toxins. I. Lecithinase activity of Cl. Welchii toxins. **Biochem J**, London, v.35, p.884-902, 1941.

MAFFEI, C. M. L. **Amostras de *Candida albicans*, isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem genotípica e fenotípica**. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

MAGEE, B.B. *et al.* The gene encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. **Infect Immun**, Bethesda, v.61, n.8, p.3240-3243, Aug. 1993.

MAGO, N.; KHULLER, G.K. Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, Oxford, v.28, n.5, p.355-362, 1990.

MARTIM, M.V.; LAMB, D.J. Frequency of *Candida albicans* serotypes in patients with denture – induced stomatitis and in normal denture wearers. **J Clin Pathol**, London, v.35, n.8, p.888-891, Aug. 1982.

MATTOS-GRANER, R. O. *et al.* Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community Dent Health**, London, v. 13, n. 2, p. 96-98, June. 1996.

McCULLOUGH, M.J.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellae*. **J Clin Microbiol**, Washington, v.37, n.2, p.417-421, Feb. 1999.

McLAIN, N.; DOLAN, J.W. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.143, n.11, p.3521-3526, Nov. 1997.

MEHTA, S.K. *et al.* Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. **Diagn Microbiol Infect Dis**, New York, v.34, n.1, p.19-25, May 1999.

MEKALANOS, J.J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. **J Bacteriol**, Washington, v.174, n.1, p.1-7, Jan. 1992.

MELO, A.S. *et al.* Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, The Hague, v.142, n.2, p. 57-66, 1998.

MEYERS, D.J.; BERK, S.R. Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. **Infect Immun**, Bethesda, v.58, n.3, p.659-666, Mar. 1990.

MICHAEL, L.P.; STEPHEN, A.K. Adherence of *Candida albican* to host cells. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v.129, n.2/3, p.103-114, June 1995.

MILAN, E.P. *et al.* Evaluation of the AUXACOLOR system for the identification of clinical yeast isolates. **Mycopathologia**, The Hague, v.137, n.3, p.153-157, 1997.

MOALIC, E. *et al.* The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries. **Caries Res**, Basel, v. 35, n. 2, p. 149-155, Mar-Apr. 2001.

MONOD, M. *et al.* Multiplicity of genes encoding secreted aspartec proteinases in *Candida* species. **Mol Microbiol**, Oxford, v.13, n.2, p.357-368, July 1994.

MORITA, M. C. *et al.* Prévalence de la carie dentaire chez de enfants brésilienns de 0 a 36 mois **J d'Odontostomatol Pédiatr**, v. 3, n. 1, p. 19-28, Mars. 1993.

NEGI, M. *et al.* Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: Substrate specificity. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v.83, n.1, p.32-36, July 1984.

NIEWERTH, M.; KORTING, H.C. Phospholipases on *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v.44, n.9/10, p.361-367, Nov. 2001.

NIIMI, M.; NIIMI, K.; CANNON, R.D. Temperature related expresión of the vacuolar aspartic proteinase (APR1) gene and β -N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene during *Candida albicans* morphogenesis. **FEMS Microbiol Lett**, Amsterdam, v.148, n.2, p.247-254, Mar. 1997.

ODDS, F.C. **Candida and candidosis**. Baltimore: Leicester Univ. Pr., 1979. p.352.

ODDS, F.C. **Candida and candidoses**: a review and bibliography. London: Bailliere Tindall, 1988.

ODDS, F.C. Problems in the laboratory assessment of antifungal activity. **Med J. London**, Postgrad, v.55, n. 647, p.677-680, Sept. 1979.

ODDS, F.C. Recent advances in the biology of *Candida*. **Ann Biol Clin**, Paris, v.45, n.5, p.553-557, 1987.

ODDS, F.C.; ABBOTT, A. A simple system for presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. **Sabouraudia**, Oxford, v.18, n.4, p.301-307, Dec. 1980.

OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeasts infections. **Acta Odont Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.71-74, Feb. 1990.

OLLERT, M.W. *et al.* Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factors, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. **J Clin Microbiol**, Washington, v.33, n.10, p.2543-2549, Oct. 1995.

OLLERT M.W. *et al.* Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. **Infect Immun**, Bethesda, v.61, n.11, p.4560-4568, Nov. 1993.

OLLILA, P. *et al.* Risk factors for colonization of salivary lactobacilli and *Candida* in children. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v. 55, n. 1, p. 9-13, Jan. 1997.

PARKER, J.C. *et al.* Candidosis: the most common postmortem cerebral mycosis in an endemic fungal area. **Surg Neurol**, Nova York, v.6, n.2, p.123-128, Aug. 1976.

PARKER, J.C. *et al.* Pathobiologic features of human candidiasis. A common deep mycosis of the brain, heart and kidney in the altered host. **Am J Clin Pathol**, Philadelphia, v.65, n.6, p.991-1000, June 1976.

PENHA, S.S. *et al.* Frequency and enzymatic activity (proteinase and phospholipase) of *Candida albicans* from edentulous patients, with and without denture stomatitis. **Pesq Odontol Brás**, São Paulo, v.14, n.2, p.119-122, abr./jun. 2000.

PFALLER, M.A. Epidemiology of nosocomial candidiasis: the importance of molecular typing. **J Infect Dis**, Chicago, v.4, n.4, p.161-167, Aug. 2000.

PIENIHÄKKINEN, K. Salivary lactobacilli and yeast in relation to caries increment. Annually repeated measurements versus a single determination. **Acta Odont Scand**, Oslo, v. 46, n. 1, p. 57-62, Feb. 1988.

PIENIHAKKINEN, K.; SCHEININ, A.; BANOCZY, J. Screening of caries in children through salivary lactobacilli and yeasts. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.95, n.5, p.397-404, Oct. 1987.

PRICE, M.F.; CAWSON, R.A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxford, v.15, n.2, p.179-185, July 1977.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxford, v.20, n.1, p.7-14, Mar. 1982.

PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase A and lypophospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxford, v.13, n.1, p.110-115, Mar. 1975.

RADFORD, J.R. *et al.* Caries-associated micro-organisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. **J Dent**, Bristol, v.28, n.5, p.307-312, July 2000.

RAMS, T.E.; SLOTS, J. *Candida* biotypes in human adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.6, n.3, p.191-192, June 1991.

RAY, T.L.; PAYNE, C.D. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein – supplemented cultures. **Infect Immun**, Bethesda, v.58, n.2, p.508-514, Feb. 1990.

RAY, T.L.; WUEPPER, K.D. Experimental cutaneous candidiasis in rodents. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v.66, n.1, p.29-33, Jan. 1976.

RAY, T.L.; PAYNE, C.D.; MORROW, B.J. *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidíasis. **Adv Exper Med Biol**, New York, v.306, p.173-183, 1991.

REMOLD, H.; FASOLD, H.; STAIB, F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.167, n.2, p.399-406, Oct. 1968.

RUCHEL, R. Properties of purified proteinase from the yeast *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v.659, n.1, p.99-113, May 1981.

RUCHEL, R. A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. **Zentralbl Bakteriol Microbiol Hyg [a]**, Stuttgart, v.257, n.2, p.266-274, July 1984.

RUCHEL, R.; BONING, B. Detection of candida proteinase by enzyme immunoassay and interaction of the enzyme with alpha -2- macroglobulin. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v.61, n.1, p.107-116, June 1983.

RUCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Oxford, v.20, n.3, p.233-244, Sept. 1982.

RUCHEL, R. *et al.* Proteinase. In: BENNETT, J.E.; HAY, R.J.; PETERSON, P.K. **New strategies in fungal disease**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1992. p.17-31.

RUSSEL, C.; LAY, K.M. Natural history of *Candida* species and yeasts in the oral cavities of infants. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.18, n.8, p.957-962, Aug. 1973.

RUSSEL, J.I. *et al.* Prediction of caries increment in Scottish adolescents. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.19, n.2, p.74-77, Apr. 1991.

SAARELA, M. *et al.* Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Arch Oral Biol**. Oxford, v. 41, n. 8-9, p. 821-826, Aug-Sep. 1996.

SAIKI, R.K. *et al.* Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. **Science**, Washington, v.239, n.4839, p.487-491, Jan. 1988.

SAIMAN, L. *et al.* Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v. 20, p. 1119-1124, Dec. 2001.

SALYERS, A.; WITT, D. Virulence factors that promote colonization. **ASM Press**, p.30-46, 1994.

SAMARANAYAKE, L.P. Host factors and oral candidosis. *In*: SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. (Ed.) **Oral candidosis**. London: Wright, 1990.

SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. The effect of dietary carbohydrates on the in-vitro adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells. **J Med Microbiol**, London, v.15, n.4, p.511-517, Nov. 1982.

SAMARANAYAKE, L.P. *et al.* Factors affecting the phospholipase activity of *Candida albicans* in vitro. **Sabouraudia**, Oxford, v.22, n.3, p.201-207, 1984.

SAMARANAYAKE, L.P. *et al.* Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.15, n.5, p.251-254, May 1986.

SANGLARD, D. *et al.* A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5 and SAP6 of *C. albicans* causes attenuated virulence. **Infect Immun**, Bethesda, v.65, n.9, p.3539-3546, Sept. 1997.

SANZ, P. *et al.* Random amplified polymorphic DNA as a typing method to differentiate *Candida albicans* strains. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v.27, p.97-107, 1996.

SATIB, F. Serum – proteins as nitrogen source for yeast – like fungi. **Sabouraudia**, Oxford, v.4, p.187-193, 1965.

SCHALLER, M. *et al.* In vivo, expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV – infected patients. **J Invest Dermatol**, Baltimore, v.112, n.3, p.383-386, Mar. 1999.

SCHALLER, M. *et al.* Secreted aspartic proteinase (SAP) activity contributes to tissue damage in a model of a human oral candidosis. **Mol Microbiol**, Oxford, v.34, n.1, p.169-180, Oct. 1999.

SCHEMMEL, R. A. *et al.* Influence of dietary disaccharides on mouth microorganisms and experimental dental caries in rats. **Arch Oral Biol**. Oxford, v. 26, n. 6, p. 435-441, 1982.

SCHMID, J. *et al.* Evidence for nosocomial transmission of *Candida albicans* obtained by Ca3 Fingerprinting. **J Clin Microbiol**, Washington, v.33, n.5, p.1223-1230, May 1995.

SCHMID, J. *et al.* Genetic similarity of *Candida albicans* strains from vaginitis patients and their sexual partner. **J Clin Microbiol**, Washington, v.31, n.1, p.39-46, Jan. 1993.

SEMLITSCH, R.D. *et al.* Competition among tadpoles of coexisting hemiclones of hybridogenetic *Rana esculenta*: support for the frozen niche variation model. **Evolution**, Lancaster, v.51, p.1249-1261, 1997.

SERHAN, C.N.;HAEGGSTROM, J.Z.; LESLIE, C.C. Lipid mediator networks in cell signaling; update and impact of cytokines. **FASEB J**, Bethesda, v.10, n.10, p.1147-1158, Aug. 1996.

SHERWOOD, J. *et al.* Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. **J Med Vet Mycol**, Oxford, v.30, n.6, p.461-469, 1992.

SHIMIZU, M.T. Enzimas histolísticas produzidas por leveduras do gênero *Candida*. **Rev Microbiol**, São Paulo, v.19, n.4, p.442-445, 1988.

SHIMIZU, M.T. *et al.* Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. **Mycoses**, Berlin, v.39, n.5/6, p.161-167, May/June 1996.

SHIMIZU, S. *et al.* Enzymatic determination of serumfree fatty acids: a colorimetric method. **Anal Biochem**, Washington, v.107, n.1, p.193-198, Sept. 1980.

SIO, J. O. *et al.* Oral candida: is dummy carriage the culprit? **Arch Dis Child**, London, v. 62, n. 4, p. 406-408, Apr. 1987.

SONO, E. *et al.* Comparison of secretory Acid proteinases from *Candida tropicalis*, *C. Parappilosis* and *C. albicans*. **Microb Immunol**, Tokyo, v.35, n.10, p.1099-1104, 1992.

SOUZA, E.M.B. *et al.* Aspectos morfofisiológicos, fatores de virulencia e sensibilidade a antifungicos de amostras de *C. albicans*, sorotipos A e B, isoladas em S. Paulo, Brazil. **Rev Microbiol**, São Paulo, v.21, p.247-253, 1990.

STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.3-10, Feb. 1990.

STEVENS, D.A. *et al.* Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlation with phenotype. **Rev Infect Dis**, Chicago, v.12, n.2, p.258-266, Mar./Apr. 1990.

TIBAYRENC, M. Are *Candida albicans* natural populations subdivided? **Trends Microbiol**, Cambridge, v.5, n.7, p.253-257, July 1997.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease:genetical, taxonomical and epidemiological significance. **Evolution**, Lancaster, v.42, p.277-292, 1988.

TOMITA, N. E. *et al.* Prevalência de cárie dentária em crianças na faixa etária de 0 a 6 anos matriculadas em creches: importância de fatores sócio-econômicos. **Rev Saúde Pública**, v. 30, n. 5, p. 413-420, Out. 1996.

WAGGONER-FOUNTAIN, L. A. *et al.* Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 22, n. 5, p. 803-808, May. 1996.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with random primers. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.18, n.24, p.7213-7218, Dec. 1990.

WHITE, T.C.; AGABIAN, N. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases: isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. **J Bacteriol**, Washington, v.177, n.8, p.5215-5221, Sept. 1995.

WHITTAM, T.S.; OCHMAN, H.; SELANDER, R.K. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci**, Philadelphia, v.80, n.6, p.1751-1755, Mar. 1983.

WILLIAMS, J.G. *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v.18, n.22, p.6531-6535, Nov. 1990.

WILLIAMSON, M.I.; SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. **J Med Vet Mycol**, Oxford, v.24, n.5, p.415-417, Oct. 1986.

WRIGHT, R.J. *et al.* A second gene for a secreted aspartate proteinase in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, Washington, v.174, n.23, p.7848-7853, Dec. 1992.

WU, T. *et al.* 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**, Edinburgh, v.44, n.4, p.311-316, Apr. 1996.

XU, J. *et al.* Clonal and Spontaneous Origins of Fluconazole Resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, Reading, v.38, n.3, p.1214-1220, Mar. 2000.

XU, J. *et al.* Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. **J Clin Microbiol**, Washington, v.37, n.12, p.3835-3843, Dec. 1999.

ZAUGG, C. *et al.* Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect Immun**, Bethesda, v. 69, n.1, p.405-412, Jan. 2001.

BIBLIOGRAFIA

CECCOTTI, H.M.; SOUSA, D.D. **Manual para normalização de dissertação e tese.** Piracicaba: FOP/UNICAMP, 1999. 56f.

FERRERIRA, A.B.H. **Novo dicionário da língua portuguesa.** 2.ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 1838p.

GALVÃO FILHO, S. **Dicionário odonto-médico inglês-português.** 2.ed. São Paulo: Santos, 2000. 976p.

SOLIANI, S.D.O.; SILVA, L. F. **Como escrever uma tese ou dissertação.** 3.ed. Piracicaba: FOP/UNICAMP, 1995, 53p.

FREITAS, H.R.; BIRMAN, E.G. Candidose bucal: aspectos clínicos e terapêuticos. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v.43, n.5, p.227-230, 1989.

PORTO, E. Micologia do gênero *Candida*. Caracteres gerais e bases para sua classificação. *In*: LACAZ, C.S. (Ed.) **Candidíases.** São Paulo: EPU-EDUSP, 1980. p.1-26.

ANEXOS

✧ MEIOS DE CULTURA

Meio Completo para Levedura

Peptona	10g
Extrato de Levedura	10g
Fosfato dibásico de potássio	0,5g
Glicose	20g
Agar	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL
Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.	

Yest Peptone Dextrose (YPD)

Extrato de Levedura	10g
Peptona	10g
Glicose	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL
Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.	

Yest Peptone Dextrose com glicerol a 15% (YPD-glicerol)

Yest Peptone Dextrose	700 ml
Glicerol	300 mL
Autoclavar por 15 minutos a 121 °C.	

Ágar Fosfolipase (com emulsão de ovo 50% em solução fisiológica)

Peptona	10g
Glicose	30g
Cloreto de Sódio	57,3g
Cloreto de Cálcio	0,55g
Ágar	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Emulsão de ovo a 50% (Egg Yolk enrichment-Laborclin) 100ml

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C. todos os itens acima citados, exceto a emulsão de ovo, que será acrescentada após autoclavação, quando o meio atingir uma temperatura de 45 °C.

Ágar Proteinase

Albumina do Soro Bovino (BSA-Fração V)	2g
Yest Nitrogen Base (w/o amino acids ammonium sulfate)	1,45g
Glucose	20g
Ágar	20g
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Autoclavar por 15 minutos a 121 °C , a Glucose, o Agar e a Água destilada. Quando o meio atingir uma temperatura aproximada de 45 °C, acrescentar BSA e YNB, previamente esterilizados em membrana 0,22 µm.

✧ **SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA**

Tampão de extração de DNA (para 12 amostras)

NaCl – 1.4 M	(3,36 ml de 5M)
Tris-HCL, pH 8,0, 100 mM	(1,2 mL de 1M)
EDTA, pH 8,0. 0,20 mM	(0,48 mL de 500 mM)
Polivinilpirrolidona (PVP-40), 1%	120 mg
CTAB, 2%	(2,4 mL de 10%)
Proteinase K, 100µg/mL	(60 µL de 20 mg/mL)
Beta-Mercaptanol, 0,2%	24 µL
Água Milli-Q	4,476 mL

Misturar todos os reagentes em recipiente previamente esterilizado.

Tampão de extração de DNA sem proteinase K (para 12 amostras)

NaCl – 1.4 M	(3,36 ml de 5M)
Tris-HCL, pH 8,0, 100 mM	(1,2 mL de 1M)
EDTA, pH 8,0. 0,20 mM	(0,48 mL de 500 mM)
Polivinilpirrolidona (PVP-40), 1%	120 mg
CTAB, 2%	(2,4 mL de 10%)
Beta-Mercaptanol, 0,2%	24 µL
Água Milli-Q	4,476 mL

Misturar todos os reagentes em recipiente previamente esterilizado.

✧ *SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA AP-PCR E ELETROFORESE*

Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 5X

Tris HCl	54g
Ácido Bórico	27,5g
EDTA (0,5M / pH 8,0)	20mL
Água destilada	q.s.p. 1000mL

Misturar 20 mL de EDTA com 500mL de água destilada e dissolver os outros reagentes. Adicionar a água até completar o volume de 1 litro. Acertar o pH final para 8,0 adicionando HCl.

Solução Trabalho – TBE 1X – Utilizada para preparar o gel de agarose e preencher a cuba eletroforética.

Diluir o tampão TBE 5X – $C_f \times V_f = C_i \times V_i$.

Corante Azul (Lowading buffer ou Tampão de corrida)

Bromofenol <i>Blue</i>	0,125g
Xilene Cyanol	0,125g
Glicerol	15mL
Água destilada	

Adicionar 20 mL de água destilada aos 15 mL de glicerol e misturar os solutos. Completar com água até atingir o volume final de 50 mL.

Solução TE (Tris-EDTA) 0,01M/pH 8,0 – Utilizada para diluição de *primers* e DNA (extração).

Tris HCl (1M / pH 8,0)	5mL
EDTA (0,5M / pH 8,0)	1mL
Água destilada	q.s.q 500 mL

Misturar os reagentes e completar com água destilada até atingir o volume final de 500mL. Acertar o pH final para 8,0 adicionando NaOH concentrado.

Brometo de Etídio (10 mg/mL) – Utilizado para corar o gel de agarose.

Brometo de Etídio 10 mg/mL 200µL

Água destilada 400mL

Misturar os reagentes. Concentração final da solução: 0,5 µg/mL.

✧ **TABELAS**

TABELA 24

Relação e código das amostras de *Candida albicans* isoladas da cavidade oral de crianças cárie ativas utilizadas nos experimentos

NºPaciente grupo e código da amostra	NºPaciente grupo e código da amostra	NºPaciente grupo e código da amostra	NºPaciente grupo e código da amostra
7-CA-S1	8-CA-Pal3	28-CA-PL2	33-CA-PL4
7-CA-S2	8-CA-Pal4	28-CA-PL3	33-CA-PL5
7-CA-S3	8-CA-Pal5	28-CA-PL4	33-CA-PL8
7-CA-S4	8-CA-Pal6	28-CA-PL5	35-CA-PL1
7-CA-L2	8-CA-PL1	28-CA-PL6	35-CA-PL2
7-CA-L3	8-CA-PL2	31-CA-B1	35-CA-L1
7-CA-L5	8-CA-PL3	31-CA-PL1	35-CA-S1
7-CA-L6	8-CA-PL4	31-CA-PL4	59-CA-L1
7-CA-Pal1	8-CA-PL5	31-CA-PL5	59-CA-L2
7-CA-Pal2	8-CA-PL6	31-CA-PL6	59-CA-PL2
7-CA-Pal4	15-CA-L1	31-CA-PL8	59-CA-PL3
7-CA-Pal5	15-CA-L2	32-CA-PL1	59-CA-PL5
7-CA-Pal6	15-CA-L3	32-CA-PL3	59-CA-PL7
7-CA-PL1	15-CA-L5	32-CA-PL4	59-CA-PL10
7-CA-PL2	15-CA-L6	32-CA-PL6	59-CA-Pal1
7-CA-PL3	15-CA-B5	32-CA-PL8	59-CA-Pal2
7-CA-PL4	15-CA-Pal1	32-CA-Pal1	59-CA-Pal3
7-CA-PL5	15-CA-Pal2	32-CA-Pal2	59-CA-Pal4
7-CA-PL6	15-CA-Pal3	32-CA-Pal7	59-CA-S1
8-CA-L1	15-CA-Pal4	32-CA-Pal8	63-CA-PL1
8-CA-L2	15-CA-Pal5	32-CA-Pal9	63-CA-PL2
8-CA-L3	15-CA-PL1	33-CA-B1	63-CA-PL3
8-CA-L4	15-CA-PL2	33-CA-Pal6	63-CA-PL5
8-CA-L5	15-CA-PL4	33-CA-PL1	63-CA-PL6
8-CA-L6	15-CA-PL5	33-CA-PL2	63-CA-PL7
8-CA-Pal2	28-CA-PL1	33-CA-PL3	63-CA-PL8

* Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário, grupo a que pertence (CA – Cárie ativo) e local de procedência, sendo: saliva (S), mucosa do palato (Pal), mucosa jugal (B), biofilme dental (PL) e dorso da língua (L).

TABELA 25
 Relação e código das amostras de *Candida albicans* isoladas cavidade oral de
 crianças livres de cárie utilizadas nos experimentos:

NºPaciente grupo e código da amostra	NºPaciente grupo e código da amostra	NºPaciente grupo e código da amostra	NºPaciente grupo e código da amostra
17-LC-L2	18-LC-L1	46-LC-PL2	56-LC-PL6
17-LC-L4	18-LC-L2	46-LC-PL4	56-LC-PL7
17-LC-B1	18-LC-L4	60-LC-PL1	56-LC-PL8
17-LC-B3	34-LC-PL1	60-LC-PL3	56-LC-PL9
17-LC-B4	34-LC-PL2	60-LC-PL4	56-LC-PL10
17-LC-B6	34-LC-PL3	60-LC-PL5	56-LC-Pal3
17-LC-Pal3	34-LC-PL4	60-LC-PL6	56-LC-Pal5
17-LC-Pal4	34-LC-PL5	60-LC-PL7	56-LC-Pal6
17-LC-Pal6	34-LC-PL6	60-LC-Pal1	56-LC-Pal7
17-LC-PL1	34-LC-PL7	60-LC-Pal2	56-LC-Pal8
17-LC-PL2	34-LC-PL8	56-LC-PL1	56-LC-Pal9
17-LC-PL3	34-LC-PL9	56-LC-PL3	56-LC-Pal10
17-LC-PL4	34-LC-PL10	56-LC-PL4	
17-LC-PL5	46-LC-PL1	56-LC-PL5	

* Os códigos das amostras correspondem ao número do voluntário, grupo a que pertence (LC – Livre de Cárie) e local de procedência, sendo: saliva (S), mucosa do palato (Pal), mucosa jugal (B), biofilme dental (PL) e dorso da língua (L).



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Secreção de proteinases por espécies de candida isoladas da cavidade bucal de crianças livre de cárie e cárie ativas", sob o protocolo nº **021/2002**, da Pesquisadora **Rita de Cássia Mardegan**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **José Francisco Höfling**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 06 de março de 2002

We certify that the research project with title "Proteinases secretion by Candida species isolated from the oral cavity caries free and caries activity children", protocol nº **021/2002**, by Researcher **Rita de Cássia Mardegan**, responsibility by Prof. Dr. **José Francisco Höfling**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, March 06 2002


Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. **Antonio Bento Alves de Moraes**
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP