

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**MAGDA ELIZABETH BAGLIONI GOUVÊA MONDIN**  
**Cirurgiã-Dentista**

**Prevalência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância,  
antes e após o tratamento odontológico**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Mestre em Biologia  
Buco-Dental, área de Microbiologia e Imunologia.**

**Piracicaba, SP**  
**2003**

**UNICAMP**  
**BIBLIOTECA CENTRAL**  
**SEÇÃO CIRCULANTE**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**MAGDA ELIZABETH BAGLIONI GOUVÊA MONDIN**  
**Cirurgiã-Dentista**

**Prevalência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância,  
antes e após o tratamento odontológico**

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção do título de Mestre em Biologia  
Buco-Dental, área de Microbiologia e Imunologia.**

**Orientador:**

Prof. Dr. José Francisco Höfling

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. José Francisco Höfling

Profª. Dra. Regina Maria Puppim Rontani

Profª. Dra. Denise M. Palomari Spolidório

**Piracicaba, SP**

**2003**

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCEP/03/06/03  
CPI, 28/05/2003  
Assinatura do Orientador

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	M745p
V	EX
TOMBO BC/	55173
PROC.	16-124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	08/08/03
Nº CPD	

CM00187141-0

BIB ID 296352

### Ficha Catalográfica

M745p Mondin, Magda Elizabeth Baglioni Gouvêa.  
 Prevalência de *Candida spp*, em crianças com cárie precoce na infância, antes e após o tratamento odontológico. / Magda Elizabeth Baglioni Gouvêa Mondin. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.  
 xxii, 144p. : il.

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

1. Odontopediatria. 2. *Candida albicans*. 3 Microbiologia. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da 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 21 de Janeiro de 2003, considerou a candidata MAGDA ELIZABETH BAGLIONI GOUVÊA aprovada.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2. Profa. Dra. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

3. Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

2003/01/21

## DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho,**

*À memória de,*

**Minha amada mãe, Maria Alice, que para sempre será uma inspiração para minha vida;**

**Minha querida irmã, Márcia Cristina, pelas doces lembranças de nossa infância;**

**Minha admirável avó, Alayde, cuja determinação, fé e coragem me ensinaram o valor da vida e a encontrar os caminhos para sempre recomeçar.**

*À minha família presente,*

**Meu marido, Mateus, cujo amor foi essencial nesses últimos anos que coincidiram com a elaboração deste trabalho;**

**Meu filho e melhor amigo, Gabriel, pelo seu amor incondicional que ilumina a minha vida e por sua paciência e resignação nos momentos em que estive ausente;**

**Meu filho Giovanni, que está a caminho, a quem espero, com amor.**

## AGRADECIMENTOS

*A Deus.*

*Em especial,*

**Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, pela oportunidade de ingressar na atividade científica sob sua segura orientação e pela confiança, apoio e incentivo, que foram essenciais na conclusão desse trabalho,**

*minha mais profunda e sincera gratidão.*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Diretor Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho e seu assessor, Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida.

À Coordenadoria da Pós-Graduação da FOP, por meio dos Coordenadores Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho e da Profa. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano e das secretárias Érica Alessandra Pinho e Sônia M. Lordello Arthur.

Aos professores da FOP, das disciplinas de graduação e em especial aos do Curso de Pós-Graduação em Biologia Bucal, pela positiva participação em minha formação.

À Profa. Dra. Regina Maria Puppim Rontani, cuja dedicação ao estudo científico e espírito investigador me incentivaram a ingressar nesse maravilhoso campo da ciência e pela participação na banca examinadora desta tese.

À Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, pelo incentivo e inspiração no início desta pesquisa.

À Dra. Denise M. Palomari Spolidório, pela participação na banca examinadora desta tese e pela sempre sincera demonstração de amizade.

Ao Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves, que me possibilitou crescer não só profissionalmente, como na vida pessoal.

Ao Prof. Dr. Celso Paulino da Costa, *in memoriam*, pelo seu imenso prazer em ensinar.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Anderson L. Teixeira e Wilma C. Ferraz, pelo constante auxílio prestado.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Heloísa M. Ceccotti, Marilene Girello, Doralice Nascimento Leal Romano, Aparecida C. da

Cruz, Lourdes F. Marin e Eliseo A. Bertti pela constante competência dos serviços prestados e pela amizade que cultivamos no decorrer desses anos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, Ana Cláudia B. Amoras Alves, Cássio V. Pereira, Edvaldo Rosa, Flávia Flório, Iriana Zanin, Janaína A. O. Rodrigues, Letícia, Marcelle M. Nascimento, Marcelo F.G. Boriollo, Marcelo H. Napimoga, Marlize Klein, Rafael N. Stipp, Regianne U. Kamiya, Rita C. Mardegan, Rosimeire T. Rosa, Wagner L. C. Bernardo, pelo convívio durante os anos de realização deste trabalho.

À amiga Angela Scarparo Caldo Teixeira pelas fotos deste trabalho e constante incentivo.

À amiga Valéria Silva dos Santos, estagiária do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, pelo auxílio na elaboração deste trabalho e sincera amizade.

Às crianças que gentilmente participaram deste estudo, possibilitando sua realização.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

*Meus sinceros agradecimentos.*

*“Assim que tenho visto, que não há coisa melhor do que alegrar-se o homem nas suas obras, porque essa é a sua porção; porque quem o fará voltar para ver o que será depois dele?”*

**Eclesiastes 3:23**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	1
LISTA DE TABELAS .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	5
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	13
2.1 Gênero <i>Candida</i> .....	13
2.1.1 Histórico .....	13
2.1.2 Taxonomia .....	14
2.1.3 Métodos de cultura e identificação das espécies .....	18
2.1.4 Epidemiologia .....	22
2.1.5 Fatores de virulência .....	24
2.2 Candidose bucal .....	27
2.3 A cavidade bucal como um <i>habitat</i> para <i>Candida spp.</i> .....	30
2.4 Colonização inicial em crianças por <i>Candida spp.</i> .....	32
2.5 Cárie dental em crianças durante a primeira infância .....	38
2.6 Presença de <i>Candida spp.</i> na cavidade bucal de indivíduos cárie-ativos .....	40
3. PROPOSIÇÃO .....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	51
4.1 Indivíduos selecionados .....	51
4.2 Divisão dos tempos experimentais .....	54
4.3 Exame clínico intrabucal .....	54
4.3.1 Avaliação do acúmulo do biofilme dental .....	55
4.3.2 Diagnóstico de cárie dental .....	55
4.4 Análise dos fatores comportamentais .....	56
4.5 Análise micológica .....	56
4.5.1 Coleta das amostras .....	56

4.5.2 Processamento do material .....	57
<b>4.6 Identificação das espécies de <i>Candida</i> .....</b>	<b>59</b>
4.6.1 Formação do Tubo Germinativo .....	60
4.6.2 Produção de clamidósporos e pseudo-hifas .....	60
4.6.3 Fermentação de carboidratos .....	61
4.6.4 Assimilação de carboidratos .....	61
4.6.5 Prova de termotolerância .....	62
<b>4.7 Cultura padrão .....</b>	<b>62</b>
<b>4.8 Conservação das cepas .....</b>	<b>62</b>
<b>4.9 Procedimentos referentes à ética em pesquisa em humanos .....</b>	<b>63</b>
<b>4.10 Análise estatística .....</b>	<b>63</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Exame intrabucal .....</b>	<b>65</b>
5.1.1 Índice <i>ceos</i> .....	65
5.1.2 Distribuição de cárie por grupo dentário .....	65
<b>5.2 Tempo experimental inicial (T1) .....</b>	<b>65</b>
5.2.1 Análise da frequência e densidade da colonização por <i>Candida spp.</i> .....	66
5.2.2 Distribuição intrabucal de <i>Candida spp.</i> .....	69
5.2.3 Identificação das espécies de <i>Candida spp.</i> .....	71
<b>5.3 Tempo experimental final (T2) .....</b>	<b>75</b>
5.3.1 Ocorrência de <i>Candida spp.</i> , antes e após o tratamento dental .....	75
5.3.2 Densidade da colonização intrabucal por <i>Candida spp.</i> , antes e após o tratamento dental .....	76
5.3.3 Distribuição intrabucal de <i>Candida spp.</i> nas crianças cárie-ativas, antes e após o tratamento dental .....	78
5.3.4 Distribuição intrabucal de <i>Candida spp.</i> nas crianças livres de cáries, antes e após o tratamento dental .....	79
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>

<b>6.1 Ocorrência de <i>Candida spp.</i> em crianças com cárie precoce na infância e livres de cárie .....</b>	<b>81</b>
<b>6.2 Análise da influência do tratamento dental e educação em higiene bucal na colonização da cavidade bucal por <i>Candida spp.</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ocorrência de <i>Candida spp.</i> em crianças com cárie precoce na infância e em crianças livres de cárie	....67
Figura 2	Densidade da colonização por <i>Candida spp.</i> em relação ao perfil de atividade de cárie em 32 crianças cárie-ativas de acordo com os grupos dentários acometidos por cárie	....69
Figura 3	Distribuição de <i>Candida spp.</i> em relação aos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva nas crianças cárie-ativas e livres de cárie, na fase pré-tratamento	....71
Figura 4	Distribuição intrabucal das espécies de <i>Candida</i> identificadas no grupo de crianças cárie-ativas e livres de cárie	....74
Figura 5	Ocorrência de <i>Candida spp.</i> nas crianças cárie ativas e livres de cárie antes do tratamento (T1) e após o tratamento (T2)	....75
Figura 6	Densidade da colonização intrabucal por <i>Candida spp.</i> nas crianças cárie-ativas e livres de cárie antes (T1) e após (T2) o tratamento dental	....76
Figura 7	Distribuição de <i>Candida spp.</i> em relação aos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva das crianças cárie-ativas antes e após o tratamento dental	....79
Figura 8	Distribuição de <i>Candida spp.</i> em relação aos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva das crianças livres de cárie antes e após o tratamento dental	....80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características iniciais da amostra selecionada	....53
Tabela 2	Relação das espécies, coloração e morfologia da cultura obtida no teste de crescimento em meio de cultivo cromogênico (CHROMagar Candida®)	....59
Tabela 3	Densidade do isolamento de <i>Candida spp.</i> em relação ao índice <i>ceos</i> no grupo de crianças cárie-ativas	....68
Tabela 4	Frequência das espécies de <i>Candida</i> isoladas da cavidade bucal das crianças cárie-ativas	....73
Tabela 5	Distribuição das crianças com cárie precoce na infância e livres de cárie de acordo com a densidade da colonização por <i>Candida spp.</i> apresentada antes e após o tratamento dental	....78
Tabela 6	Prevalência de <i>Candida spp.</i> em populações cárie-ativas	....81

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

*ceos* – número de superfícies de dentes decíduos cariadas (c), com extração indicada (e), e obturadas (o)

B – Mucosa jugal

L – Língua

n – Tamanho da amostra ou grupo

*p* – nível de significância

Max – Maxilar

Mand - Mandibular

q.s.p. – Quantidade suficiente para o volume final

SD – Desvio padrão

SDA – Agar Sabouraud Dextrose

UFC – Unidade formadora de colônia

± - Desvio padrão

Gl – Glicose

Sac – Sacarose

Ma – Maltose

La – Lactose

Xyl – Xylitose

TG – Tubo germinativo

h - hora

## RESUMO

A cárie precoce na infância, especificamente aquela associada ao consumo de carboidratos fermentáveis em mamadeira, popularmente conhecida como síndrome da cárie de mamadeira, representa um dos mais prevalentes problemas relacionados à saúde bucal de crianças durante a primeira infância e tem demonstrado ser um fator local que favorece a proliferação de *Candida spp.* na saliva e biofilme dental. O presente estudo teve por objetivo determinar a prevalência de *Candida spp.*, a espécie predominante e o padrão da colonização na cavidade bucal de um grupo de crianças com cárie precoce na infância e um grupo de crianças livres de cárie, relacionando aos aspectos clínicos (índice *ceos* e presença de lesões de cárie nos incisivos e/ou molares), além de investigar o efeito do tratamento dental sobre a prevalência desses microrganismos. Foram avaliadas inicialmente 64 crianças na faixa etária de 2 a 3 anos, incluindo 32 crianças livres de cárie (grupo GH ou Grupo controle) e 32 crianças com cárie precoce na infância (grupo GC), que não haviam recebido tratamento dental ou orientações sobre higiene bucal anterior ao início do estudo. Participaram da avaliação pós-tratamento dental, 31 crianças da amostra inicial, das quais 16 do grupo GC, que terminaram efetivamente o tratamento dental e 15 do grupo GH. Nos dias determinados para cada tempo experimental, pré e pós-tratamento dental, foram coletadas amostras intrabucais (mucosa jugal, dorso da língua, palato duro, biofilme dental e saliva) de todas as crianças para determinação da contagem de UFC/ml e identificação das espécies de *Candida.*, através dos testes de produção do tubo germinativo, produção de clamidósporos, termotolerância, crescimento em meio presuntivo CHROMagar® *Candida*,

fermentação e assimilação de carboidratos. Houve prevalência de *Candida spp.* em 71,87% das crianças com cárie precoce na infância, comparada a 6,25% das crianças livres de cárie, sendo que a contagem de UFC/ml foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) em crianças do grupo GC que apresentaram índice *ceos* elevado e presença de lesões de cárie nos incisivos e molares. A espécie predominante em ambos os grupos foi *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, com maior prevalência no biofilme dental de crianças do grupo GC e no dorso da língua de crianças do grupo GH. O tratamento dental restaurador diminuiu a contagem de UFC/ml de *Candida spp.* na cavidade bucal de crianças com cárie precoce na infância, porém não elimina completamente esses microrganismos.

## ABSTRACT

The early childhood caries, mainly associated with the consumption of sweetened fluids with fermentable carbohydrates, usually from a bottle, is one of the most significant oral health problems in children and it has been suggested to be a local factor to increase the saliva and dental biofilm incidence of *Candida spp.* The present investigation aimed to determine the prevalence of *Candida spp.*, the predominant specie and the colonization standard in the mouth of a group of children with early childhood caries and a group of free-caries children in connection with clinical factors (decay index – dmfs and presence of caries lesions), furthermore to investigate the effect of the dental treatment on oral *Candida* levels. A total of 64 children, who were 2 to 3 years old, participated of the initial sample collection. The children were distributed into two groups, the group GC included 32 children with early childhood caries and the group GH (or control group) included 32 caries-free children. Thirty-one children, remain from initial sample, 16 children from the group GC and 15 children from the group GH, participated of the second sample collection (post-treatment dental). The children had never received any previous dental treatment or received oral hygiene instructions. Oral sample was collected from saliva, tongue surface, cheeks, hard palate and dental biofilm at baseline (before dental treatment) and after dental treatment. After the characteristic growth, counting cells (CFU/ml) a subsequent identification of the species by germ tube test, microscopic morphology, growth on CHROMagar® *Candida* and carbohydrate assimilation and fermentation tests, were performed. The results showed *Candida spp.* was more frequently

isolated in children with nursing caries (71.87%) than those caries-free children (6.25%). *Candida spp.* was significantly more abundant when the index dmfs were greater and the caries lesions were present in the upper incisors and molars. The specie *C. albicans* was the most frequently detected oral yeast species, with *C. tropicalis* the next frequency, with prevalence on dental biofilm of children with nursing caries and on tongue of free-caries children. Children with early childhood caries and with oral *C. albicans* maintained carriage even after dental treatment, however the dental treatment reduces counting cells (UFC/ml) of oral *Candida spp.*

## 1. INTRODUÇÃO

Há um interesse crescente na ecologia bucal de microrganismos oportunistas, como as espécies de leveduras do gênero *Candida*, já que o crescimento em biofilmes, como o biofilme dental, tende a tornar esses microrganismos menos susceptíveis a ação de agentes antimicrobianos, com implicações nas doenças causadas por esses organismos, assim como a criação de reservatórios de infecção, re-infecção e possível causa de falhas nos tratamentos devido à resistência antimicrobiana (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999).

As espécies do gênero *Candida* podem ser constituintes do biofilme aderente a diversas superfícies da cavidade bucal, como a mucosa jugal, a mucosa do palato, a superfície da língua (CANNON & CHAFFIN, 1999) e a superfície dental (HODSON & CRAIG, 1972; ARENDORF & WALKER, 1980).

A cárie dental tem demonstrado ser um fator local que favorece a proliferação de *Candida spp.* na cavidade bucal (PIENIHÄKKINEN, 1988; RUSSEL *et al.*, 1987; DARWAZEH & AL-BASHIR, 1995), além da hipótese de lesões de cárie poderem atuar como um reservatório para esses microrganismos, em adição a outras regiões do trato-gastrointestinal, contribuindo para episódios recorrentes de candidose em indivíduos imunocomprometidos (HODSON & CRAIG, 1972; JACOB *et al.*, 1998).

Porém, até a presente data, não tem sido estabelecido se a correlação da proliferação de *Candida* em indivíduos cárie-ativos é indireta, devido ao crescimento de *Candida albicans* ser favorecido pelas condições intrabucais associadas à formação da cárie

ou se esse microrganismo desempenha algum papel na etiologia da cárie dental (MOALIC *et al.*, 2001).

Há poucos relatos sobre a colonização da cavidade bucal de crianças por *Candida spp.*, em relação à presença de cáries. Crianças durante a primeira infância apresentam maior predisposição à colonização da cavidade bucal por microrganismos oportunistas, devido ao sistema imune imaturo, à microbiota bucal normal não totalmente estabelecida e ao maior número de infecções sistêmicas a que estão sujeitas, o que ressalta a importância da intensificação dos estudos relacionados à proliferação de *Candida spp.* na cavidade bucal de crianças cárie-ativas, já que a progressão do microrganismo, de um inofensivo comensal para um patógeno virulento pode ser induzida por um número variado de fatores do hospedeiro de ordem sistêmica e local, capazes de alterar o meio, prejudicando a condição de comensalismo e favorecendo o desenvolvimento da doença a partir de infecção dita endógena (van BURIK & MAGEE, 2001).

Alguns trabalhos relatam a diminuição da prevalência de *Candida* na cavidade bucal de crianças, após o tratamento restaurador, em 90% (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999), e em 20% (STARR *et al.*, 2002). Porém, são poucos os estudos correlatos na literatura científica (MOALIC *et al.*, 2001). Considerando a maior prevalência de *Candida* em presença de cárie e sendo a ocorrência desta na dentição decídua um dos mais prevalentes problemas relacionados à saúde de crianças na primeira infância (SCHEMMEL *et al.*, 1982), foi avaliado, no presente estudo, a prevalência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância associada ao uso de mamadeira e o efeito do tratamento odontológico restaurador sobre a colonização desses microrganismos nos diversos sítios intrabucais (mucosa jugal, mucosa do palato, superfície da língua), biofilme dental e saliva.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Gênero *Candida*

#### 2.1.1 Histórico

A colonização da cavidade bucal por espécies do gênero *Candida* tem um antigo registro histórico. Hipócrates, já em 377 a.C., descreveu lesões orais que, de acordo com suas características clínicas, foram provavelmente causadas por *Candida* (ODDS, 1988).

Um dos primeiros fungos a serem estudados e reconhecidos como patógenos em infecções no homem, foi a levedura hoje conhecida como *Candida albicans*. Em 1839, LANGENBECK, conforme citado por LODDER (1971) demonstrou que a doença conhecida na língua inglesa como *thrush* (candidose pseudomembranosa aguda) era causada por este fungo e em 1842 uma descrição detalhada deste microrganismo foi publicada por GRUBY (LODDER, 1971).

No entanto, o progresso da micologia médica foi lento e esparso por quase um século, resultando em considerável multiplicidade de nomes para doenças fúngicas e seus respectivos agentes etiológicos. A primeira tentativa de classificar os fungos e leveduras da cavidade bucal foi realizada por KNIGHTON (1939). Estudando amostras de fungos isoladas da mucosa bucal de 148 indivíduos, este autor admitiu que grande proporção pertencia ao gênero *Candida*. Em 1950, LILIENTHAL obteve conclusão semelhante em estudo realizado com amostras de fungos isolados da saliva.

O gênero *Candida* foi consagrado como *nomen conservandum* no IX Congresso Internacional de Botânica, realizado em Montreal – Canadá, em 1959, substituindo antigas denominações utilizadas na micologia médica, como *Oidium* e *Monilia* (LACAZ, 1980).

### 2.1.2 Taxonomia

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, divisão Eumicetos (fungos verdadeiros) e à biologicamente diversa classe Deuteromicetos ou Fungos Imperfeitos (LACAZ, 1980). Este gênero compreende mais de 150 espécies, que formam um grupo heterogêneo, amplamente distribuído na natureza. São organismos eucariotos, diplóides simples, que não apresentam ciclo sexual. As espécies de importância médica têm vida saprofítica ou parasitária no organismo do homem (LACAZ, 1980). Entre essas, *Candida albicans* é a espécie de maior ocorrência em diversos sítios do corpo humano, mas outras espécies têm emergido como importantes patógenos em infecções humanas nas últimas décadas, incluindo *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida stellatoidea*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr* e *Candida dubliniensis* (STENDERUP, 1990; KAUFFMAN *et al.*, 2000). Entre estas, *C. dubliniensis* é uma espécie nova, originalmente descrita de candidoses orais severas em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), em Dublin, Irlanda (SULLIVAN *et al.*, 1995).

Espécies do gênero *Candida* apresentam crescimento em temperaturas que variam de 20°C a 38°C, sendo ideal entre 25°C a 28°C, e em pH de 2,5 a 7,5 (ODDS, 1988), embora um baixo pH, mesmo abaixo de pH2, favoreça sua proliferação

(ARENDRORF & WALKER 1980; ODDS & ABBOT, 1980; PARVINEN & LARMAS, 1981). As espécies de *Candida* são descritas como células globosas ou ovóides, cilíndricas ou alongadas, algumas vezes irregularmente formadas, em média com 3 x 5 µm de tamanho. Esses microrganismos geralmente apresentam reprodução por gemulação multipolar, apresentando ainda pseudomicélio diferenciado em pseudo-hifas e blastosporos (LACAZ, 1980). A produção de pseudomicélio é encontrada na maior parte das espécies e variedades. Algumas espécies apresentam micélio verdadeiro, com a possibilidade de formação de clamidósporos. Não são encontrados artrosporos, ascosporos, teliosporos e balistosporos (LACAZ, 1980).

Muitas espécies apresentam habilidade fermentativa e oxidativa, enquanto outras são estritamente oxidativas. Podem ser formados polissacarídeos extracelulares. Todos os carboidratos fermentados são assimilados, porém nem todas as espécies com habilidade assimilativa são também fermentativas. As espécies do gênero *Candida* são caracterizadas principalmente através da morfologia colonial, assimilação de carbono e capacidade de fermentação (LACAZ, 1980). As características fenotípicas diferenciais das principais espécies de *Candida* de importância médica estão relacionadas no ANEXO 1.

*C. albicans*, sob a forma de levedura, apresenta-se como células globosas, ovaladas ou alongadas, medindo aproximadamente 3,5 a 6 µm de largura por 6 a 10 µm de comprimento (LODDER, 1971). Os blastosporos estão geralmente reunidos em forma de cachos, junto aos elementos miceliais (LACAZ, 1980). Aproximadamente 95% dos isolados de *C. albicans* produzem tubo germinativo (PERRY & MILLER, 1988), uma propriedade também apresentada por *C. stellatoidea* (HALEY, 1971) e *C. dubliniensis*

(SULLIVAN & COLEMAN, 1998). Raros isolados de *C. tropicalis* também são capazes de formar tubo germinativo atípico (MARTIN, 1979). Em microcultivo, *C. albicans* forma pseudo-hifas, podendo apresentar hifas verdadeiras em cultivos mais velhos. As pseudo-hifas se caracterizam por serem abundantes e ramificadas. A hifa verdadeira possui vários septos, ao contrário da pseudo-hifa que os mostra em número escasso. A espécie *C. albicans* forma clamidósporos terminais globosos, de parede celular espessa, às vezes em grande número (LACAZ, 1980). A produção dessa estrutura é principalmente associada a *C. albicans*, mas novamente, essa propriedade é encontrada em *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis* e (SULLIVAN & COLEMAN, 1998) e raros isolados de *C. tropicalis* (HASENCLEVER, 1971). HASENCLEVER & MITCHELL (1961), conforme citado por Lacaz (1980), foram os primeiros a demonstrar dois sorotipos, A e B, entre isolados de *C. albicans*. Diferenças de sorotipos são baseadas em diferenças em mananas na parede celular de *C. albicans* (KOBAYASHI *et al.*, 1992).

*C. dubliniensis* tem sido designada como uma nova espécie de levedura, desde que compreende um cluster genético homogêneo, filogeneticamente distinto de outras espécies de *Candida* (SULLIVAN *et al.*, 1995). Fenotipicamente esta espécie é muito similar à *C. albicans* na produção de tubo germinativo e clamidósporos. *C. dubliniensis* desenvolve numerosos clamidósporos, que tendem a ocorrer em pares ou em trios, aderidos lateralmente às pseudo-hifas (SULLIVAN & COLEMAN, 1998). Diferentemente de *C. albicans*, *C. dubliniensis* não cresce ou apresenta escasso crescimento a 42°C e crescimento nulo a 45°C (PINJON *et al.*, 1998).

*C. stellatoidea* apresentam células ovais, às vezes alongadas, medindo entre 2,5-6  $\mu\text{m}$  x 5-12  $\mu\text{m}$ . A formação de pseudomicélio é bem desenvolvida e os blastosporos podem ser observados em cadeias mais ou menos verticiladas. Diferencia-se morfológicamente de *C. albicans* apenas pela escassa produção de clamidósporos que, quando presentes, encontram-se dispostos em cadeias de 2 a 3 células (LACAZ, 1980). Devido a alta homologia de DNA entre *C. albicans* e *C. stellatoidea*, esta última tem sido re-classificada como uma variante sacarose-negativa de *C. albicans* (McCULLOUGH *et al.*, 1999).

*C. tropicalis* apresenta células esféricas, ovais ou alongadas, medindo 2,5  $\mu\text{m}$  de largura por 3 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento. Em micro-cultivo, forma pseudo-hifas abundantes e ramificadas, com verticilos de blastosporos dispostos em cadeia simples, ramificadas ou irregulares. Podem apresentar hifas verdadeiras em cultivo (LACAZ, 1980).

*C. parapsilosis* apresentam células ovóides, curtas ou alongadas, medindo entre 2,5 a 4  $\mu\text{m}$  de largura por 2,5 a 9  $\mu\text{m}$  de comprimento. A formação de pseudomicélio é abundante e distintiva desta espécie, devido à formação de células gigantes que se diferenciam facilmente quando comparado ao pseudomicélio constituído de células menores, geralmente bastante ramificado, verificando-se em suas constrições poucos blastosporos dispostos em verticilos (LODDER, 1971).

*C. guilliermondii* apresentam células curtas, ovóides ou cilíndricas, medindo cerca de 2 a 4,5  $\mu\text{m}$  de largura por 2,5 a 7  $\mu\text{m}$  de comprimento. Os blastosporos apresentam-se em posição mais ou menos verticilada, nas constrições do pseudomicélio. A

formação do pseudomicélio é variável, sendo geralmente muito fino e ramificado (LACAZ, 1980).

*C. krusei* apresenta células ovóides e predominantemente cilíndricas, com tamanho variável, medindo aproximadamente 3 a 5 µm de largura por 6 a 20 µm de comprimento. Apresenta pseudomicélio constituído de células alongadas e delgadas, que se ramificam (LACAZ, 1980).

*C. glabrata* apresenta células ovóides que medem 2,0-4,0 x 3,0-5,5 µm de tamanho e não apresenta formação de pseudo-hifas (LACAZ, 1980).

### **2.1.3 Métodos de cultura e identificação das espécies**

Existe uma variedade de métodos utilizados na amostragem dos diversos sítios do corpo humano para a detecção da presença de *Candida*. Técnicas empregadas para o isolamento de *Candida* da cavidade bucal incluem o uso de esfregaços, de uma mecha de algodão (*swab*), (KLEINEGGER *et al.*, 1996), impressão em cultura (ARENDORF & WALKER, 1980), coleta da saliva total (BRAMBILLA *et al.*, 1992), enxaguatório bucal concentrado (SAMARANAYAKE *et al.*, 1986b) e biópsia da mucosa. Cada método apresenta vantagens e desvantagens, sendo a escolha da técnica de amostragem baseada principalmente na natureza da lesão a ser investigada (WILLIAMS & LEWIS, 2000). Devido à grande variação nas contagens de *Candida* na saliva durante o dia, o reconhecimento de um portador é mais efetivamente caracterizado em amostras colhidas pela manhã (WILLIAMSON, 1972).

Em meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), o mais freqüente meio utilizado para isolamento de *Candida* (ODDS, 1991), as colônias da maioria das espécies, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondii* apresentam coloração branca ou branco-amarelada, forma convexa, aparência lisa e brilhante, úmidas e cremosas, diâmetro em média de 4 a 8 mm, com odor característico (WILLIAMS & LEWIS, 2000). As colônias de *C. dubliniensis* podem sofrer mudança fenotípica e pequenas colônias podem ser observadas, principalmente após estoque prolongado (SULLIVAN & COLEMAN, 1998). Colônias de *C. stellatoidea* apresentam forma aproximada de estrela, e raras cepas de *C. guilliermondii* apresentam colônias opacas e rugosas. *C. krusei* apresenta colônias amareladas, com aspecto semi-opaco e superfície lisa ou rugosa. A pigmentação das culturas devido à produção de pigmentos carotenóides não é verificada (LACAZ, 1980). A diferenciação entre as espécies neste meio de cultura raramente é possível, sendo recomendado que seja utilizado, juntamente com este, um segundo meio diferencial (WILLIAMS & LEWIS, 2000). Exemplos destes incluem o ágar Pagano-Levin (PAGANO *et al.*, 1958) ou ágars cromogênicos comercialmente disponíveis, como o CHROMagar<sup>®</sup> *Candida* (CHROMagar<sup>®</sup>, Paris, France) (PFALLER *et al.*, 1996).

A diferenciação das espécies de leveduras pelo meio CHROMagar<sup>®</sup> *Candida* ocorre com base no contraste da cor das colônias, produzidas por reações de enzimas espécie-específica com um substrato cromogênico (WILLIAMS & LEWIS, 2000). Este meio diferencial tem sido avaliado em vários estudos quanto à sua utilidade na identificação de leveduras, sendo eficaz na identificação presuntiva de *C. albicans*, *C.*

*tropicalis* e *C. krusei*, apresentando alto nível de sensibilidade e especificidade (ODDS & BERNAERTS, 1994; BEIGHTON *et al.*, 1995; BAUMGARTNER *et al.*, 1996; BERNAL *et al.*, 1996; PFALLER *et al.*, 1996; KOEHLER *et al.*, 1999). Os valores para sensibilidade e especificidade obtidos para *C. albicans* estão entre >97-100% e 100%, respectivamente (BERNAL *et al.*, 1996; AINSCOUGH & KIBBLER, 1998).

Em meio líquido *C. krusei* forma uma película opaca e aderente ao tubo de ensaio, *C. tropicalis* forma um anel com bolhas de gás e sedimento e *C. albicans* não forma película ou anel, mas apenas sedimento (LODDER, 1971).

A produção de tubo germinativo é o método laboratorial padrão para identificar *C. albicans* (WILLIAMS & LEWIS, 2000). O teste envolve a indução de crescimento de hifas (tubos germinativos) de leveduras cultivadas em soro por 2-4 horas a 37°C. Na literatura, são relatados valores da ordem de 79,3% (YÜCESOY *et al.*, 2000) e 84,6% (AINSCOUGH *et al.*, 1998) para sensibilidade e 69,2% (YÜCESOY *et al.*, 2000) e 100% (AINSCOUGH *et al.*, 1998) para especificidade desse teste.

O perfil de assimilação de carboidratos por *Candida spp.* pode ser obtido por observação da zona de crescimento ao redor de discos impregnados com vários açúcares (galactose, glicose, sacarose, maltose, lactose, xylose, trealose entre outros) sobre meio basal. Por outro lado, os testes de fermentação são geralmente realizados em meio líquido e são baseados na demonstração da produção de ácido ou gás (WILLIAMS & LEWIS, 2000). A avaliação dos critérios fisiológicos para identificação de espécies de *Candida* pode ser realizada em laboratório através dos métodos convencionais ou através de sistemas de identificação disponíveis comercialmente, que são baseados no crescimento em presença de

carboidratos específicos, seguindo o mesmo princípio do teste de assimilação e fermentação convencionais, na suscetibilidade a agentes antifúngicos, ou no perfil de produção de enzimas. Além dos testes bioquímicos, existem sistemas de identificação baseados na suscetibilidade das cepas a produtos químicos ou corantes e provas imunológicas baseadas em antígenos citoplasmáticos e da parede celular das leveduras do gênero *Candida* (WILLIAMS & LEWIS, 2000).

Os métodos citados acima são baseados em características fenotípicas de cada espécie e podem estar sujeitos à variação na expressão dessas, induzindo identificação incorreta. Métodos baseados na variabilidade genética são potencialmente mais estáveis (MASLOW *et al.*, 1993). Dois métodos tradicionais para identificação de *Candida*, baseados na variação genética são as análises das diferenças eletroforéticas de cariótipos, que tem apresentado sucesso na diferenciação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (MONOD *et al.*, 1990; WICKES *et al.*, 1992) e estudos baseados no polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLPs – Restriction Fragment Length Polymorphisms), que demonstram que seqüências rDNA diferem entre as espécies de *Candida* (NIESTERS *et al.*, 1993) e tem sido útil na diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (SULLIVAN *et al.*, 1995). A reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction) oferece um sensível e rápido método para identificação de espécies de *Candida* (SAIKI *et al.*, 1992) e a amplificação por PCR do rDNA 18S é capaz de distinguir as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (MAGEE *et al.*, 1987) e *C. dubliniensis* (SULLIVAN *et al.*, 1995).

Os métodos disponíveis para identificação de espécies de *Candida* são numerosos e a escolha de um método é determinada principalmente pelo nível de

identificação requerida, aspectos clínicos, número total de amostras examinadas rotineiramente e recursos disponíveis no laboratório (WILLIAMS & LEWIS, 2000).

#### **2.1.4 Epidemiologia**

As espécies do gênero *Candida* constituem os fungos mais prevalentes na microbiota do corpo humano de indivíduos saudáveis ou imunocomprometidos. Essas espécies podem habitar diferentes sítios do corpo humano (ODDS, 1987), como a cavidade bucal, orofaringe, trato gastro-intestinal, dobras da pele, virilha e ânus de indivíduos saudáveis e canal vaginal e vulva de mulheres saudáveis (SOLL, 2002). Em análise da literatura sobre colonização por *Candida spp.*, realizada por ODDS (1988), em seu livro *Candida and Candidosis*, a colonização da cavidade bucal foi estimada em 26% em indivíduos saudáveis e em 47% em indivíduos doentes. A colonização da região ano-retal foi 26% e 34% em indivíduos saudáveis e doentes, respectivamente. A proporção de mulheres colonizadas por *Candida spp.* no canal vaginal foi estimada em 10% e 23%, em mulheres saudáveis e doentes, respectivamente. Em todos os sítios investigados do corpo humano, *C. albicans* representou a espécie predominante (~70%) seguida por *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (~7% cada) (ODDS, 1988).

O principal reservatório de *Candida spp.* no corpo humano é o trato gastro-intestinal, sistema que apresenta colonização por esses microrganismos em até 70% da população saudável e que é a principal fonte de infecções endógenas em pacientes imunocomprometidos (PITTET *et al.*, 1994). Registros da prevalência de leveduras na cavidade bucal humana de indivíduos saudáveis variam amplamente de 2% a 71%, com

média de 34% (ODDS, 1988), dependendo da população amostrada e da sensibilidade da técnica de amostragem empregada (ARENDORF & WALKER 1980, ODDS 1988). Em pacientes hospitalizados a prevalência de leveduras orais é cerca de 55%, variando de 13% a 76% (ODDS, 1988). As baixas contagens de *C. albicans* geralmente encontradas em indivíduos saudáveis, levam à conclusão de que os portadores possuem número inferior a 400 UFC/ml (STENDERUP, 1990).

*C. albicans* é a espécie predominante na microbiota bucal, constituindo 60 a 70% do total de leveduras isoladas (STENDERUP, 1990), enquanto as espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*, representam, cada uma, menos do que 10% (ODDS, 1988).

A presença de *Candida spp.* tem sido estimada em 5,7% (RUSSELL & LAY, 1973) em recém-nascidos, 49% na faixa etária de 3 a 5,5 anos e 65% na faixa etária de 6 a 12 anos (BERDICEVSKY *et al.*, 1984). KLEINEGGER *et al.* (1996) demonstraram variação na frequência, densidade, diversidade das espécies e cepas de *Candida* na colonização da cavidade bucal de 172 voluntários, divididos em grupos conforme a faixa etária. Para indivíduos na faixa etária de 0,5 a 1,5 anos, a frequência da colonização por *Candida spp.* foi da ordem de 44%, sendo que 47% apresentaram densidade de colonização entre 15 a 100 UFC e somente 6% apresentaram densidade de colonização > do que 500 UFC. No outro extremo de idade, em indivíduos com 60 anos ou mais, a frequência de colonização foi 59% e entre esses, 14% apresentaram alta densidade de colonização (> 500 UFC), sendo essa diferença significativa entre os extremos de idade. *Candida albicans* foi a espécie de maior prevalência em todas as faixas etárias. Dendogramas gerados de estudos com DNA *fingerprinting* não revelaram que linhagens da espécie *Candida albicans* tenha

especificidade por alguma idade. *Candida parapsilosis* esteve presente como comensal em 38% das crianças entre 0,5 – 1,5 anos de idade, declinando para 13% em crianças com idade entre 5-7 anos e para 5% em indivíduos com 30 anos de idade e mais velhos. *Candida guilliermondii* foi encontrada apenas na faixa etária de crianças de 0,5 a 1,5 anos (6%) e 5 a 7 anos (13%), *C. krusei* apresentou frequência similar nestas faixas etárias e ocorreu em 6% dos indivíduos com 60 anos de idade ou mais. *C. dubliniensis* foi diagnosticada somente na faixa etária de 5 a 7 anos (13%) (KLEINEGGER *et al.*, 1996).

Um hospedeiro pode estar colonizado com múltiplas espécies ou múltiplos genótipos da mesma espécie, no mesmo sítio anatômico ou em sítios diferentes, indicando um processo dinâmico de colonização por leveduras. Embora um único genótipo geralmente predomine em um dos sítios do mesmo indivíduo (LOCKHART *et al.*, 1996; STEVENS *et al.*, 1990).

### **2.1.5 Fatores de virulência**

O termo virulência descreve a capacidade de um parasita causar doença no hospedeiro, e expressa o grau de patogenicidade. Vale lembrar que patogênese envolve interação (e algumas vezes modificação) de fatores, tanto do hospedeiro quanto dos organismos infectantes, criando uma inter-relação complexa entre ambos. Isto é particularmente verdadeiro na patogênese fúngica. Não há um único fator que cause ou permita a estes microrganismos passarem de comensais a agentes de doenças superficiais ou invasivas em infecções humanas. Quando esses fatores geram danos ao sistema de defesa do hospedeiro, este passa, conseqüentemente, a ser vítima de sua própria microbiota

colonizante ou mesmo de microrganismos cuja patogenicidade até então era tida como baixa ou desconhecida (CUTLER, 1991).

Até certo ponto, uma combinação de mecanismos de virulência, parecem ser responsáveis para o desenvolvimento de candidoses, já que em estágios distintos da doença, diferentes fatores de virulência são expressos (CUTLER, 1991).

A capacidade de crescer em temperaturas fisiológicas, a 37°C, ou em casos de febre, a 38°C - 42°C, é um requisito importante para infecções sistêmicas. Acredita-se que a forma de hifa é invasiva e patogênica, enquanto a leveduriforme é comensal e não patogênica. No entanto, evidências sobre esse assunto são equívocas (van BURIK & MAGEE, 2001). Tigmotropismo, ou senso de contato, é uma característica que pode auxiliar as hifas a penetrarem nos tecidos (SHERWOOD *et al.*, 1992). *C. albicans* apresenta rápida mudança da morfologia colonial, quando sob estresse nutricional, que é acompanhada por mudanças na morfologia celular e, em alguns casos, de translocação cromossômica (SOLL, 1992), que pode afetar a expressão de muitos fatores de virulência e representar um mecanismo genético que permita a essa espécie adaptar-se às mudanças ambientais (CANNON, 1995).

*Candida albicans* e outras espécies de *Candida* secretam hidrolases, incluindo proteinases, fosfolipases, lipases, hexosaminidase e fosfomonoesterase (WHITE *et al.*, 1993; WU & SAMARANAYAKE, 1999; GHANNOUM, 2000) e produz metabólitos ácidos, incluindo ácidos carboxílicos de cadeia curta, e substâncias tóxicas, como nitrosaminas carcinogênicas (KROGH *et al.*, 1987). Atividade enzimática e metabólica

causam prejuízo às células do hospedeiro e subsequente podem interromper as funções celulares.

A aderência de espécies do gênero *Candida* às superfícies do hospedeiro é requerida para a colonização inicial e contribui para a sua persistência dentro do hospedeiro. Sem aderência, a taxa de crescimento de *C. albicans* (cerca de 1,5 H por geração em meio de crescimento rico) é insuficiente para manter a colonização na cavidade bucal ou no trato-gastrointestinal. A aderência é um fator importante durante a progressão do estado de colonização para infecção (van BURIK & MAGEE, 2001).

*C. albicans* possui múltiplas adesinas e talvez mais do que uma adesina reconheça o mesmo receptor de superfície no hospedeiro. As adesinas identificadas são, em sua maioria, manoproteínas (CANNON & CHAFFIN, 1999). Células de *Candida* aderem a diferentes células do hospedeiro, incluindo células do epitélio (FUKAYAMA & CALDERONE, 1991), do endotélio (EDWARDS *et al.*, 1992) e células fagocíticas (DIAMOND, 1993). Essas leveduras apresentam também capacidade para aderirem a hidroxiapatita (CANNON *et al.*, 1995) e a superfícies acrílicas de objetos de uso interno na cavidade bucal, como próteses e aparelhos ortodônticos (BERDICEVSKY *et al.*, 1980; ADDY *et al.*, 1982). A aderência a tais superfícies difere entre as espécies de *Candida* (BARRETT-BEE *et al.*, 1985; NAIR & SAMARANAYAKE, 1996). Existe uma hierarquia em relação à capacidade de aderência entre as espécies de *Candida*, sendo que as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*, mais presentes como patógenos em humanos, aderem a células do hospedeiro *in vitro* em maior extensão do que as espécies relativamente não patogênicas, como *C. krusei* e *C. guilliermondii*. A co-agregação de *Candida* com bactérias bucais

também parece ter um importante papel na colonização desta espécie e no desenvolvimento da candidose (BAGG & SILVERWOOD, 1986).

## 2.2 Candidose bucal

Infecções por *Candida* são denominadas “candidoses” ou “candidíases”, termos usados na literatura como sinônimos. A “International Society for Human and Animal Mycology” (1980) tem sugerido o termo “candidoses”, enquanto o “Council for International Organizations of Medical Sciences” (1982) recomenda o termo “candidíases”.

A mais freqüente classificação usada para descrever vários tipos de candidoses bucais foi realizada por LEHNER (1967). As categorias na classificação de Lehner incluem candidose pseudomembranosa aguda, candidose atrófica aguda, candidose atrófica crônica e candidose hiperplásica crônica. Esta última compreende candidoses orais crônicas, síndrome da candidose endócrina, candidose mucocutânea localizada crônica, e candidose difusa crônica (LEHNER, 1964). Em pacientes com AIDS, vários tipos clínicos podem ser observados (ODDS, 1997).

A candidose pseudomembranosa aguda é caracterizada por placas esbranquiçadas sobre a língua e superfícies mucosas orais (HOLMSTRUP & AXÉLL, 1990). Após a remoção da placa, a base mucosa eritematosa é exposta. Esta infecção apresenta prevalência de 5% a 20% na cavidade bucal de recém-nascidos e crianças nos primeiros meses de vida, sendo a infecção mais freqüente nesta população (LACAZ, 1980).

Em hospedeiros imunocomprometidos, candidoses bucais e não-bucais podem se desenvolver como uma infecção endógena ou também podem ocorrer devido à

substituição das cepas comensais originais por novos invasores (SCHMID *et al.*, 1992; POWDERLY *et al.*, 1993).

Dentre os fatores mais comuns que predisõem à colonização/infecção de espécies de *Candida* na cavidade bucal encontram-se: estados fisiológicos naturais, como a idade do indivíduo, estando estes com maior predisposição à colonização/infecção por *Candida* durante a infância e em idade avançada (LACAZ, 1980), mulheres no período gestacional, infecções pelo HIV, doenças neoplásicas, infecções severas ou crônicas (POWDERLY *et al.*, 1993); desordens endócrinas imunocomprometedoras, como diabetes melitus e hipotireoidismo (DOROCCA-BOBKOWSKA *et al.*, 1996, VITKOV *et al.*, 1999); fatores ambientais, incluindo alta ingestão de açúcares; uso de drogas antibacterianas (SCULLY, *et al.* 1994); estado nutricional alterado do hospedeiro, incluindo deficiência de ferro (FLETCHER *et al.*, 1975); interações com a microbiota bacteriana (BAGG & SILVERWOOD, 1986); diferenças no tecido do hospedeiro e fluidos corpóreos, presença de anticorpos específicos e componentes do soro (STENDERUP, 1990; BUDTZ-JÖRGENSEN, 1990). Entre os fatores locais predisponentes são citados: redução do fluxo salivar (PARVINEM & LARMAS, 1981); baixo pH salivar (ARENDORF & WALKER, 1980); respiração bucal, fatores mecânicos e iatrogênicos.(JORGE, 1997); tabagismo (ARENDORF & WALKER, 1980); uso de aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis (ADDY *et al.*, 1982) e próteses totais ou parciais (BERDICEVSKY *et al.*, 1980); múltiplas lesões de cárie na cavidade bucal (JACOB *et al.*, 1998; OLLILA *et al.*, 1997; PIENIHÄKKINEN, 1988) e higiene bucal deficiente, sendo raro a ocorrência de doença sem a presença de um ou mais desses fatores (STENDERUP, 1990).

Genótipos similares de *C. albicans* aparecem em indivíduos com e sem candidoses e de candidose bucal de indivíduos com e sem infecção pelo HIV (HELLSTÉIN *et al.*, 1993), o que é consistente com a hipótese de que candidoses não são causadas por uma única ou particular cepa virulenta de *C. albicans*, mas provavelmente por um defeito nos mecanismos de defesa do hospedeiro (WHELAN *et al.*, 1990).

Indivíduos colonizados por *Candida spp.* possuem numerosos mecanismos interdependentes para prevenir o estabelecimento da infecção. Proteção eficiente envolve componentes dos mecanismos imunológicos humoral específico e não-específico e mediados por célula (ROGERS & BALISH, 1980). Resposta imune mediada por células T são importantes na proteção contra candidoses cutâneas e infecções vaginais, mas a resistência a doenças sistêmicas é mais freqüentemente associada à resposta funcional fagocítica envolvendo neutrófilos e fagócitos mononucleares. Dados recentes indicam que a proteção imune é sítio-específica, o que é confirmado em estudos sobre candidose, em modelos animais, onde a proteção contra invasão sistêmica demonstra não resultar em proteção contra vaginite (FIDEL *et al.*, 1999).

Os agentes antifúngicos geralmente usados no tratamento das candidoses bucais são azoles: clotrimazole, miconazole, ketonazole, itraconazole, e fluconazole; polienos: nistatina e anfotericina B; e o desinfetante gluconato de clorexidina (BUDTZ-JÖRGENSEN & LOMBARDI, 1996). Os azoles inibem a enzima do citocromo P-450, lanosterol 14 alfa demethylase, em organismos fúngicos e bloqueiam a síntese de esteróides na membrana celular fúngica. Esta interferência leva ao aumento da permeabilidade da membrana celular (WHITE, 1997). Os polienos atingem o ergosterol na membrana plasmática fúngica e formam poros, levando ao aumento da permeabilidade (WHITE,

1997). A clorexidina pode inibir a aderência de espécies de *Candida* à mucosa oral e superfícies acrílicas (BUDTZ-JÖRGENSEN & LOMBARDI, 1996).

### **2.3 A cavidade bucal como um *habitat* para *Candida* spp.**

Devido à capacidade de aderência de *Candida* spp. a diversas superfícies presentes na cavidade bucal, esses microrganismos podem ser isolados de vários sítios bucais, com maior frequência do dorso da língua, mas também de outras mucosas orais, superfícies dentais, sulco gengival, tecido dental cariado, canal radicular e da saliva (ARENDRF & WALKER 1980, BORROMEO *et al.*, 1992, KLEINEGGER *et al.*, 1996; JACOB *et al.*, 1998).

Além de serem recuperadas da cavidade bucal saudável, leveduras também têm sido encontradas em cavidades bucais apresentando doenças dentais, assim como cárie de esmalte (HODSON & CRAIG, 1972; SZIEGOLEIT *et al.*, 1999), cáries de raiz (LYNCH & BEIGHTON, 1994) e doença periodontal (RAMS & SLOTS, 1991), mas o papel das leveduras na etiologia destas doenças permanece desconhecido.

*Candida* spp. adere pobremente à superfície dental limpa. No entanto, quando essa superfície é banhada pela saliva, esta é adsorvida a uma película que contém proteínas (amilase, laminina, albumina, imunoglobulinas, proteínas ricas em prolina, entre outras), glicosiltransferases e glucanos bacterianos, além de fatores séricos tais como fibronectina e fragmentos C3 (LAMKIN & OPPENHEIM, 1993), que podem promover a aderência de *C. albicans* aos dentes através de vários mecanismos (hidrofobicidade, ligação proteína-proteína). Outros fatores salivares, como lisozimas (TOBGI *et al.*, 1988), histatinas

(JAINKITTIVONG *et al.*, 1998), peroxidases (LENANDER-LUMIKARI, 1992) e lactoferrinas (NIKAWA *et al.*, 1993), inibem a colonização por leveduras, sendo que a redução da secreção salivar pode resultar em proliferação de leveduras devido à diminuição desses fatores. A saliva também contém nutrientes, como a glicose, que facilitam a proliferação de leveduras (KNIGHT & FLETCHER, 1971; SAMARANAYAKE *et al.*, 1986a).

As superfícies epiteliais também apresentam proteínas salivares aderidas, como a transglutaminase, uma enzima epitelial aderida à membrana que se liga covalentemente às proteínas ricas em prolínas (PRPs) ácidas. A distribuição desigual de *Candida albicans* na cavidade bucal presumivelmente reflete a distribuição e acessibilidade a receptores aos quais esse microrganismo pode aderir (CANNON *et al.*, 1995).

As espécies de *Candida* geralmente apresentam crescimento ótimo sob condições aeróbicas, mas também são capazes de crescer em elevada concentração de CO<sub>2</sub> no ar (WEBSTER & ODDS, 1986). Relatos da capacidade de *C. albicans* crescer em anaerobiose têm sido equívocos (KENNEDY, 1981; WEBSTER & ODDS, 1986). Alguns sítios bucais com baixa tensão de oxigênio, como o sulco gengival e bolsas periodontais podem não favorecer a proliferação de *Candida*. Anaeróbios crescem bem em baixa tensão de oxigênio (LOESCHE *et al.*, 1983), potencial de óxido-redução negativo e pH básico (EGGERT *et al.*, 1991), um ambiente desfavorável para o crescimento de leveduras. No entanto, *Candida spp.* tem sido isolada do sulco gengival e de bolsas periodontais (SLOTS & RAMS, 1991). Acredita-se que esses microrganismos são meramente circunstanciais nesses sítios, indicando colonização ou mesmo doença causada por *Candida spp.* em outras superfícies bucais. Por outro lado, é possível que mudanças ecológicas, como as que

ocorrem devido ao uso de antibióticos (RAMS *et al.*, 1990) ou doenças e terapias imunocomprometedoras (SLOTS & RAMS, 1991) possam levar ao supercrescimento subgengival de leveduras.

*Candida spp.* também interagem com outros microrganismos e produtos microbianos no complexo biofilme que cobre as superfícies bucais (HOLMES *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado que *Candida albicans* adere a bactérias como *Streptococcus viridans*, *Fusobacterium*, e *Actinomyces* (JENKINSON *et al.*, 1990; HOLMES *et al.*, 1996).

NEGRONI *et al.* (2002) avaliaram a colonização da mucosa bucal por *Candida* e a adesividade das cepas. Amostras foram obtidas do dorso da língua de 70 estudantes com média de idade de 23 anos, com cavidade bucal saudável. Destes, 21,42% foram positivos para *Candida*, sendo identificadas as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Em apenas um caso foi relatado o isolamento de duas espécies (*C. albicans* e *C. guilliermondii*) no mesmo indivíduo. A virulência foi determinada como capacidade de aderência ao biofilme ou formação de placa *in vitro* e hidrofobicidade. A aderência entre as cepas de *C. albicans* foi similar, entretanto diferenças significantes foram encontradas entre as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis* e entre *C. albicans* e *C. guilliermondii*.

#### **2.4 Colonização inicial em crianças por *Candida spp.***

Leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são habitantes comuns da cavidade bucal não apenas de adultos, como de crianças (DARWAZEH & AL-BASHIR, 1995; KLEINEGGER *et al.*, 1996; HANNULA *et al.*, 1999). A colonização assintomática por

*Candida* tem sido extensivamente estudada em adultos e os fatores predisponentes amplamente determinados. Em contraste, há poucos estudos em crianças durante a primeira infância, a maioria destes conduzidos em bebês internados em unidades hospitalares de cuidados especiais, sistemicamente comprometidos ou em neonatos prematuros. Geralmente as idades dos indivíduos examinados nesses estudos variam consideravelmente e alguns trabalhos têm considerado somente a espécie *C. albicans*, não relatando a presença de outras espécies, ou ainda considerando apenas “leveduras-semelhantes a fungos”, gerando resultados conflitantes (RUSSEL & LAY, 1973; LAY & RUSSEL, 1977; SHARP *et al.*, 1992).

As potenciais fontes de leveduras para a 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, devido à deglutição de gotículas da secreção vaginal durante a passagem pelo canal de parto. Entretanto, nestes casos, é necessário que a mãe apresente vulvovaginite blastomicética, comum no terceiro trimestre da gravidez, devido ao aumento do glicogênio nas células da mucosa vaginal, pela ação das estrinas. Estudos sobre transmissão horizontal e vertical têm demonstrado que cepas de *Candida* de origem materna e de neonatos são idênticas em 14% das vezes. A espécie mais freqüentemente encontrada em tais ocasiões é a *C. albicans*, não tendo sido observado que bebês possam adquirir outras espécies de suas mães durante o parto (WAGGONER-FOUNTAIN *et al.*, 1996).

Algumas horas após o nascimento, a cavidade bucal do recém-nascido adquire sua colonização pioneira e as possíveis fontes de microrganismos para a cavidade bucal deste são as mãos, pele e cavidade bucal dos pais ou de pessoas que cuidam do bebê, sendo

que a não observância dos princípios de biossegurança no ambiente hospitalar, associado à fragilidade dos mecanismos de defesa orgânica do recém-nascido, deixa-o exposto aos riscos de contaminação ainda no próprio ambiente hospitalar, sendo que bebês prematuros e de baixo peso são os mais expostos à contaminação (SAIMAN *et al.*, 2001).

SAIMAN *et al.* (2001), recuperaram 2989 leveduras isoladas de amostras das mãos de atendentes saudáveis de um centro de cuidados intensivos neonatal, 19% dos atendentes foram positivos para *C. parapsilosis* e 5% foram positivos para *C. albicans*. No entanto, entre 2157 bebês atendidos nesse centro, houve maior prevalência para *C. albicans* (14%), seguida de *C. parapsilosis* (7%) e outras espécies de *Candida* (3%). Segundo os autores, a principal fonte de *C. parapsilosis* para bebês internados em centros de cuidados intensivos são as mãos dos atendentes que têm contato direto com as crianças.

RUSSEL & LAY (1973) detectaram, através de um estudo longitudinal, a presença de espécies de *Candida* e leveduras em bebês, do dia do nascimento até completarem um ano de idade. As amostras foram coletadas através de *swab* da mucosa vestibular, mucosa jugal e sublingual da cavidade bucal. A prevalência de *Candida* foi de 5,7% nas primeiras horas após o nascimento, aumentando após o retorno das crianças para o ambiente domiciliar e atingindo 82% após quatro semanas, mas declinando para 50% em 1 ano. *C. albicans* representou a espécie predominante (56%) seguida em menor proporção por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. pseudotropicalis*. Estimativas do anticorpo sérico neonatal para *C. albicans* não teve correlação com a colonização oral inicial ou subsequente pelo organismo.

Alguns autores relatam a predominância de *C. parapsilosis* em amostras salivares de crianças saudáveis, positivas para leveduras, nas faixas etárias de 12 a 24

meses (HANNULA *et al.*, 1999) e 15 dias a 16 meses de idade (CONTRERAS *et al.*, 1994). Entretanto, em estudo realizado por KLEINEGGER *et al.* (1996), *C. albicans* foi a mais freqüente espécie detectada em crianças acima de dois anos de idade, sendo *C. parapsilosis* a segunda espécie mais freqüentemente encontrada.

MARTIN & WILKINSON (1983) isolaram leveduras da mucosa do palato duro e de um pool de saliva de 122 crianças, com média de idade de 9 anos e 10 meses, sendo 63 meninos e 59 meninas. Do total da amostra 71,3% foram positivos para leveduras. A colonização foi três vezes maior nas meninas do que nos meninos. As espécies isoladas foram *C. albicans* (71%), sendo 71,5% dessas do sorotipo A e 26,3% do sorotipo B; *Sacharomyces spp.* (19,7%) e *C. tropicalis* (8,6%).

A recuperação de leveduras da cavidade bucal na infância tem sido associada ao uso de chupeta, má-nutrição, infecções respiratórias, irrompimento do primeiro dente após os seis meses de idade, hábitos maternos como "esfriar" a comida da criança assoprando-a, e "limpar" a chupeta da criança com a boca, uso de mamadeira noturna contendo soluções açucaradas, múltiplas lesões de cárie na cavidade bucal, higiene bucal deficiente, terapia antibiótica, idade e sexo (SIO *et al.*, 1987; PIENIHÄKKINEN *et al.*, 1988; DARWAZEH & AL-BASHIR, 1995; OLLILA *et al.*, 1997; HANNULA *et al.*, 1999).

Segundo SIO *et al.* (1987), o hábito de usar chupeta pode perturbar o ecossistema microbiano da cavidade bucal, resultando em um aumento da recuperação de leveduras orais, quando comparado a crianças que não apresentam este hábito.

OLLILA *et al.* (1997) avaliaram a ocorrência de lactobacilos e *Candida* nas amostras salivares de 166 crianças na idade de 1-4 anos (média de 2,5 anos) em relação aos possíveis fatores de risco para a colonização desses microrganismos. Os fatores de risco

examinados foram hábitos de sucção, hábitos de alimentação, sintomas de infecções respiratórias e terapia antibiótica, ao tempo da amostragem. Lactobacilos ocorreram em 18% das amostras salivares das crianças e *Candida* em 24%. Houve forte associação entre a ocorrência de lactobacilos e o uso de chupetas e terapia antibiótica. A associação entre teste positivo para *Candida* e uso de chupeta também foi significativa. O uso de mamadeira noturna apresentou menor influência sobre a colonização por *Candida* do que o uso de chupeta. A associação entre uso de chupeta e mamadeira noturna aumentou a prevalência de *Candida* em crianças menores de dois anos de idade. Os autores sugerem que o uso de chupeta aumenta a ocorrência salivar de lactobacilos e *Candida* em crianças.

DARWAZEH & AL-BASHIR (1995) investigaram semiquantitativamente a colonização assintomática da cavidade bucal por *Candida* em uma população de bebês saudáveis (206), sendo 115 (55.8%) meninos e 91 (44.2%) meninas, entre 2 a 11 meses de idade, determinando sua relação com a idade, sexo, padrão alimentar e uso de chupeta. A relação entre a história de candidose vaginal materna e colonização da cavidade bucal dos bebês também foi investigada. Foram coletadas amostras do dorso da língua, mucosa bucal e palato de todas as crianças. A densidade das leveduras foi estimada como baixa (< 10 colônias), moderada (entre 11 e 50 colônias) ou alta (> 50 colônias). Espécies de *Candida* foram isoladas de 48% dos bebês, sem relação significativa com a idade, sexo ou entre bebês que mamavam no peito materno ou em mamadeira. Similarmente, mães com história de candidose vaginal, não apresentaram relação significante com a colonização bucal das crianças por *Candida*. Quando a densidade do isolamento de *Candida* foi comparada entre um grupo que usava chupeta e outro que não usava, houve alta proporção de isolados (> que 50 colônias) no grupo que utilizava chupeta, embora não significativa ( $p=0.22$ ).

*Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada (30,6%), seguida por *Candida parapsilosis* (5,8%). O que é confirmado por outros estudos em bebês (RUSSEL & LAY, 1973; LAY & RUSSEL, 1977; SHARP, 1992; MANNING, 1985). Outras espécies recuperadas foram: *C. pseudotropicalis* (4,8%), *C. tropicalis* (2,4%), *C. krusei* (1,4%), *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. cerevisiae* (1% cada). Isolados de *C. albicans* e *C. parapsilosis* foram encontrados simultaneamente em dois indivíduos.

HANNULA *et al.* (1999) determinaram a ocorrência e estabilidade da colonização bucal por diferentes espécies de *Candida* de 40 crianças saudáveis durante 22 meses, nas idades de 2, 6, 12, 18 e 24 meses. Amostras salivares das mães foram coletadas na primeira coleta das crianças (aos 2 meses) para determinar o papel da mãe como possível fonte de leveduras para a criança. Leveduras foram recuperadas pelo menos uma vez em 43% (17/40) das crianças até a idade de 2 anos; 28% (11/40) foram positivas para leveduras em múltiplas ocasiões de amostragem. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na frequência da recuperação de leveduras em diferentes idades (18% de crianças positivas com idade de 2 meses, 13% aos 6 meses, 20% aos 12 meses, 20% aos 18 meses e 13% aos 24 meses). *Candida parapsilosis* foi isolada em 55% (18/33) das crianças levedura-positivas, e predominou nas idades de 12 a 24 meses. A mesma espécie de levedura raramente foi detectada em amostragens sucessivas. Das mães, 50% (20/40) apresentaram leveduras. *C. albicans* foi recuperada de 95% (19/20) das mães levedura-positivas e *C. parapsilosis* de nenhuma das mães. Somente 35% (7/20) dos pares de mãe/criança foram positivos para leveduras e desses, 71% (5/7) apresentaram a mesma espécie de levedura (*C. albicans*), mas somente 3 destes pares (60%) apresentaram perfis de AP-PCR dos isolados de leveduras idênticos, sugerindo possível transmissão. Os autores

sugerem que em contraste com a colonização bucal por *Candida spp.* em adultos, a colonização em crianças parece ser inconsistente, sugerindo que estes são colonizadores transitórios nesta população ou que a ocorrência de *Candida* em amostras bucais de crianças com pouca idade possa ser subestimada devido às técnicas de amostragem empregadas.

Segundo RUSSELL & LAY, 1973, mudanças na prevalência de leveduras orais ao longo da primeira infância ocorrem devido às mudanças simultâneas no desenvolvimento da microbiota bucal.

## **2.5 Cárie dental em crianças durante a primeira infância**

A cárie dental é considerada uma doença infecciosa e multifatorial. Os estreptococos do grupo mutans, principalmente *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, 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 crianças durante a primeira infância (SCHEMMEL *et al.*, 1982). A chamada “cárie de mamadeira” (na língua inglesa geralmente denominada *nursing bottle caries*, *baby bottle syndrome*, *milk bottle syndrome* ou *baby bottle tooth decay*) é a forma mais comum de manifestação da cárie rampante em crianças muito jovens e resultam basicamente da interação de três variáveis: (1) colonização prévia das superfícies dentárias por microrganismos patogênicos, o que geralmente ocorre durante a infância (CAUFIELD *et al.*, 1993); (2) presença de carboidratos fermentáveis que os

microrganismos metabolizam a ácidos orgânicos e que neste caso são oferecidos à criança através de mamadeiras contendo leite açucarado, ou qualquer outra solução rica em açúcares, várias vezes ao dia, entre as refeições principais, inclusive durante a noite; (3) superfícies dentais susceptíveis a desmineralização ácida. Concomitantemente à presença dessas variáveis, o fator tempo apresenta papel preponderante na progressão da doença em relação à frequência e quantidade de exposição à dieta cariogênica e duração do hábito deletério, que afetam a severidade das lesões e o número de dentes envolvidos (RIPA *et al.*, 1988). DERKSON & PONTI *et al.* (1982) relataram que crianças com cárie de mamadeira praticam o hábito de mamar cerca de 8,3 h/dia comparado com 2,2 h/dia para crianças sem a doença. Podem também estar associados à doença, hábitos como adoçar chupetas com mel, açúcar ou xaropes, uso da mamadeira por tempo prolongado, além dos 12 meses de idade (RIPA, 1988) e ausência de higiene adequada. À noite, o fluxo salivar é fisiologicamente reduzido ou praticamente nulo, ocorrendo estagnação de carboidratos no biofilme dental, por horas seguidas.

Os primeiros sinais clínicos da cárie precoce na infância, especificamente associada ao uso de mamadeira, são caracterizados por presença de uma “mancha branca” opaca (lesão cariosa subsuperficial, pré-clínica, desmineralizada) acompanhando a linha da gengiva na superfície vestibular dos incisivos decíduos superiores. Se o processo não for interrompido, as lesões evoluem para cavitação e os próximos dentes a serem atacados são os primeiros molares superiores e inferiores decíduos, seguidos pelas faces vestibulares dos caninos decíduos e oclusais dos segundos molares decíduos. Nesta fase, provavelmente já foram destruídas as coroas dos dentes anteriores superiores decíduos. A característica

clínica da cárie de mamadeira constitui-se na ausência de lesões nos incisivos inferiores decíduos (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996; RIPA *et al.*, 1988).

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 a 2 anos e 26% na faixa etária entre 3 a 4 anos (TOMITA *et al.*, 1996). Na cidade de Piracicaba – SP, em estudo realizado com 322 crianças entre 6 e 36 meses de idade, observou-se uma prevalência de cárie em 0%, 3%, 14%, 38% e 48,5%, nas faixas etárias de 6 a 12 meses, 13 a 18 meses, 19 a 24 meses, 25 a 30 meses e 31 a 36 meses, respectivamente (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996).

## **2.6 Presença de *Candida spp.* na cavidade bucal de indivíduos cárie-ativos**

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

Estudos *in vitro* têm confirmado o alto potencial acidogênico de *C. albicans* (SAMARANAYAKE *et al.*, 1983; SAMARANAYAKE, 1986a). Os ácidos produzidos por *C. albicans* são acetato, piruvato, formato e propionato, que mostram citotoxicidade direta. No entanto, é consenso que a cariogenicidade depende não somente do pH terminal, mas também de vários fatores, incluindo a capacidade do microrganismo em colonizar a superfície dental (CLARKSON, 1987). KAMINISHI *et al.* (1986) caracterizaram uma enzima colagenolítica produzida por este microrganismo capaz de desnaturar o colágeno da

dentina humana. SEN *et al.* (1997) observaram através de microscopia eletrônica de varredura, que as hifas de *C. albicans* podem penetrar em micro-rachaduras na superfície dental, migrando para o interior dos túbulos dentinários. No entanto, este comportamento ecológico de *C. albicans* deve ser investigado em relação às condições *in vivo*.

Apesar do considerável volume de pesquisas sobre a cárie, há poucos registros sobre *Candida* na microbiota do biofilme dental (ARENDORF & WALKER, 1980; RAMS & SLOTS, 1991; COULTER *et al.*, 1993). Existe a hipótese de que se uma pequena quantidade de leveduras for incorporada ao biofilme dental ou ao tecido dental cariado, estes poderiam servir como reservatórios, junto a outras regiões do trato gastro-intestinal, para episódios recorrentes de candidose oral em indivíduos imunocomprometidos (JACOB *et al.*, 1998). Uma periculosidade adicional pode haver em crianças com cárie precoce na infância na presença de leveduras, particularmente aquelas com comprometimento do sistema imune, considerando os problemas sistêmicos desenvolvidos em função da cárie em crianças na primeira infância, e que podem ser agravados por esses microrganismos patogênicos considerados oportunistas na cavidade bucal (HODSON & CRAIG, 1972; DARWAZEH & AL-BASHIR, 1995; MARCHANT *et al.*, 2001).

A recuperação de *Candida* de indivíduos cárie-ativos tem sido extensivamente estudada em portadores de doenças imunocomprometedoras, incluindo diversas síndromes, AIDS, diabetes e câncer, já que essa população sofre freqüentemente 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 relacionaram o saprofitismo bucal por *Candida spp.* e o estado de saúde dental em indivíduos saudáveis.

HODSON & CRAIG (1972) avaliaram a prevalência de microrganismos com aparência morfológica semelhante a *C. albicans* em crianças com cárie, na faixa etária de 3 a 6 anos, particularmente do tipo associado com o uso de chupeta embebida em substâncias açucaradas e aleitamento artificial. Este grupo de crianças apresentava pobre higiene bucal e alta incidência de cáries. Adicionalmente, os autores investigaram histologicamente a presença de leveduras em 30 cavidades de cárie de dentes extraídos dessas crianças. A recuperação de leveduras foi de 56% (18/32) e 90% (27/30) no biofilme dental e cavidades de cárie, respectivamente. As crianças cárie-ativas foram comparadas com um grupo livre de cáries, sendo que a incidência de leveduras no biofilme dental do primeiro grupo foi quase o dobro da apresentada no grupo livre de cáries. Embora a amostra tenha consistido de um número pequeno de crianças, em um estudo piloto, os resultados sugeriram que uma alta incidência de leveduras pode ser esperada em crianças com muitas lesões de cárie. Segundo os autores, a influência de lesões de cárie sobre a proliferação de leveduras na cavidade bucal parece ser maior do que o alto consumo de doces e o uso de chupeta pelas crianças.

WETZEL *et al.* (1993) relacionaram a síndrome da cárie de mamadeira com o aumento da presença de *Candida albicans* isolada da saliva e de material cariado de 46 crianças entre 23 e 77 meses de idade. Segundo os autores, o hábito do uso da mamadeira que se estenda por tempo superior aos 12 meses de idade, leva não somente à problemática da doença cárie, mas também à mudanças patológicas na microbiota bucal, sendo que a invasão por *Candida* deveria levar a reconsiderar o desenvolvimento de cárie em bebês.

MARCHANT *et al.* (2001), estudaram a microbiota predominante nas lesões de cárie de mamadeira. Amostras da dentina infectada de 52 dentes decíduos cariados, de uma

amostra de 14 crianças com cárie de mamadeira, foram estudadas e comparadas com a microbiota da superfície do esmalte saudável de crianças livres de cárie. A bactéria *Streptococcus mutans* apresentou proporção significativamente maior nas lesões, enquanto *S. oralis*, *S. sanguis* e *S. gordonii* apresentaram proporção significativamente maior no biofilme do que em amostras das lesões. *Actinomyces israelii* constituiu 18,2% da microbiota das lesões, mas não foi isolado de amostras do biofilme. As espécies *C. albicans*, *Lactobacillus spp.* e *Veillonellas spp.* também apresentaram significativa maior proporção na dentina cariada do que nas amostras do biofilme. Os autores sugerem uma etiologia não-específica para as cáries de início precoce na infância, nas quais as características fisiológicas da microbiota infectante, na sua composição, são determinantes no processo da doença.

MOALIC *et al.* (2001) realizaram um estudo epidemiológico em 353 estudantes, com idade média de 21,3 anos, para determinar a relação potencial entre a presença de *C. albicans* na cavidade bucal e o estado de saúde dental. O valor médio do índice CPO da amostra foi 7,6 e a frequência da colonização foi 58,6%, sendo *C. albicans* presente em 93,7% dos casos. A maior prevalência de *C. albicans* foi relacionada ao sexo masculino, a fumantes, pH intrabucal inferior a 7, biofilme dental abundante e tempo decorrido desde a última higienização dental superior a 8 horas. Houve relação positiva entre a presença de cárie e densidade de *C. albicans* (UFC). Segundo os autores, embora seja difícil estabelecer o papel específico de cada fator, os resultados sugerem que pesquisas futuras são necessárias para elucidar o possível papel de *C. albicans* na etiologia da cárie.

Em estudo realizado por RADFORD *et al.* (2000), *S. mutans*, lactobacilos e leveduras foram isolados significativamente com maior frequência de crianças com um ano de idade e com cárie, comparadas com crianças livres de cárie. O padrão sócio-econômico dessas crianças foi determinante apenas na frequência de isolamento de leveduras, sendo que as crianças residentes em áreas de maior carência também apresentaram maior presença de cárie, comparadas às crianças provenientes de áreas mais favorecidas.

MOREIRA *et al.* (2001) avaliaram biotipos de *Candida spp.* da cavidade bucal de 239 escolares distribuídos em cinco categorias sócio-econômicas (A a E) em Piracicaba-SP, Brasil. As amostras da saliva foram analisadas quanto ao fluxo salivar, pH, capacidade tampão e parâmetros microbianos. A prevalência de *Candida spp.* na amostra foi de 47,3%. A espécie mais comum em todas as categorias sócio-econômicas foi *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Não houve relação estatística significativa entre o fluxo e capacidade tampão salivar e UFC/ml de *Candida spp.* A prevalência de *Candida spp.* não diferiu substancialmente entre os grupos; no entanto, houve maior ocorrência nas categorias sócio-econômicas menos favorecidas (classe B e C). Somente em 5% da amostra houve ocorrência de mais de uma espécie (*C. albicans* associada a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ou *C. krusei*). Houve significativa relação entre o índice de cárie e categorias sócio econômicas e não houve relação positiva entre o risco de cárie e a presença de *Candida* na cavidade bucal.

A avaliação do crescimento de unidades formadoras de colônias de *Candida* tem sido proposta como teste auxiliar na determinação de risco de cárie, juntamente com a contagem de colônias de outros microrganismos relacionados à cárie, como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, associados a testes salivares como a determinação do fluxo

salivar e capacidade tampão (PARVINEN & LARMAS, 1981; PIENIHÄKKINEN, 1988; GÁBRIS *et al.*, 1999).

PARVINEN & LARMAS (1981) avaliaram a relação do fluxo e pH salivar com a concentração de lactobacilos e leveduras na saliva. O estudo foi conduzido em uma amostra de 642 indivíduos adultos (acima de 30 anos), incluindo 316 mulheres e 326 homens. A recuperação de leveduras orais foi inversamente proporcional ao aumento do fluxo e pH salivar. Para fluxo salivar  $\leq$  a 5 ml/5min, leveduras foram recuperadas em 84% da população feminina e 76% da população masculina. Para valores do fluxo salivar que excederam 15ml/5min, a recuperação de leveduras diminuiu para 44% na população feminina e 41% na população masculina.

PIENIHÄKKINEN *et al.* (1987) compararam, em um estudo longitudinal, os resultados obtidos anualmente de avaliações da presença e quantidade de lactobacilos e leveduras salivares em 298 crianças (de 6 a 11 anos de idade), para distinguir indivíduos de alto ou baixo risco à cárie. Os resultados demonstraram que a presença de leveduras salivares é mais significativa para o prognóstico de cárie do que a avaliação do número de lactobacilos salivares, projetando o aumento de cárie em 3 anos. A sensibilidade e especificidade de leveduras como teste de risco de cárie foi 74% e 75%, respectivamente, quando combinadas com lactobacilos os valores foram 69% e 83%, respectivamente. Segundo os autores, indivíduos com densidade de leveduras salivares superior a 400 UFC/ml, apresentam atividade de cárie acentuada.

GÁBRIS *et al.* (1999) avaliaram a associação de testes salivares e microbiológicos de cárie e experiência de cárie em 349 adolescentes húngaros na faixa

etária de 14 a 16 anos. A proporção de adolescentes livres de cárie foi 4,6% da amostra total, os valores de CPOD foram 7,24 +/- 4,86 e os valores de CPOS foram 10,50 +/- 8,35; baixa capacidade tampão foi relatada em 6,3% das crianças examinadas. A proporção de hospedeiros de *S. mutans* lactobacilos e leveduras na saliva foi 89,7; 73,9 e 47,7%, respectivamente. Houve correlação significativa entre os índices CPOD, CPOS e contagens microbiológicas salivares.

Há poucos dados na literatura específica sobre o efeito do tratamento dental na redução da densidade de *Candida spp.* na cavidade bucal. STARR *et al.* (2002) investigaram a prevalência de *C. albicans* em 150 crianças, na faixa etária de 8 a 11 anos, durante 3 anos. A maioria das crianças nunca tinha sido submetida a tratamento odontológico anteriormente. Foram realizadas amostras com *swab* da mucosa jugal e gengiva em cinco ocasiões: pré-tratamento dental, 3 a 7 meses após o tratamento e 12-, 24- e 36 meses pós- tratamento dental. As crianças eram sistemicamente saudáveis e todas apresentavam cárie no início do tratamento. Em cada visita sucessiva, respectivamente, 47%, 32%, 21%, 27% e 28% das crianças foram positivas para *C. albicans* em cada sítio amostrado, resultando em redução de quase 50% na prevalência desses microrganismos, da época da primeira amostragem até 36 meses após o tratamento dental e os cuidados de higiene oral ( $p < 0.0005$ ). A contagem média de *C. albicans* entre crianças foi de 900 a 2500 UFC/ml, dependendo do sítio amostrado e período de avaliação. O número de UFC/ml *C. albicans* da mucosa jugal e gengiva foram altamente correlacionados em cada visita (coeficiente de correlação não-paramétrico 0,65 a 0,79,  $p < 0,00005$ ). No entanto, crianças colonizadas por *C. albicans* mantiveram a colonização ao longo do tempo, mesmo após o tratamento.

SZIEGOLEIT *et al.* (1999) avaliaram o efeito do tratamento dental e/ou aplicação local de anfotericina B na colonização bucal por *Candida*. Amostras da saliva e das lesões de cárie foram obtidos de 54 crianças e adolescentes cárie-ativos e 49 meninos e meninas livres de cárie. Espécies de *Candida* foram isoladas da saliva de 36 (66,7%) dos indivíduos cárie-ativos, mas da saliva de somente um (2%) dos indivíduos livres de cárie. *Candida* foi detectada em material removido das lesões de cárie de 44 (81,5%) das crianças cárie-ativas. Pacientes com lesões de cárie e colonizados por *Candida* foram randomicamente divididos em três grupos de 10 indivíduos cada e tratados por: restauração dental completa, aplicação local de anfotericina B ou combinação de ambos os tratamentos. O controle microbiológico final demonstrou que quando somente o tratamento dental foi aplicado, este eliminou 90% dos fungos da cavidade bucal, enquanto a aplicação local de anfotericina B como único tratamento apresentou um efeito mínimo sobre a colonização por *Candida* nas lesões de cárie. Quando, adicionalmente ao tratamento dental, anfotericina B foi aplicada, os fungos foram completamente eliminados da cavidade bucal de todos os indivíduos.

O estudo da prevalência de *Candida spp.* na cavidade bucal humana de indivíduos cárie-ativos é importante do ponto de vista epidemiológico e a redução da incidência desses microrganismos oportunistas pode contribuir para se evitar a formação de reservatórios intrabucais de infecção.

### 3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram determinar:

- 3.1- Se crianças com cárie precoce na infância, sistemicamente saudáveis, apresentam maior prevalência de *Candida spp.* na cavidade bucal, comparadas às crianças de igual faixa etária, livres de cárie;
- 3.2- O padrão de colonização das espécies de *Candida spp.* nos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva de crianças com cárie precoce na infância;
- 3.4- A espécie de *Candida* predominante em crianças com cárie precoce na infância e livres de cárie;
- 3.5- A relação entre o nível médio de UFC/ml de *Candida spp.*, o índice *ceos* e a distribuição de lesões de cárie de acordo com os grupos dentários (incisivos superiores e molares);
- 3.6- Se o tratamento dental e orientações sobre higiene bucal aos pais e crianças são suficientes para alterar os níveis de *Candida spp.* da cavidade bucal de crianças com cárie precoce na infância.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Indivíduos selecionados

No início do estudo foram selecionadas 64 crianças na faixa etária de 24 a 36 meses de idade (média de 2,5 anos; SD  $\pm$  0,25), de ambos os sexos (34 meninos e 30 meninas), cujos pais procuraram atendimento odontológico no departamento de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e no Centro de Especialidades Odontológicas de Piracicaba. As crianças foram divididas em dois grupos: GC – 32 crianças com cárie precoce na infância e GH (ou grupo controle) – 32 crianças livres de cárie. Todas as crianças, de ambos os grupos, não haviam recebido tratamento dental ou orientações sobre higiene bucal, previamente a este estudo. Os critérios de inclusão das crianças em ambos os grupos foram: (1) não apresentarem comprometimento sistêmico; (2) receberem, ou terem recebido, mamadeira várias vezes ao dia e/ou à noite, contendo solução açucarada, por um período superior a 24 meses. Para a inclusão no grupo C as crianças foram previamente diagnosticadas como portadoras de cárie precoce na infância, especificamente relacionada ao uso de mamadeira contendo soluções açucaradas, com base em história prévia e características clínicas típicas dessa síndrome (RIPA, 1988) (ANEXO 2). Para cada criança com cárie precoce na infância, foi incluída no estudo uma criança livre de cárie, com igual idade e número de dentes irrompidos (Grupo H). Foram utilizados como critérios de exclusão de voluntários no estudo: (1) comprometimento sistêmico, como deficiências hormonais e imunológicas; (2) uso de antibiótico nos seis meses anteriores ao estudo; (3) uso de medicamentos que pudessem alterar o fluxo salivar;

(4) presença de sinais clínicos de candidose; (5) sinais de infecção respiratória na última semana anterior à entrevista (rinite, tosse, febre > 38°C e conjuntivite). As crianças foram incluídas no estudo após seus pais ou responsáveis terem recebido todas as informações necessárias para o entendimento desta pesquisa e estarem de acordo com os termos descritos no “Termo de Consentimento” (ANEXO 3), o qual recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP, conforme a Resolução número 196 do Conselho Nacional de Saúde (Brasil, Ministério da Saúde, 1996) (ANEXO 4). As crianças foram avaliadas quanto à prevalência de cárie dental (lesões de mancha branca e cavidades de cárie) e níveis bucais de *Candida spp.* em diversas localizações da cavidade bucal (mucosa do palato duro, mucosa jugal, dorso da língua, biofilme dental) e saliva não estimulada. Todas as crianças receberam, após o primeiro exame micológico da cavidade bucal, orientação sobre higiene bucal e hábitos dietéticos (ANEXO 7). As crianças do grupo GC receberam tratamento na Clínica da Especialização em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, que se estendeu, em média, por 9 meses. Subseqüentemente, foram excluídas 33 crianças devido à impossibilidade de completar o tratamento odontológico por falta de cooperação das mesmas, no caso das crianças com cárie ou por negligenciarem o retorno. As 31 crianças que continuaram no estudo, 16 crianças com cárie precoce na infância (Grupo GC) e 15 crianças livres de cárie (GH), foram novamente avaliadas com relação aos níveis bucais de *Candida spp.*, após 3 meses do término do tratamento dental das crianças do grupo GC.

Foram realizadas análises comparativas entre as crianças dos grupos GC e GH, através de questionário padrão (ANEXO 5), quanto à alimentação com mamadeira

contendo solução açucarada, hábitos de higiene bucal e classificação sócio-econômica, possíveis fatores que podem influenciar a incidência de cáries e *Candida spp.* na cavidade bucal das crianças (TAB. 1).

Tabela 1 – Características iniciais da amostra selecionada

Fatores observados	Fase pré-tratamento dental			
	GC (n=32)	GH (n=32)	GC (n=16)	GH (n=15)
Número de dentes	20	20	20	20
Mamadeira várias vezes ao dia e à noite, com sacarose	32 (100%)	32 (100%)	16 (100%)	15 (100%)
Higiene bucal realizada pelos pais	12 (37,5%)	22 (68,7%)	10 (62,5%)	13 (86,6%)
Higiene bucal realizada pela criança	14 (43,7%)	9 (28,1%)	6 (37,5%)	2 (13,3%)
Sem escovação dental	6 (18,7%)	1 (3,1%)	0 (0%)	0 (0%)
Classe sócio-econômica D	12 (37,5%)	9 (28,1%)	3 (18,7%)	5 (33,3%)
Classe sócio-econômica E	20 (62,5%)	23 (71,8%)	13 (81,2%)	10 (66,6%)
Biofilme dental ausente	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Biofilme dental raro	1 (3,1%)	15 (46,9%)	0 (0,0%)	6 (40%)
Biofilme dental moderado	11 (34,4%)	15 (46,9%)	5 (31,2%)	7 (46,7%)
Biofilme dental abundante	20 (62,5%)	2 (6,3%)	11 (68,7%)	2 (13,3%)

## 4.2 Divisão dos tempos experimentais

Este estudo foi conduzido em dois tempos experimentais, nos quais foram avaliados os parâmetros clínicos e laboratoriais:

- **T1** – Avaliação Inicial ou Pré-Tratamento – antes do tratamento dental
- **T2** – Avaliação Final ou Pós-Tratamento – após o término da terapia dental ativa

O tratamento dental instituído para os grupos GC e GH foram:

- **Tratamento dental realizado no grupo GC** - incluiu realização dos procedimentos básicos de motivação, higiene bucal, profilaxia profissional, adequação do meio bucal padronizada com utilização do material para selamento provisório IRM<sup>®</sup> LIQUID Zinc Oxide Eugenol (Dentsply, Caulk), restauração das cavidades de cárie padronizada com utilização da resina composta Z-100<sup>™</sup> (3M, Dental Products), extração de dentes condenados e tratamento pulpar.
- **Tratamento dental realizado no grupo GH** – incluiu realização dos procedimentos básicos de motivação, higiene bucal e profilaxia profissional.

## 4.3 Exame clínico intrabucal

Exames clínicos foram realizados em todos os participantes, na primeira entrevista, antecedendo a coleta das amostras bucais para análise. Para tais procedimentos utilizou-se sonda exploradora nº 5 e espelho plano, sob luz do refletor, em equipo odontológico da Clínica de Especialização da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Nenhuma recomendação foi dada quanto à dieta e higienização, previamente ao exame. Os exames clínicos foram executados exclusivamente por um único examinador. Foram

observadas: a aparência da mucosa, a presença de biofilme dental sobre as superfícies vestibulares dos incisivos superiores e o diagnóstico de cárie.

#### **4.3.1 Avaliação do acúmulo de biofilme dental**

As superfícies vestibulares dos incisivos superiores foram examinadas, através de inspeção visual, sem o uso de soluções evidenciadoras (ALALUUSUA & MALMIVIRTA, 1994). A presença de biofilme dental visível sobre as superfícies dentais foi classificada nas seguintes categorias: (0) ausente; (1) rara; (2) moderada; (3) abundante (MOALIC *et al.*, 2001).

#### **4.3.2 Diagnóstico de cárie dental**

O índice utilizado para registro das lesões de cárie foi o *ceos* (Pinto, 1989). Este índice mede o ataque de cárie dental à dentição decídua. Suas iniciais representam respectivamente: dentes cariados (c), com extração indicada (e), obturados (o) e a medida de unidade é a superfície dental (s). Foram considerados como irrompidos todos os dentes que atravessaram a mucosa gengival. Foram diagnosticadas como lesões de cárie iniciais (manchas brancas), as áreas de desmineralização do esmalte, de coloração branco-opaca e como cavidades de cárie, as lesões que apresentavam o mínimo sinal de cavitação (MATTOS-GRANER *et al.*, 1996). Distúrbios de formação e calcificação dos tecidos dentários não foram considerados.

#### **4.4 Análise dos fatores comportamentais**

Foram feitas entrevistas com os responsáveis pelas crianças durante a consulta inicial, com base em um questionário padrão (ANEXO 5) que continha questões referentes à história médica pregressa da criança, frequência do uso de mamadeira, hábitos de higiene bucal e classificação sócio-econômica.

#### **4.5 Análise micológica**

##### **4.5.1 Coleta das amostras**

A primeira coleta de amostras das 64 crianças, incluídas inicialmente no estudo, foi realizada na consulta inicial, antes de qualquer intervenção odontológica ou orientação sobre higiene bucal, dentro de uma janela de 2 semanas. A segunda coleta foi realizada em 15 pertencentes ao grupo GC e 16 pertencentes ao grupo GH. Após três meses do término do tratamento dental de cada criança do Grupo GC, esta foi solicitada a comparecer à segunda coleta, concomitantemente a uma criança do grupo GH. As coletas foram feitas no consultório odontológico da Clínica de Especialização da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. As amostras foram coletadas da saliva (S), dorso da língua (L), mucosa do palato (PAL), mucosa jugal (B), e biofilme dental (PL). As amostras foram codificadas de acordo com o grupo ao qual a criança pertencia (C ou H), número da criança no estudo (de 1 a 64), localização da amostra (S, L, PAL, B e PL) e o número do isolado clonal (de 1 a 15). Assim, a amostra C31-S2 representa o isolado “2” da saliva da criança 31 do Grupo C (crianças com cárie precoce na infância).

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 a 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 (ANEXO 8). 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 (WILLIANSON *et al.*, 1972).

#### **4.5.2 Processamento do material**

As amostras foram submetidas à agitação por 30 segundos em um agitador de tubos (Phoenix AT 56), para a 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 alíquotas de 100 µL de cada diluição foram inoculadas em duplicata, em placas de Petri, contendo meio de cultura Sabouraud Ágar Dextrose (SDA), acrescido de 0,1 mg/ml de cloranfenicol (Quemacetina Succinato/Carlos Erba) e incubadas aerobicamente, a 37°C por 2 a 4 dias. As placas que

apresentaram crescimento negativo foram mantidas em incubação por mais 72 horas e então, examinadas novamente antes de serem descartadas. Placas não inoculadas foram também incubadas como controle negativo. Foram selecionadas para contagem de colônias as placas referentes à diluição que apresentou crescimento entre 1 a 300 colônias. A quantificação de *Candida spp.* foi realizada a partir do volume da amostra coletada e do número de unidades formadoras de colônias (UFC). O número de UFC/ml obtido foi convertido no respectivo logaritmo.

Após a incubação, foram utilizados como critérios 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 esfregaço da colônia, corado pelo Gram). Quando na microscopia foram observadas células ovaladas, grandes, Gram-positivas, com ou sem brotamento, sugestivas de *Candida*, 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.*, dispensado em placas de Petri e o meio de cultura SDA/Cloranfenicol (Quemacetina Succinato/Carlos Erba), dispensado em tubos de ensaio com rosca (13X100 mm), para armazenamento das amostras e posterior especificação. Foram isoladas até 10 colônias, quando presentes, de cada localização bucal da criança positiva para *Candida spp.*, gerando uma média de 10 colônias isoladas por criança. 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 meio de cultura SDA e os tubos de ensaio foram armazenados sob refrigeração (-20°C).

Foram observadas a coloração e morfologia das colônias crescidas sobre o CHROMagar Candida® (Probac do Brasil) (ANEXO 9), conforme a TAB.2.

Tabela 2. Relação das espécies, coloração e morfologia da cultura obtida no teste de crescimento em meio de cultivo cromogênico (CHROMagar Candida®)

Espécie	Coloração da colônia	Morfologia da colônia
<i>Candida albicans</i>	Verde Claro	Lisa
<i>Candida dubliniensis</i>	Verde Escuro	Lisa
<i>Candida parapsilosis</i>	Branco, Creme ou Rosa	Lisa
<i>Candida tropicalis</i>	Azul acizentado	Lisa
<i>Candida krusei</i>	Rosa opaco	Rugosa
<i>Candida guilliermondii</i>	Púrpura, Rosa claro	Lisa

Odds & Bernaerts, 1994

#### 4.6 Identificação das espécies de *Candida*

As amostras foram identificadas observando-se a produção de tubo germinativo em soro estéril de coelho, a presença de hifas/pseudo-hifas, células leveduriformes e clamidósporos em ágar-fubá-tween 80 e a fermentação e assimilação de carboidratos (SANDVEN, 1990). Para a identificação presuntiva de *Candida dubliniensis*, todas as amostras identificadas como *Candida albicans* foram submetidas à prova de termotolerância a 45°C (SULLIVAN & COLEMAN, 1998).

#### 4.6.1 Formação do Tubo Germinativo

Para visualizar a formação do tubo germinativo microscopicamente, alguns procedimentos prévios foram realizados: Preparação de cultura de 24 h da amostra a ser testada; inoculação de uma alçada da cultura em 0,5 ml de soro estéril de coelho; incubação da suspensão em banho-maria a 37°C por 2 a 3 horas. Após este período de incubação, uma gota da suspensão foi colocada entre uma lâmina e uma lamínula e examinada ao microscópio óptico (Objetiva de 40x). Quando necessário, a leitura foi repetida após 3 horas de incubação. Para a verificação do tubo germinativo, foi observado o crescimento prolongado das células leveduriformes, de duas a três vezes maior do que o da célula-mãe, sem constrição da base da célula, caracterizando, portanto, a espécie *Candida albicans*.

#### 4.6.2 Produção de Clamidósporos/Hifas e Pseudohifas

Para a realização deste teste, foi utilizado o meio Ágar-Fubá-Tween 80 (pH 5,6), de composição específica (ANEXO 6). O meio foi distribuído sobre uma lâmina de vidro no interior de uma placa de Petri. Sobre o meio foi semeada uma única estria da amostra a ser identificada. Para promover umidade relativa e evitar que o meio se ressecasse, o material foi mantido em câmara úmida (Placa de Petri), por 72 h, em temperatura ambiente. Após este período, a lâmina foi retirada do conjunto e observada ao microscópio óptico, para evidenciar as estruturas características de clamidósporos, hifas e pseudo-hifas comuns às espécies de *Candida*.

#### 4.6.3 Fermentação de Carboidratos

Para a execução destes testes bioquímicos, foi utilizado o meio de cultura Caldo Vermelho de Fenol (Difco), acrescido dos carboidratos glicose, maltose, sacarose, lactose, na concentração de 1%. Após o preparo, o meio foi vertido em tubos de ensaio, adicionados de tubos tipo "Durhan" invertidos no seu interior e autoclavado. Após o resfriamento, uma alçada da cultura pura de células leveduriformes, previamente cultivadas a 37°C por 18 horas, foi inoculada no caldo com os respectivos açúcares. A interpretação da prova foi realizada após 18, 24, 48 e 72 horas, observando-se a produção de ácido e gás através da viragem de pH e produção de gás dentro dos tubos de "Durhan", respectivamente. Esta prova consiste em uma das etapas do processo de identificação das espécies de *Candida*.

#### 4.6.4 Assimilação de Carboidratos

Para a prova de assimilação de carboidratos, foi preparado um meio de composição definida (ANEXO 6). Foi vertido 20 ml do meio em tubos de ensaio, que foram autoclavados a 120°C por 20 minutos. Em seguida este foi resfriado a 45°C, em banho-maria. Para cada amostra, previamente cultivada a 37°C por 18 horas, foi preparada uma suspensão, em solução fisiológica estéril, em concentração equivalente ao tubo nº 10 da escala de McFarland. Foi adicionado 0,1 ml dessa suspensão a uma placa de Petri estéril e sobre esta foi vertido o meio contido no tubo de ensaio, seguindo-se leve agitação da placa. Após a solidificação do meio, discos de papel de filtro esterilizados e embebidos em soluções de açúcares a 10% (galactose, glicose, sacarose, maltose, rafinose e xylose), foram sobrepostos e distribuídos regularmente sobre o meio. Após este procedimento, foi

realizada a incubação a 37°C por 72 horas. A leitura dos resultados foi realizada após 18, 24, 48 e 72 horas, sendo observado a formação de um halo de assimilação de açúcar para prova positiva e ausência do mesmo para prova negativa.

No ANEXO 1 podem ser observadas as características do comportamento das espécies de *Candida* frente às provas de identificação que serviram de base para a análise dos resultados, com ênfase na classificação desses microrganismos.

#### **4.6.5 Prova de Termotolerância**

Para a identificação presuntiva de *Candida dubliniensis*, todas as amostras identificadas como *Candida albicans* e aquelas que não assimilaram a xylose, foram incubadas a 42°C e 45°C por 48 H. Foram consideradas como indicativas de *Candida dubliniensis*, as amostras que não cresceram nestas temperaturas.(SULLIVAN & COLEMAN, 1998).

#### **4.7 Cultura Padrão**

Para todos os testes foram utilizados como controles, cepas de *C. albicans* (CBS-562), *C. parapsilosis* (CBS-604), *C. tropicalis* (CBS-94), *C. pseudotropicalis* (IOC - 2597), *C. krusei* (CBS-573), *C. guilliermondii* (CBS-566) e *Candida dubliniensis* (CD-36).

#### **4.8 Conservação das cepas**

As cepas identificadas como sendo espécies pertencentes ao gênero *Candida*, estão mantidas em uma coleção no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do

Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP. As amostras foram armazenadas em tubos de rosca (13X100 mm), contendo meio completo para levedura (M.C.L.) (ANEXO 6), recobertas com óleo mineral estéril e mantidos sob refrigeração (-20 °C), devendo ser repicadas a cada 6 meses.

#### **4.9 Procedimentos referentes à ética em pesquisas em humanos**

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos determinados pela resolução 196 de 10/10/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde e pelo Código de Ética Profissional Odontológico, segundo a resolução CFO 179/93 após ter sido aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

#### **4.10 Análise estatística**

Para análise estatística dos dados obtidos foram utilizados os softwares “EXCEL for Windows” e “SANEST”. Para a análise de variáveis discretas, foi utilizado o teste de significância Qui-Quadrado ( $X^2$ ) e para a análise de variáveis contínuas foi utilizado o Teste F, juntamente com o teste de Tukey, para a comparação de médias, respeitando as condições pertinentes ao uso destes testes, em nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Exame intrabucal

#### 5.1.1 Índice *ceos*

O índice *ceos* médio foi 3,56 para as 32 crianças com cárie precoce na infância, com variação de 1 a 12 (SD  $\pm$  3,56) (As crianças livres de cárie apresentaram índice *ceos* igual a zero). Os valores desse índice expressaram exclusivamente o número médio de lesões de cárie encontradas (componente 'c' do índice).

#### 5.1.2 Distribuição de cárie por grupo dentário

Entre as 32 crianças do grupo GC, 34,4% apresentaram lesões de cárie apenas nos incisivos superiores e 65,6% apresentaram atividade de cárie nesse grupo dentário e nos molares. Para as 15 crianças do grupo GC que foram acompanhadas até o término do estudo, 37,5% apresentaram lesões de cárie apenas nos incisivos superiores e 62,5% apresentaram atividade de cárie nesse grupo dentário e nos molares.

### 5.2 Tempo Experimental Inicial (T1)

Os dados obtidos em T1 serão apresentados para a amostra inicial de 64 crianças, divididas nos dois grupos experimentais, sendo 32 crianças com cárie precoce na infância e 32 crianças livres de cárie. Subseqüentemente, na análise dos dados obtidos no tempo experimental final (T2), serão apresentados os dados comparativos entre os dois

tempos experimentais, obtidos para as 31 crianças remanescentes dessa amostra inicial, sendo 16 crianças com cárie precoce na infância e 15 crianças livres de cárie.

### 5.2.1 Análise da frequência e densidade da colonização por *Candida spp.*

Em relação ao número de indivíduos dos grupos GC e GH portadores de *Candida spp.*, a FIG.1 apresenta os resultados obtidos para as 64 crianças pertencentes à amostra inicial. A presença de *Candida spp.* foi constatada em 39% da amostra total, revelando prevalência significativa (Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ ) desse microrganismo no grupo de crianças com cárie precoce na infância (71,87%), comparada ao grupo de crianças livres de cárie (6,25%).

Os resultados demonstrados na TAB.3 revelam correlação significativa (Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ ) entre a densidade da colonização por *Candida spp.* e o índice *ceos* das 32 crianças cárie-ativas pertencentes à amostra inicial. Para 100% das crianças que demonstraram valores  $< 100$  UFC/ml de *Candida spp.*, os valores do índice *ceos* estavam na categoria de 1 a 4; entre as crianças que demonstraram valores entre 100 a 400 UFC/ml de *Candida spp.*, 81,8% apresentaram valor médio do índice *ceos* na categoria de 1 a 4 e 18,2% apresentaram valor médio do índice *ceos* na categoria de 5 a 10. Para as crianças que demonstraram valores  $> 400$  UFC/ml de *Candida spp.* – considerados acentuados – 20% apresentaram valor médio do índice *ceos* na categoria de 1 a 4, 60% na categoria de 5 a 10 e 20% apresentaram valor médio do índice *ceos*  $> 10$ . Entre as crianças com crescimento negativo para *Candida spp.*, 88,8% apresentaram índice *ceos* na categoria de 1 a 4 e 11,2% na categoria de 5 a 10. Somente duas crianças livres de cárie apresentaram colonização por

*Candida spp.*, uma demonstrou valores de 100 a 400 UFC/ml de *Candida spp.* e a outra > 400 UFC/ml.

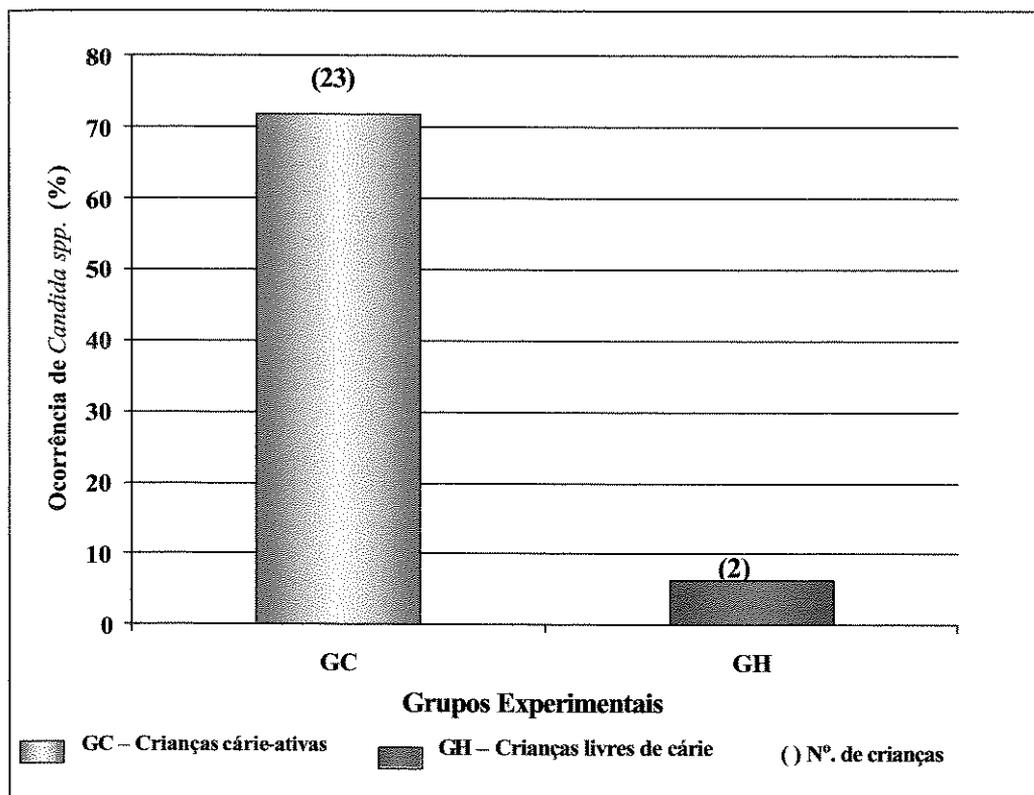


Figura 1 – Ocorrência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância e em crianças livres de cárie. (Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ ).

Tabela 3 - Densidade do isolamento de *Candida spp* em relação ao índice *ceos* no grupo de crianças cárie-ativas.

Densidade da colonização	<i>ceos</i>						Total	
	1-4		5-10		>10		n	%
	n	%	n	%	n	%		
0 colônias	8	88,8	1	11,2	0	0,0	9	100
0 a 100 colônias	7	100	0	0,0	0	0,0	7	100
100 a 400 colônias	9	81,8	2	18,2	0	0,0	11	100
> 400 colônias	1	20	3	60	1	20	5	100
<b>Total</b> (n=32)	25	78,1	6	18,7	1	3,2	32	100
<b>Valores de p</b>	0,04	-	0,0007	-	0,0004	-	-	-

(Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ )

A FIG.2 registra a relação significativa observada entre a densidade da colonização por *Candida spp.* e o perfil da atividade de cárie das 32 crianças cárie-ativas de acordo com os grupos dentários acometidos por cárie ( $p < 0,05$ ). Entre as crianças que apresentaram lesões de cárie apenas nos incisivos centrais superiores, 9% demonstraram valores  $< 100$  UFC/ml de *Candida spp.*, 18,2% demonstraram valores entre 100 a 400 UFC/ml de *Candida spp.* e 72,7% não apresentaram esse microrganismo. Entre as crianças que demonstraram lesões de cárie nos incisivos e molares, 28,5% demonstraram valores  $< 100$  UFC/ml de *Candida spp.*, 42,8% demonstraram valores entre 100 a 400 UFC/ml de

*Candida spp.*, e 23,8% demonstraram valores > 400 UFC/ml de *Candida spp.* e apenas 4,7% não apresentaram esse microrganismo.

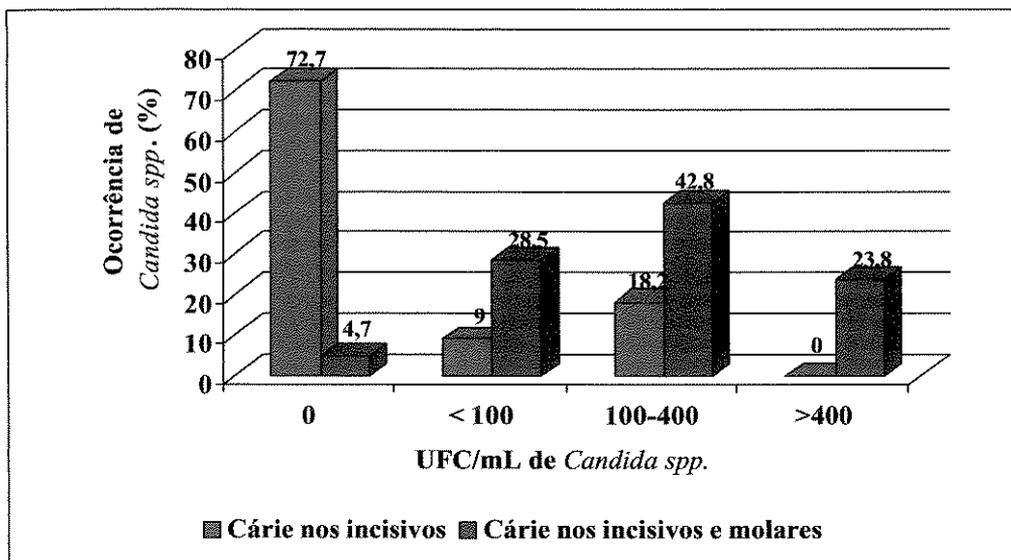


Figura 2 - Densidade da colonização por *Candida spp.* em relação ao perfil de atividade de cárie em 32 crianças cárie-ativas de acordo com os grupos dentários acometidos por cárie. (Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ )

### 5.2.2 Distribuição intrabucal de *Candida spp.*

Os dados obtidos na recuperação de *Candida spp.* com base nos sítios anatômicos intrabucais, biofilme dental e saliva estudados, para as crianças cárie-ativas e livres de cárie estão expressos na FIG.3. Nas crianças cárie-ativas observou-se valores de UFC/ml de *Candida spp.* significativamente maiores no biofilme dental  $8,4 \times 10^3$  UFC/ml), comparados aos valores obtidos para o dorso língua ( $3,5 \times 10^3$  UFC/ml), mucosa jugal ( $9,9 \times 10^2$  UFC/ml), palato ( $4 \times 10^2$  UFC/ml), saliva ( $2 \times 10^2$  UFC/ml) e significativamente

menor comparado ao valor total de UFC/ml de *Candida spp.* obtido da cavidade bucal ( $1,3 \times 10^4$  UFC/ml), não sendo observada diferença significativa quanto aos valores de UFC/ml obtidos da saliva, mucosa jugal e palato. Para as crianças livres de cárie observou-se valores de UFC/ml de *Candida spp.* significativamente maiores no dorso da língua ( $3,1 \times 10^3$  UFC/ml), comparados aos valores obtidos para a saliva (zero UFC/ml), mucosa jugal ( $2,4 \times 10^2$  UFC/ml), palato ( $0,9 \times 10^2$  UFC/ml) e biofilme dental ( $0,7 \times 10^2$  UFC/ml), não havendo diferença significativa entre os valores médios de UFC/ml de *Candida spp.* obtidos do dorso da língua e o valor total de UFC/ml de *Candida spp.* obtido da cavidade bucal ( $3,5 \times 10^3$  UFC/ml). Não foi observada diferença significativa quanto aos valores de UFC/ml obtidos da saliva, mucosa jugal, palato e biofilme das crianças livres de cárie, mas esses valores foram significativamente diferentes do valor total de UFC/ml de *Candida spp.* obtidos da cavidade bucal dessas crianças. Esses dados permitiram observar uma diferença significativa nos valores médios de UFC/ml de *Candida spp.* no biofilme dental e no valor total obtido para a cavidade bucal entre as crianças do grupo GC e GH, sendo que para o dorso da língua, palato, mucosa jugal e saliva, não houve diferença significativa para os dois grupos.

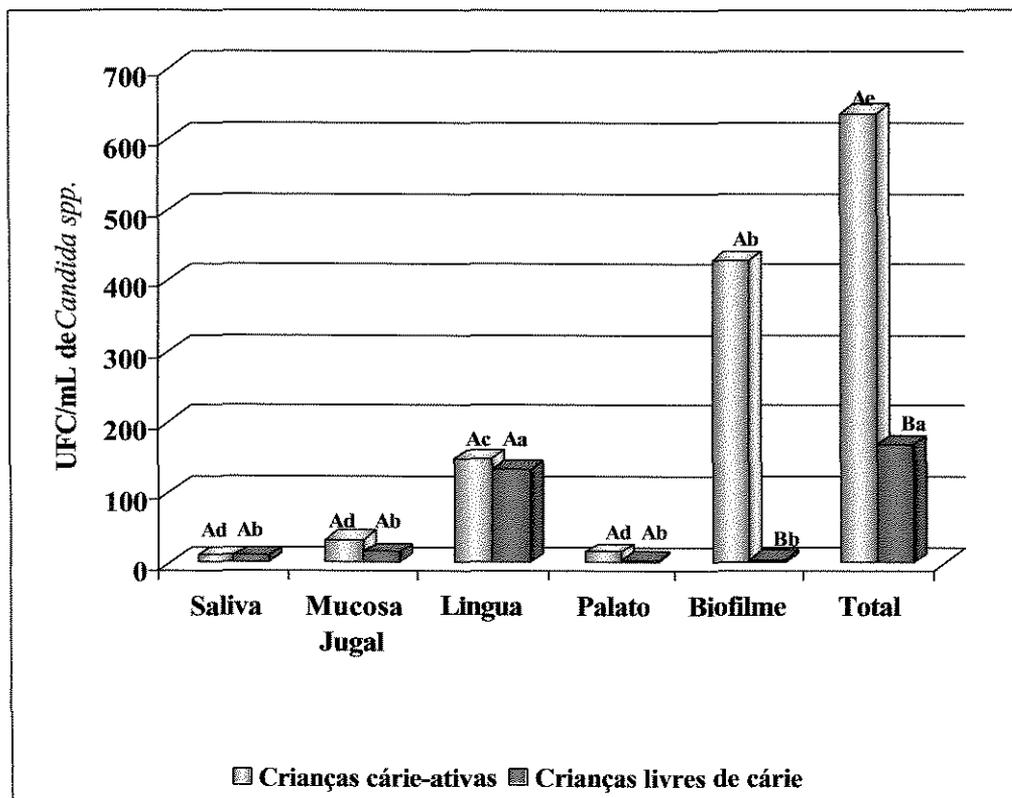


Figura 3 - Distribuição de *Candida spp.* em relação aos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva nas crianças cárie-ativas e livres de cárie, na fase pré-tratamento. (Teste de Tuckey,  $p < 0,05$ , dados transformados em *Log*, ANEXO 10) As letras minúsculas comparam dentro dos sítios e as letras maiúsculas comparam entre crianças cárie-ativas e livres de cárie.

### 5.2.3 Identificação das espécies de *Candida spp.*

Os dados obtidos na identificação das espécies de *Candida*, com base na frequência de cada espécie nas crianças cárie ativas que apresentaram esses microrganismos e no total de leveduras isoladas, acham-se expressos na TAB. 4. Observou-

se que entre as 23 crianças positivas para *Candida spp.* do grupo GC, do total de 32 examinadas inicialmente, a espécie predominante foi *Candida albicans* (82.6%), seguida por *Candida tropicalis* (21.7%), *Candida parapsilosis* (21.7%), *Candida krusei* (4.34%) e *Candida spp.* (4.34%). A espécie *C. albicans* também apresentou predominância significativa entre o total de leveduras isoladas (84,7%), seguida por *Candida tropicalis* (11%), *Candida parapsilosis* (3,43%), *Candida krusei* (0,4%) e *Candida spp.* (0,34%). Entre as crianças cárie-ativas 69,5% apresentaram apenas a espécie *C. albicans* e 6 crianças (26,1%) foram multicolonizadas, sendo que *C. albicans* se apresentou em associação com as seguintes espécies: *C. tropicalis* (1 criança), *C. parapsilosis* e *C. krusei* (2); *C. parapsilosis* (1); *C. tropicalis* (1); *Candida spp.*(1). Apenas uma criança apresentou somente a espécie *C. parapsilosis*. Entre as duas crianças livres de cárie, uma apresentou somente *Candida albicans* e a outra foi multicolonizada pelas espécies *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, sendo que *C. albicans* representou predominância significativa ( $p < 0,05$ ) de 79,3% do total de leveduras isoladas, seguida por *Candida tropicalis* (13,8%) e *Candida parapsilosis* (6,9%).

A frequência intrabucal das 291 espécies de *Candida* identificadas, pertencentes às crianças cárie-ativas e livres de cárie, está representada na FIG.4. No biofilme dental das crianças cárie-ativas e livres de cárie, 100% das espécies identificadas eram *C. albicans*. Na mucosa do palato foram identificadas as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* nas crianças cárie-ativas e *C. albicans* e *C. parapsilosis* nas crianças livres de cárie. No dorso da língua foram identificadas as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Candida spp.* nas crianças cárie-ativas e *C. albicans* e *C. tropicalis* nas crianças livres de cárie. Na mucosa jugal das crianças cárie-ativas foram identificadas as

espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e na saliva foram detectadas *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Nas crianças livres de cárie foram identificadas somente *C. albicans* na mucosa jugal e na saliva.

Tabela 4. Frequência das espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal das crianças cárie-ativas.

Espécies de <i>Candida</i>	Número de indivíduos <sup>+</sup>	Frequência Absoluta* de isolamento de <i>Candida spp.</i>	Número de isolados por espécie	Frequência Relativa** de isolamento de <i>Candida spp.</i>
<i>Candida albicans</i>	19	82,6%	222	84,7%
<i>Candida tropicalis</i>	5	21,7%	29	11%
<i>Candida parapsilosis</i>	5	21,7%	9	3,43%
<i>Candida krusei</i>	1	4,34%	1	0,4%
<i>Candida spp.</i>	1	4,34%	1	0,4%

\* Para as 23 crianças positivas para *Candida spp.*

\*\* Para o número total de 262 isolados.

+ 6 crianças foram colonizadas por múltiplas espécies

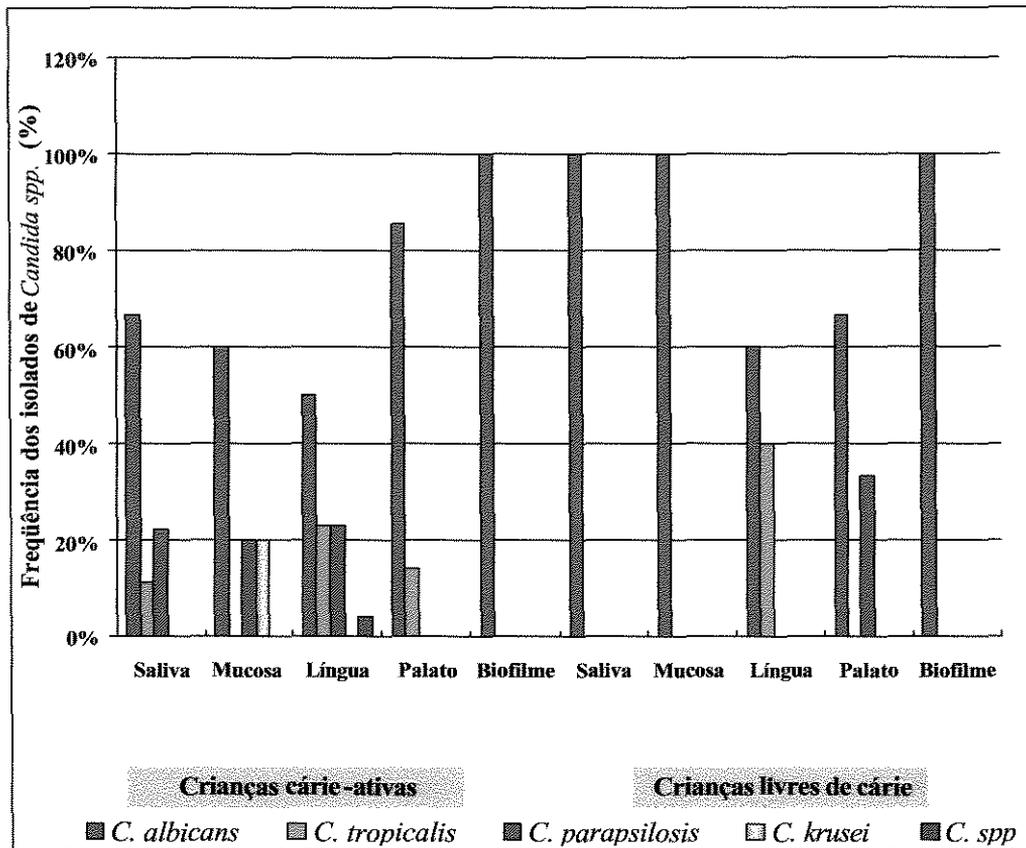


Figura 4. Distribuição intrabucal das espécies de *Candida* identificadas no grupo de crianças cárie-ativas e livres de cárie.

### 5.3 Tempo experimental final (T2)

#### 5.3.1 Ocorrência de *Candida spp.* antes e após o tratamento dental

Os dados relacionados à prevalência de *Candida spp.* nos grupos GC e GH, antes e após o tratamento dental, estão expressos na FIG.5. Redução não significativa (Teste Qui-Quadrado,  $p > 0,05$ ) de 75% para 62,5% na ocorrência de *Candida spp.* no grupo GC e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 13,34% para 33,34% na ocorrência de *Candida spp.* no grupo GH, foram observados.

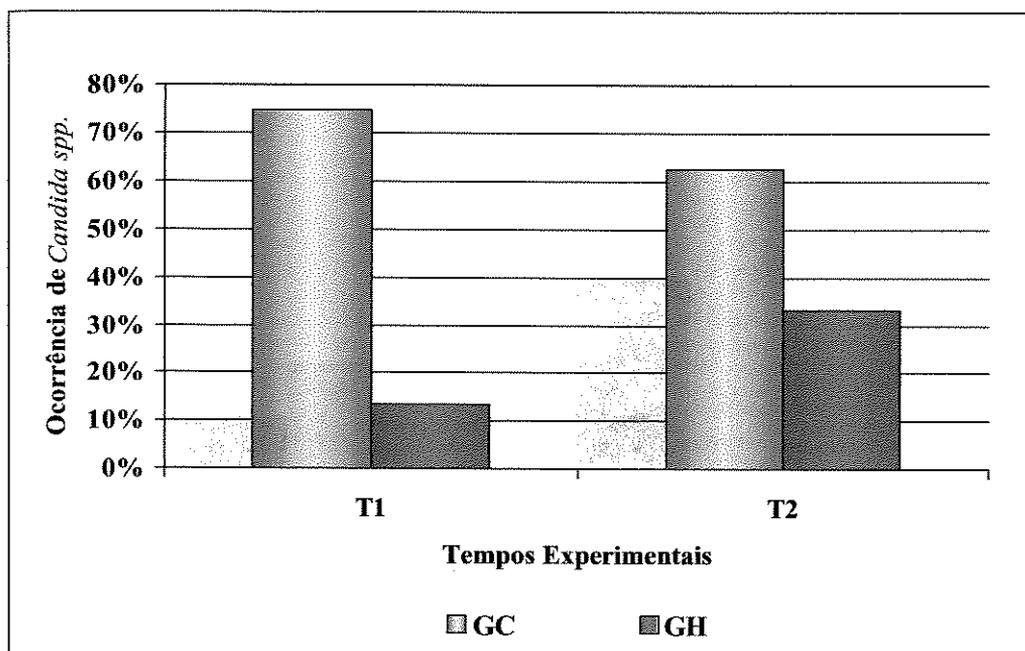


Figura 5. Ocorrência de *Candida spp.* nas crianças cárie ativas e livres de cárie antes do tratamento (T1) e após o tratamento (T2).

### 5.3.2 Densidade da colonização intrabucal por *Candida spp.* antes e após o tratamento dental

Os valores médios de UFC/ml de *Candida spp.* da cavidade bucal das crianças cárie-ativas e livres de cárie, antes e após o tratamento dental, estão demonstrados na FIG.6. Os resultados revelam que houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) de  $1,3 \times 10^4$  UFC/ml para  $6,1 \times 10^3$  UFC/ml no grupo GC e redução não-significativa ( $p > 0,05$ ) de  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml para  $1,7 \times 10^3$  UFC/ml no GH.

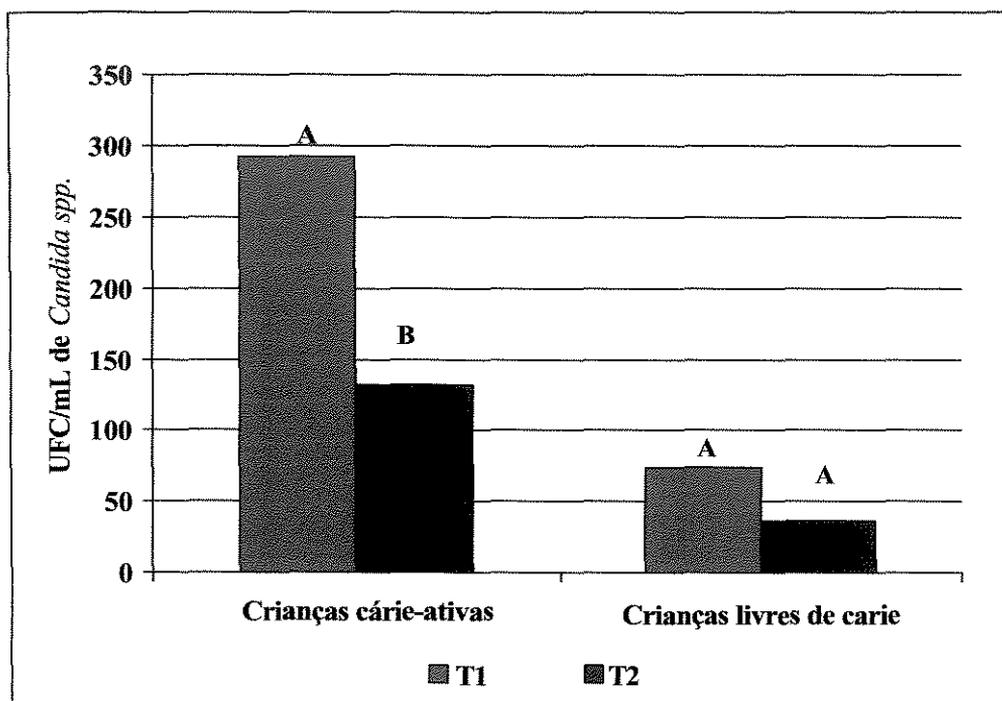


Figura 6. Densidade da colonização intrabucal por *Candida spp.* nas crianças cárie-ativas e livres de cárie antes (T1) e após (T2) o tratamento dental. (Teste de Tuckey,  $p < 0,05$ , ANEXO 10).

A TAB. 5 apresenta os dados obtidos da distribuição das crianças cárie-ativas e livres de cárie de acordo com a densidade da colonização por *Candida spp.*, expressa em UFC/ml. Os dados permitem constatar que entre as crianças cárie ativas houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da prevalência de crianças que apresentavam valores de UFC/ml de 100 a 400 (de 37,5% para 25%) e  $> 400$  (de 31,25% para 12,5%), antes e após o tratamento dental, respectivamente. Ainda para esse grupo houve aumento significativo de 6,25% para 25%, referentes à prevalência de crianças que apresentavam valores  $< 100$  UFC/ml e aumento significativo das crianças não colonizadas por *Candida spp.* (de 25% para 37,5%). No grupo de crianças livres de cárie houve redução significativa das crianças não colonizadas por *Candida spp.*, de 86,7%, antes do tratamento dental, para 66,7%, após o tratamento dental e aumento significativo das crianças que apresentaram  $< 100$  UFC/ml, de 0% a 20%, antes e após o tratamento dental, respectivamente. Duas crianças positivas para *Candida spp.* que inicialmente apresentaram entre 100 a 400 UFC/ml e  $> 400$  UFC/ml desse microrganismo, respectivamente, mantiveram essa densidade de colonização na cavidade bucal após o tratamento dental.

Tabela 5. Distribuição das crianças com cárie precoce na infância e livres de cárie de acordo com a densidade da colonização por *Candida spp.* apresentada antes e após o tratamento dental

UFC/ml <i>Candida spp.</i>	Grupos			
	GC (n=16)		GH (n=15)	
	Pré-tratamento dental	Pós-tratamento dental	Pré-tratamento dental	Pós-tratamento dental
<b>Zero</b>	4 (25,0%)	6 (37,5%)	13 (86,66%)	10 (66,6%)
<b>0,0 - 100</b>	1 (6,25%)	4 (25,0%)	0 (0,0%)	3 (20%)
<b>100 – 400</b>	6 (37,5%)	4 (25,0%)	1 (6,66%)	1 (6,66%)
<b>&gt; 400</b>	5 (31,25%)	2 (12,5%)	1 (6,66%)	1 (6,66%)
<b>Valores de p</b>	0,0000004	0,000001	0,01	0,01

(Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ )

### 5.3.3 Distribuição intrabucal de *Candida spp.* nas crianças cárie-ativas, antes e após o tratamento dental

O valor médio de UFC/ml de *Candida spp.* nos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva das crianças cárie-ativas foram comparados antes e após o tratamento dental, conforme observado na FIG.7. Foram observadas reduções de  $2 \times 10^2$  UFC/ml de *Candida spp.* para  $1,2 \times 10^2$  UFC/ml na saliva, de  $9,9 \times 10^2$  UFC/ml para  $0,5 \times 10^2$  UFC/ml na mucosa jugal, de  $3,5 \times 10^3$  UFC/ml para  $1 \times 10^3$  UFC/ml, no dorso da língua, de  $4 \times 10^2$  UFC/ml para  $0,9 \times 10^2$  UFC/ml no palato e de  $8,4 \times 10^3$  UFC/ml para  $4,8 \times 10^3$  UFC/ml no

biofilme dental. No entanto, a amostra apresentou um alto coeficiente de variação e essas reduções não foram significativas (ANEXO 10).

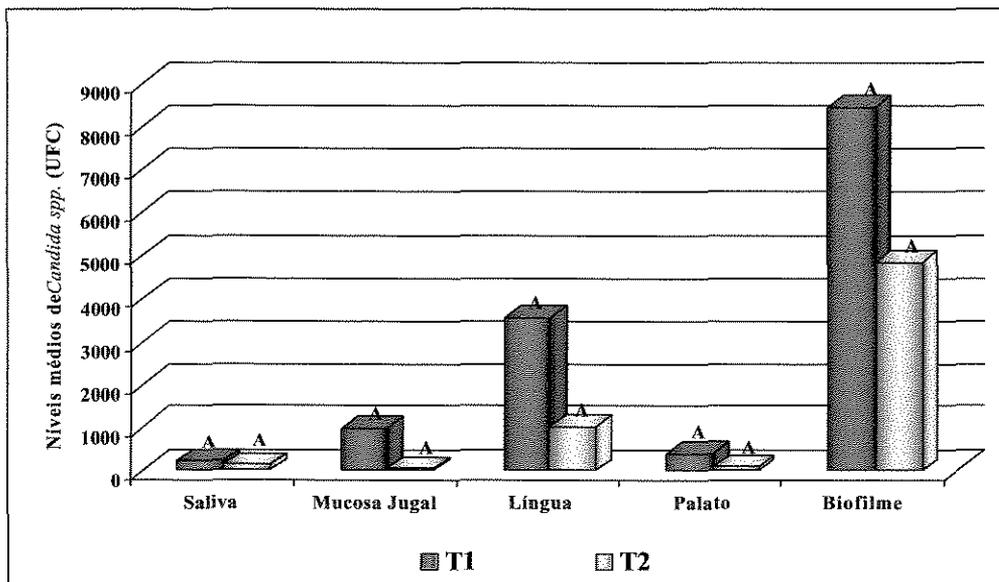


Figura 7 - Distribuição de *Candida spp.* em relação aos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva das crianças cárie-ativas antes e após o tratamento dental. (Teste de Tuckey,  $p > 0,05$ ).

#### 5.3.4 Distribuição intrabucal de *Candida spp.* nas crianças livres de cárie antes e após o tratamento dental.

O valor médio de UFC/ml de *Candida spp.* nos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva das crianças livres de cárie antes e após o tratamento dental, conforme observado na FIG.8, foram respectivamente: zero UFC/ml e  $3 \times 10^2$  UFC/ml na saliva,  $2,4 \times 10^2$  UFC/ml e  $2,2 \times 10^2$  UFC/ml na mucosa jugal,  $3,1 \times 10^3$  UFC/ml e  $1,1 \times 10^3$  UFC/ml no dorso da língua,  $9 \times 10^2$  UFC/ml e  $2 \times 10^2$  UFC/ml, no palato, e  $7 \times 10^2$  UFC/ml e  $5 \times 10^2$

UFC/ml no biofilme dental, sem que tenha sido observada diferença significativa nos valores de UFC/ml antes e após o tratamento dental.

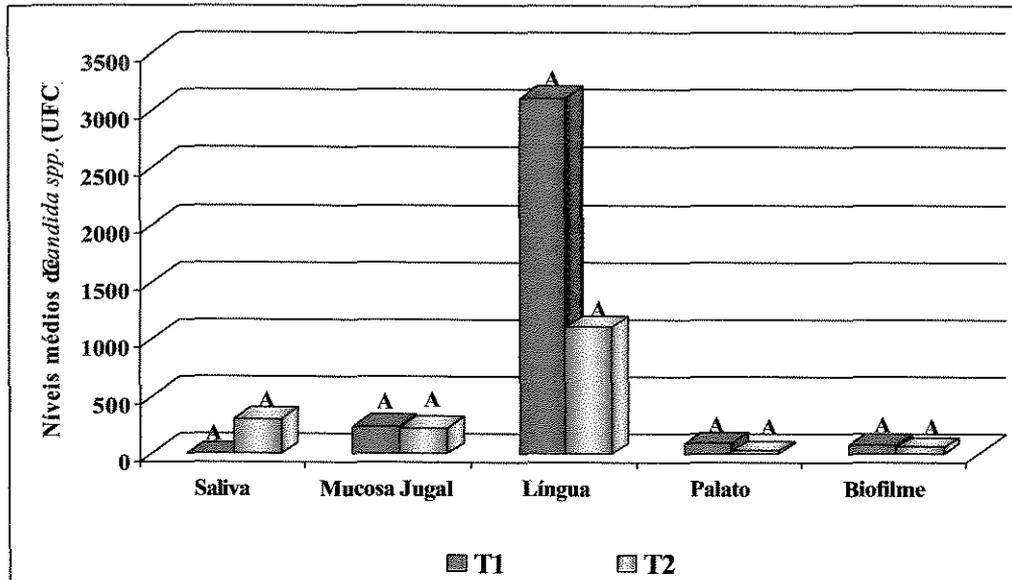


Figura 8 - Distribuição de *Candida spp.* em relação aos sítios intrabucais, biofilme dental e saliva das crianças livres de cárie antes e após o tratamento dental.(Teste de Tuckey,  $p > 0,05$ )

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Ocorrência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância e livres de cárie

A análise da frequência de *Candida spp.* na cavidade bucal das crianças (64) que compuseram a amostra inicial, revela diferença significativa na prevalência desse microrganismo entre as crianças (32) com cárie precoce na infância (71,87%) e as crianças (32) livres de cárie (6,25%). Na literatura disponível não há dados de estudos semelhantes realizados em crianças com cárie precoce na infância, especificamente associada ao uso de mamadeira, em faixa etária similar à de nossa amostra. No entanto, a associação de lesões de cárie com maior prevalência da colonização da cavidade bucal por *Candida spp.* tem sido proposta por vários autores (HODOSON & CRAIG, 1972; GÁBRIS *et al.*, 1999, SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; RADFORD *et al.*, 2000; MOALIC *et al.*, 2001 e STARR *et al.*, 2002), em estudos conduzidos com amostras de crianças em diferentes faixas etárias, como exposto na TAB.6.

Tabela 6 – Prevalência de *Candida spp.* em populações cárie-ativas

<b>Autores</b>	<b>No. de indivíduos na amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Prevalência de <i>Candida spp.</i></b>
Hodoson & Craig, 1972	32	3-6 anos	56%
Gabris <i>et al.</i> , 1999	181	14-16 anos	53,6%
Sziegoleit <i>et al.</i> , 1999	54	adolescentes	66,7%
Radford <i>et al.</i> , 2000	39	1 ano	23,7%
Moalic <i>et al.</i> , 2001	135	21,3 anos em média	55%
Starr <i>et al.</i> , 2002	150	8-12 anos	47%

A prevalência de *Candida spp.* em populações de crianças com cárie nesses estudos varia amplamente, o que pode ser explicado em parte devido às diferenças na técnica de amostragem e faixa etária das crianças, além de outros fatores predisponentes, como dieta, hábitos de sucção, terapia antimicrobiana, que podem estar presentes e variar de uma população para outra, influenciando os resultados.

As crianças com cárie precoce na infância apresentaram índice *ceos* médio de 3,56, que expressou exclusivamente o número médio de lesões de cárie encontradas (componente “c” do índice). O valor médio desse índice encontrado no presente estudo é superior aos relatados por outros estudos, no Brasil, realizados em populações de faixa etária similar (BEZERRA *et al.*, 1990; MATTOS-GRANER *et al.*, 1996). Valores elevados para esse índice são esperados em nossa amostra, devido ao padrão de desenvolvimento da cárie rampante, associada ao uso de mamadeira, que se caracteriza pela rapidez em que ocorre perda de substância dental, comparada a outras lesões de cárie em crianças.

A densidade da colonização por *Candida spp.* na cavidade bucal das crianças com cárie precoce na infância foi significativamente relacionada a valores elevados do índice *ceos* (Teste Qui-Quadrado,  $p < 0,05$ ), conforme os dados apresentados na Tabela 3. Entre as crianças cárie-ativas que apresentaram índice *ceos* de 1 a 4, 32% foram negativas para a presença de *Candida spp.* e 64% apresentaram número inferior a 400 UFC/ml. Entre as crianças do mesmo grupo com índice *ceos* entre 5 e 10 e superior a 10, 57% apresentaram mais do que 400 UFC/ml. A associação entre valores de UFC/ml de *Candida spp.* acima de 400 e atividade de cárie acentuada, foi proposta anteriormente por PIENIHÄKKINEN (1988). A presença de candidose crônica ou aguda (OLSEN &

STENDERUP, 1990) também tem sido relacionada a indivíduos com número superior a 400 UFC/ml de *Candida spp.* na saliva. Embora em nossa amostragem as crianças com índice *ceos* elevado apresentem valores de UFC/ml maiores que 400, não foram observadas manifestações orais sugestivas de candidoses, pelo menos no momento da obtenção dos dados. Entre as crianças com cárie precoce na infância, 34,4% apresentaram lesões de cárie apenas nos incisivos centrais superiores e 65,6% apresentaram atividade de cárie nesse grupo dentário e nos molares. Tal fato demonstra o perfil da atividade de cárie na população estudada. O desenvolvimento de lesões de cárie está intimamente relacionado com a cronologia de irrompimento dentário, pois o acometimento das superfícies dentárias, é decorrente da quantidade de tempo em que estas estão expostas aos fatores de risco presentes no meio bucal. Como pode ser observada na FIG.2, a densidade da colonização por *Candida spp.* foi significativamente maior nas crianças que apresentaram lesões de cárie nos incisivos e molares, comparada às crianças com lesões apenas nos incisivos.

Várias explicações baseadas em dados disponíveis na literatura científica são plausíveis de serem formuladas para explicar a hipótese de que indivíduos cárie-ativos apresentam maior densidade da colonização por *Candida spp.* Uma dessas explicações baseia-se em resultados de estudos que têm relatado o cultivo de espécies de *Candida* diretamente do material cariado (JACOB *et al.*, 1998; SZIEGOLEIT *et al.*, 1999, MARCHANT *et al.*, 2001), sugerindo que as lesões de cárie em dentina possam representar reservatórios intrabucais para re-infecção e proliferação desses microrganismos. MARCHANT *et al.*, 2001, relataram frequência significativamente maior de *C. albicans* ( $p < 0,05$ ) e outros microrganismos acidúricos e não-acidúricos, na dentina infectada proveniente de lesões de cárie precoce na infância comparadas a amostras do biofilme

dental de crianças livres de cárie. Segundo os autores, as lesões de cárie precoce na infância apresentam uma microbiota complexa em termos de composição e diversidade genotípica das espécies e a associação das diversas comunidades microbianas nessas lesões, pode ser indicativo de que diferentes comunidades tenham igual capacidade de causar a cárie dental ou que representem diferentes estágios de desenvolvimento das lesões. Outra explicação baseia-se na hipótese de que a proliferação das espécies de *Candida* pode ser favorecida pelas condições intrabucais que podem estar presentes em indivíduos cárie-ativos, como baixo pH, alta disponibilidade de carboidratos fermentáveis, higienização deficiente, baixo fluxo salivar e interações com a microbiota.

A microbiota bacteriana indígena representa um ecossistema microbiano altamente competitivo, podendo restringir o crescimento de *C. albicans*, mas não eliminando completamente esse microrganismo do biofilme formado sobre a mucosa (ROGERS & BALISH, 1980). Por outro lado, existem evidências de interações de *Candida* com biofilmes bacterianos na cavidade bucal (HOLMES *et al.*, 1995). *C. albicans* co-agregam e co-aderem a certas espécies de estreptococos bucais e para algumas espécies, como *Streptococcus gordonii*, as proteínas salivares aumentam essas interações. *S. gordonii* é um componente comum da microbiota bucal humana e exibe amplas propriedades de aderência, sendo um multi-mediador de co-agregações intra e intergenéricas bacterianas, além de possuírem adesinas que reconhecem uma ampla variedade de receptores eucarióticos, assim como receptores polissacarídicos que são reconhecidos por *C. albicans*, possibilitando múltiplas interações receptor-adesina entre esse microrganismo e a espécie *C. albicans*, agindo como um estabilizador da associação antimicrobiana (HOLMES *et al.*, 1995). As espécies *S. oralis* e *S. sanguis* também apresentam alta afinidade a células

leveduriformes, porém *S. mutans* não apresentam a arquitetura da superfície celular necessária para suportar a aderência de *C. albicans* (JENKINSON, 1990). Estudos futuros são necessários para estabelecer as interações microbianas na cavidade bucal em presença de cáries, podendo elucidar a proliferação de *Candida spp.* em indivíduos cárie-ativos.

Quanto aos sítios intrabucais amostrados, biofilme dental e saliva, os resultados apresentados na FIG.3, demonstram que em crianças cárie-ativas houve maior prevalência de *Candida spp.* no biofilme dental presente sobre a superfície vestibular dos incisivos superiores, seguida pelo dorso da língua. Contrariamente, as crianças livres de cárie apresentaram maior prevalência de *Candida spp.* no dorso da língua, com menor prevalência no biofilme dental, quando comparado aos outros sítios amostrados.

Tem sido sugerido que o dorso da língua é o principal reservatório bucal de *Candida spp.* e que outros sítios intrabucais e a saliva são colonizados secundariamente (ARENDORF & WALKER, 1980; STENDERUP, 1990), o que também revelam os nossos dados referentes às crianças livres de cárie. As papilas linguais oferecem uma ampla área de superfície para a aderência de *Candida* e possivelmente protege os microrganismos da remoção durante a alimentação e salivação. As lesões de candidose são mais frequentes sobre a língua, mucosa jugal e palato (STENDERUP, 1990), o que indica um padrão de colonização intrabucal por *Candida spp.* preferencial por esses sítios, os quais coincidem com as regiões mais frequente e densamente colonizadas no grupo de crianças livres de cárie em nosso estudo.

A maior prevalência de *Candida* no biofilme dental de crianças com cárie precoce na infância, sugerem que esses microrganismos colonizam preferencialmente o biofilme dental aderido à superfície dos dentes quando a concentração intrabucal do

microrganismo é alta. A presença do biofilme dental abundante sobre as superfícies dentais, poderia ser explicada como um fator coadjuvante para a colonização preferencial por *Candida* ao biofilme dental nessa população, baseando-se na observação de que a escovação dental de 62,5% das crianças cárie-ativas foi realizada pela própria criança, ou estas não tinham esse hábito, sendo que 62% apresentaram abundante presença de biofilme dental visível. Por outro lado, as crianças livres de cárie apresentaram rara ou moderada presença de biofilme dental. A higienização ineficiente poderia prolongar as condições de baixo pH no biofilme dental e favorecer a seleção de microrganismos acidúricos, como *C. albicans* (BRADSHAW *et al.*, 1989), o que pode parcialmente explicar a maior prevalência de *Candida spp.* no biofilme dental da superfície vestibular dos incisivos superiores das crianças cárie-ativas, comparada à prevalência apresentada nos demais sítios anatômicos amostrados na cavidade bucal e saliva. A região cervical das superfícies dentais é geralmente banhada não somente pela saliva, mas também por componentes do exsudato ou soro derivado dos fluidos subgengivais e este último tem demonstrado aumentar a aderência fúngica ao biofilme (NIKAWA *et al.*, 1996), o que pode ter sido uma das causas da maior prevalência de *Candida* no biofilme dental em nosso estudo, considerando que as amostras de biofilme na população estudada foram coletadas do terço cervical, seguindo a linha da gengiva. Porém, os resultados sugerem estudos mais detalhados sobre a colonização preferencial de *Candida spp.* no biofilme dental de crianças com cárie precoce na infância.

A caracterização morfológica e bioquímica de leveduras do gênero *Candida*, de acordo com SANDVEN (1990), possibilitou a identificação de 291 cepas de leveduras desse gênero em espécies distintas, originárias das 25 crianças positivas para culturas de

*Candida spp.* da amostra inicial, pré-tratamento dental, e de 118 cepas, originárias das 15 crianças positivas para culturas de *Candida spp.* da amostra final, pós-tratamento dental. Os dados obtidos demonstram predominância significativa ( $p < 0,05$ ), em ambos os grupos, da espécie *C. albicans*, que representou 84,7% do total de leveduras isoladas das crianças cárie-ativas e 79,3% das leveduras isoladas das crianças livres de cárie. Corroboram com nossos resultados diversos estudos na literatura, onde *C. albicans* geralmente emerge como a espécie mais freqüentemente presente na cavidade bucal do homem, independente de serem saudáveis ou doentes (RUSSELL & LAY, 1973; LAY & RUSSELL, 1977; MANNING *et al.*, 1985; SHARP *et al.*, 1992; HANNULLA *et al.*, 1999).

No presente estudo, além de *C. albicans*, poucas outras espécies foram isoladas, sendo identificadas as espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *Candida spp.*, em ordem decrescente de prevalência. Nossos resultados estão de acordo com relatos da literatura onde essas espécies geralmente representam menos do que 10% das leveduras totais isoladas da cavidade bucal (ODDS, 1988). Com relação à freqüência de isolamento de espécies múltiplas, a associação de *C. albicans* na cavidade bucal com outras espécies do mesmo gênero ocorreu em 6 crianças cárie-ativas e uma das duas crianças livres de cárie, revelando essa espécie em associação com *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. spp.*, o que pode ter ocorrido, em parte, ao acaso, ou dependente de fatores microbiológicos, tais como comensalismo, simbiose, sinergismo ou anfibiose. Foi constatado o aparecimento exclusivo de *C. tropicalis* em uma criança cárie-ativa, isoladamente.

RUSSELL & LAY, 1973; LAY & RUSSELL, 1977; SHARP *et al.*, 1992; MANNING *et al.*, 1985 e HANNULLA *et al.*, 1999, relatam que *Candida albicans* seguida

de *Candida parapsilosis* são as espécies de maior frequência em crianças, o qual contrasta com nossos resultados, onde a segunda espécie de maior frequência foi representada por *C. tropicalis*. No entanto, nestes estudos as crianças apresentavam idade inferior a 24 meses, enquanto as crianças incluídas em nossa amostra apresentavam idade superior. Em estudo realizado por MOREIRA *et al.* (2001), em crianças na faixa etária de 6 a 9 anos de diferentes classes sociais, da região de Piracicaba, a espécie predominante na cavidade bucal esteve representada por *C. albicans* seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, em todos os níveis sócio-econômicos. Ainda nesse estudo, *C. albicans* apresentou associação com outras espécies em 5% dos escolares, na seguinte frequência: *C. albicans* + *C. tropicalis* (2,52%), *C. albicans* + *C. krusei* (1,68%) e *C. albicans* + *C. parapsilosis* (0,84%), o que se assemelha aos resultados apresentados em nosso estudo em crianças de menor faixa etária. Essas espécies estão presentes em pequeno número na microbiota bucal de certa proporção de indivíduos não-imunocomprometidos, sendo que a presença destas não é necessariamente indicativa de doença. Por estarem ausentes na literatura disponível estudos sobre a diversidade de espécies de *Candida* em crianças cárie ativas ou livres de cárie em faixa etária similar, esses dados não nos permitem maiores considerações. Estudos longitudinais em neonatos até o término da primeira infância e estudos randomizados em crianças cárie-ativas auxiliariam a elucidar o padrão de colonização de espécies de *Candida* na cavidade bucal de crianças e a idade relacionada com possíveis mudanças na prevalência de diferentes espécies, além de sugerir se alguma outra espécie não-*albicans* apresenta predominância relacionada à atividade de cárie em crianças.

## 6.2 Análise da influência do tratamento dental e educação em higiene bucal sobre a colonização da cavidade bucal por *Candida spp.*

A densidade da colonização por *Candida spp.* diminuiu significativamente no grupo de crianças com cárie precoce na infância, após o tratamento das lesões de cárie e instruções aos pais e crianças para os cuidados sobre higiene bucal de rotina, conforme observado na FIG.6. No entanto, a proporção de crianças cárie-ativas colonizadas por *Candida spp.* não sofreu redução significativa após o tratamento dental. Entre as 12 crianças inicialmente colonizadas que foram submetidas ao tratamento dental, 10 se mantiveram positivas para culturas de *Candida spp.* na segunda coleta. Vários mecanismos biológicos plausíveis podem explicar essa aparente persistência; talvez certa parcela dessas crianças tenha sido continuamente re-expostas e re-infectadas por leveduras no ambiente domiciliar; algumas crianças podem apresentar maior ingestão de açúcares do que outras; terapia antibiótica pode ter sido administrada a algumas das crianças durante o período de estudo ou ainda certas crianças podem apresentar características imunológicas que favoreçam a persistência desses microrganismos na cavidade bucal. Devido a esses fatores não terem sido controlados em nossos estudos, não podemos sugerir discriminação entre essas e outras explicações potenciais para a não diminuição da prevalência de *Candida spp.* nas crianças cárie-ativas após o tratamento dental. Entre as crianças livres de cárie, três crianças diagnosticadas inicialmente como negativas para culturas de *Candida spp.*, foram positivas na segunda coleta, o que representou um aumento significativo na proporção de crianças colonizadas por *Candida spp.* nesse grupo. A presença desses microrganismos na cavidade bucal dessas crianças poderia estar abaixo do limite de detecção no momento da

primeira coleta ou pode ter ocorrido falhas técnicas no isolamento inicial desses microrganismos, tendo sido esses detectados somente na segunda coleta. Consideramos ainda, que essas crianças podem ter sido colonizadas por *Candida spp.* durante o intervalo de tempo entre as coletas. Uma dessas três crianças, inicialmente categorizadas no grupo de crianças com dentição hígida, apresentou manchas brancas sobre os incisivos centrais superiores no momento da segunda coleta, o que indica que a dieta, a não observância das instruções sobre higiene bucal e outros fatores predisponentes, não controlados em nosso estudo, estiveram presentes nesse intervalo de tempo, possibilitando a colonização nessas crianças. Os resultados relativos à prevalência de *Candida spp.* tanto em crianças com cárie precoce na infância, quanto livres de cárie revelam novamente a necessidade de estudos detalhados sobre a estabilidade da colonização desses microrganismos em crianças com pouca idade.

Os resultados do presente estudo, somados à carência de dados na literatura específica, não nos permitem uma afirmação definitiva de que o tratamento dental e a educação sobre higiene bucal, separadamente ou em combinação, causam uma redução na prevalência de *Candida spp.* na cavidade bucal. Contudo, a possibilidade de que isto ocorra, e que tenha exercido influência na redução da densidade da colonização no presente estudo, é consistente com observações de resultados de outros estudos, assim bem como testes randomizados, que embora incluam amostras de indivíduos de maior idade do que os apresentados nesse estudo têm demonstrado a eficácia do tratamento da cárie e/ou higiene bucal em prevenir a colonização ou persistência de *C. albicans* na cavidade bucal (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; STARR *et al.*, 2002). Em um estudo em que crianças cárie-ativas, positivas para *C. albicans*, foram selecionadas aleatoriamente para receberem

restauração completa dos dentes cariados, ou tratamento com anfotericina B, 9 de 10 crianças pertencentes ao grupo que foi tratado com restaurações, não apresentaram *C. albicans* após o tratamento, comparadas com somente uma entre as 10 crianças que receberam o tratamento com anfotericina B (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999). As crianças desse estudo (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999) estavam na faixa etária de 2-15 anos. Em nosso estudo as crianças apresentavam de 2 a 3 anos de idade ( $SD \pm 0,25$ ). A maior redução de *Candida* após o tratamento dental, relatada nesses estudos em populações de crianças mais velhas, pode refletir o fato de que crianças com mais idade tendem a apresentar menor prevalência de *C. albicans* comparadas a crianças de menor idade.

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que múltiplas lesões de cárie podem representar um importante fator predisponente para a colonização da cavidade bucal de crianças com pouca idade. As lesões de cárie em dentina podem representar um maior número de sítios de retenção e proliferação para leveduras. Nosso estudo foi conduzido de modo a limitar os fatores que poderiam influenciar a colonização da cavidade bucal por *Candida spp.* Primeiro, a população estudada era relativamente homogênea quanto ao hábito de aleitamento através do uso de mamadeira contendo soluções açucaradas e oferecida várias vezes durante o dia e em média duas vezes durante a noite, sendo este um fator de inclusão das crianças em nosso estudo, tanto para o grupo de cárie-ativos quanto para os livres de cárie. Segundo, para limitar a influência do nível sócio-econômico na prevalência de *Candida spp.* na cavidade bucal, 67% das crianças de nossa amostra foram selecionadas da classe D e 33% da classe E. Terceiro, todas as crianças cárie-ativas receberam tratamento restaurador com um igual compósito, embora não haja na literatura

evidências de que a colonização de *C. albicans* seja diferentemente afetada por restaurações de amálgama ou outros materiais restauradores alternativos. Entretanto, alguns fatores permanecem impossíveis de serem controlados e podem ter exercido efeito sobre os resultados. O hábito da sucção de chupeta, dieta rica em carboidratos, incluindo a ingestão diária e freqüente de doces e “guloseimas”, ou a deficiência de certos fatores na dieta, como ferro, zinco e vitamina K (SAMARANAYAKE, 1986a), são fatores que têm sido relacionados, tanto à maior prevalência de *Candida spp.* na cavidade bucal de crianças, quanto à maior prevalência de cáries, porém esses fatores não foram avaliados em nosso estudo.

Quanto ao processo de cárie dental, nossos resultados e os poucos dados na literatura sobre o assunto (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; MOALIC *et al.*, 2001), sugerem maiores investigações sobre o microrganismo como odontopatógeno. A espécie *Candida albicans* possui características acidogênicas e heterofermentativas, particularmente sob condições ricas em carboidratos (SAMARANAYAKE *et al.*, 1986a). Em um estudo *in vitro*, foi demonstrado sinal inequívoco de cáries na presença de *C. albicans* e que essa espécie é capaz de formar um biofilme aderente sobre a superfície dental sem qualquer suporte da microbiota bacteriana. Após a adição de carboidratos de baixo peso molecular (glicose, sacarose), os valores de pH no biofilme diminuem para 4,9-5,1. Mantendo-se o experimento por vários dias, a destruição da superfície do esmalte foi demonstrada por microscopia eletrônica de varredura (WETZEL *et al.*, 1997). Essas observações são confirmadas por outro estudo conduzido por SEN *et al.*, 1997, que demonstraram que o esmalte, o cimento e a dentina são facilmente colonizados por *C. albicans* e que as hifas desse microrganismo podem penetrar em micro-rachaduras da superfície dental e migrarem

para o interior dos túbulos dentinários. Assim, a suposição de que *Candida spp.* comportam-se como saprófitas inofensivos no ambiente em presença de cáries pode estar incorreta.

Embora as leveduras do gênero *Candida* sejam consideradas habitantes normais da microbiota indígena de indivíduos saudáveis, a observação, através dos resultados obtidos neste estudo em conjunto com os dados apresentados na literatura, de que crianças cárie-ativas apresentam maior freqüência da colonização da cavidade bucal por *Candida spp.*, principalmente do biofilme dental, comparadas às crianças livres de cárie em igual faixa etária, ressalta a importância de estudos aprofundados sobre a presença desses microrganismos nessa população, já que em circunstâncias onde o organismo do hospedeiro apresenta um débito nas respostas imunes ou deficiências hormonais, além de uma série de outros fatores, esses microrganismos podem causar sérios problemas locais e sistêmicos à saúde do indivíduo.

Considerando um outro aspecto, os fungos do gênero *Candida* podem estar implicados como possíveis coadjuvantes no desenvolvimento de cáries, sendo que os mecanismos envolvidos nesse processo permanecem pouco esclarecidos. Pesquisas futuras referentes aos fatores de virulência sítio-específico requeridos para o desenvolvimento da doença, como expressão de adesinas, enzimas de degradação, funções catabólicas, interações com a microbiota, tanto do biofilme dental formado sobre superfícies dentais saudáveis, como sobre lesões de cárie, auxiliariam na elucidação do papel desses microrganismos na etiologia da cárie dental. Nossos dados não permitiram observar redução na prevalência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância na faixa etária estudada, após o tratamento dental, como observado nos poucos estudos similares

relatados na literatura em crianças de maior faixa etária (SZIEGOLEIT *et al.*, 1999; STARR *et al.*, 2002), apesar de ter sido observada uma redução na densidade da colonização (UFC). Consideramos que essa questão poderia ser elucidada através de investigações futuras sobre o tempo e estabilidade da colonização bucal por *Candida spp.*, em crianças durante a primeira infância, além de estudos que estabeleçam a relação do tratamento dental com a prevalência intrabucal de *Candida spp.* em uma amostragem maior de crianças com cárie precoce na infância, com um maior controle dos parâmetros clínicos, como dieta, pH e fluxo salivar, hábitos de sucção e outros.

## 7. CONCLUSÕES

- 7.1 - Crianças com cárie precoce na infância apresentam maior frequência da colonização da cavidade bucal por *Candida spp.*, comparadas às crianças de igual faixa etária, livres de cárie.
- 7.2 - Em crianças com cárie precoce na infância, *Candida spp.* coloniza preferencialmente o biofilme sobre as superfícies vestibulares dos incisivos centrais e secundariamente o dorso da língua.
- 7.3 - A espécie de *Candida* predominante, tanto na cavidade bucal saudável quanto em presença de cáries, é a espécie *albicans*.
- 7.4 - Crianças com cárie precoce na infância que apresentam índice *ceos* elevado (>10) e presença de lesões de cárie nos incisivos superiores e molares apresentam maiores níveis de UFC/ml de *Candida spp.* (>400) na cavidade bucal;
- 7.5 - Crianças com cárie precoce na infância na faixa etária de 2 a 3 anos, colonizadas por *Candida spp.*, mantêm a colonização mesmo após o tratamento dental.
- 7.5 - O tratamento dental restaurador diminui a densidade de *Candida spp.* na cavidade bucal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

1. ADDY, M.; SHAW, W.C.; HANSFORD, P.; HOPKINS, M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. **Br J Orthod**, London, v.9, n.3, p.158-163, Jul. 1982.
2. AINSCOUGH, S.; KIBBLER, C.C. An evaluation of the cost-effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. **J Med Microbiol**, London, v.47, n.7, p.623-628, Jul. 1998.
3. ALALUUSUA, S.; MALMIVIRTA, R. Early plaque accumulation – a sign for caries risk in young children. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.22, n.5, p.273-276, Oct. 1994.
4. ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.25, n.1, p.1-10. 1980.
5. BAGG, J.; SILVERWOOD, R.W. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. **J Med Microbiol**, London, v.22, n.2, p.165-169, Sep. 1986.
6. BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R.G.; RYLEY, J.F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, Cambridge, v.131, n.5, p.1217-1221, May. 1985.

---

\* De acordo com NBR-6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1989. Abreviatura de periódicos segundo "MEDLINE".

7. BAUMGARTNER, C.; FREYDIÈRE, A.M.; GILLE, Y. Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using albicans ID and CHROMagar Candida plates. **J Clin Microbiol**, Washington, v.34, n.2, p.454-456, Feb. 1996.
  
8. BEIGHTON, D.; LUDFORD, R.; CLARK, D.T.; BRAILSFORD, S.R.; PANKHURST, C.L.; TINSLEY, G.F.; FISKE, J.; LEWIS, D.; DALY, B.; KHALIFA, N.; MARREN, V.; LYNCH, E. Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples. **J Clin Microbiol**, Washington, v.33, n.11, p.3025-3027, Nov. 1995.
  
9. BERDICEVSKY, I.; BEN-ARYEH, H.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D. Oral *Candida* in children. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.57, n.1, p.37-40, Jan. 1984.
  
10. BERDICEVSKY, I.; BEN-ARYEH, H.; SZARGEL, R.; GUTMAN, D. Oral *Candida* of asymptomatic denture wearers. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v.9, n.2, p.113-115, Apr. 1980.
  
11. BERNAL, S.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; GARCIA, M.; ALLER, A.I.; MARTINEZ, M.A.; GUTIERREZ, M.J. Evaluation of CHROMagar Candida medium for the isolation and presumptive identification of species of *Candida* of clinical importance. **Diagn Microbiol Infect Dis**, New York, v.24, n.4, p.201-204, Apr. 1996.
  
12. BEZERRA, A.C.B. **Estudo clínico-epidemiológico da prevalência de cárie em crianças pré-escolares de 12 a 48 meses de idade**. São Paulo, 1990. 121p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
  
13. BORROMEO, G.L.; McCULLOUGH, M.J., READE, P.C. Quantitation and morphotyping of *Candida albicans* from healthy mouths and from mouths affected by erythematous candidosis. **J Med Vet Mycol**, Abingdon, v.30, n.6, p.477-480. 1992.

14. BRADSHAW, D.J.; McKEE, A.S.; MARSH, P.D. Effect of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. **J Den Res**, Chicago, v.68, n.9, p.1298-1302, Sep. 1989.
15. BRAMBILLA, E.; STROHMENGER, L.; VOGEL, G. The effect of storage in liquid nitrogen on the isolation of oral yeasts in human saliva. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.37, n.3, p.237-239, Mar. 1992.
16. BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.61-69, Feb. 1990.
17. BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; LOMBARDI, T. Antifungal therapy in the oral cavity. **Periodontol 2000**, Copenhagen, v.10, p.89-106, Feb. 1996.
18. CANNON, R.D.; NAND, A.K.; JENKINSON, H.F. Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hidroxyapatite. **Microbiology**, Reading, v.141, n.1, p.213-219, Jan. 1995.
19. CANNON, R.D.; CHAFFIN, W.L. Oral colonization by *Candida albicans*. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v.10, n.3, p.359-383. 1999.
20. CANNON, R.D.; HOLMES, A.R.; MASON, A.B.; MONK, B.C. Oral Candida: Clearance, Clonization, or Candidiasis? **J Dent Res**, Chicago, v.74, n.5, p.1152-1161, May. 1995.
21. CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J Dent Res**, Chicago, v.72, n.1, p.37-45, Jan. 1993.

22. CLARKSON, B.H.; KRELL, D.; WEFEL, J.S.; CRALL, J.; FEAGIN, F.F. *In vitro* caries-like lesions production by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus* using sucrose and starch. **J Dent Res**, Chicago, v.66, n.3, p.795-798, Mar. 1987.
  
23. CONTRERAS, I.; PONTON J.; QUINDOS, G. Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.18, n.3, p.480-481, Mar. 1994.
  
24. COULTER, W.A.; MURRAY, S.D.; KINIRONS, M.J. The use of a concentrated oral rinse culture technique to sample oral *Candida* and lactobacilli in children, and the relationship between *Candida* and lactobacilli levels and dental caries experience: a pilot study. **Int J Paediatr Dent**. Oxford, v.3, n.1, p.17-21, Mar.1993.
  
25. COUNCIL FOR INTERNATIONAL ORGANIZATIONS OF MEDICAL SCIENCES. Mycoses. International nomenclature of diseases. Switzerland: CIOMS (World Health Organisation): 1982.
  
26. CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.45, p.187-218. 1991.
  
27. DARWAZEH, 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.
  
28. DERKSON, G.D.; PONTI, P. Nursing bottle syndrome: prevalence and etiology in a nonfluoridated city. **J Can Dent Assoc**, Toronto, v.48, n.6, p.389-393, Jun. 1982.
  
29. DIAMOND, R.D. Interactions of phagocytic cells with *Candida* and other opportunistic fungi. **Arch Med Res**, New York, v.24, n.4, p.361-369, Winter. 1993.

30. DOROČKA-BOBKOWSKA, B.; BUDTZ-JÖRGENSEN, E.; WŁOCH, S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. **J Oral Pathol Med** Copenhagen, v.25, n.8, p.411-415, Sep. 1996.
31. EDWARDS, J.E.J.; MAYER, C.L.; FILLER, S.G.; WADSWORTH, E.; CALDERONE, R.A. Cell extracts of *Candida albicans* block adherence of the organisms to endothelial cells. **Infect Immun**, Washington, v.60, n.8, p.3087-3091, Aug. 1992.
32. EGGERT, F.M.; DREWELL, L.; BIGELOW, J.A.; SPECK, J.E.; GOLDNER, M. The pH of gingival crevices and periodontal pockets in children, teenagers and adults. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.36, n.3, p.233-238. 1991.
33. FIDEL, P.L.Jr.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: a review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v.12, n.1, p.80-96, Jan. 1999
34. FLETCHER, J.; MATHER, J.; LEWIS, M.J.; WHITING, G. Mouth lesions in iron-deficient anemia: relationship to *Candida albicans* in saliva and to impairment of lymphocyte transformation. **J Infect Dis**, Chicago, v.131, n.1, p.44-50, Jan. 1975.
35. 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.
36. GÁBRIS, K.; NAGY, G.; MADLÉNA, M.; DÉNES, Z.S.; MÁRTON, S.; ZESZTHELYI, G.; BÁNČZY, J. 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.

37. 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.
38. HALEY, L. Identification of yeast in clinical microbiological laboratories. **Am J Med Technol**, Houston, v.37, n.4, p.125-131, Apr. 1971.
39. HANNULA, J.; SAARELA, M.; JOUSIMIES-SOMER, H.; TAKALA, A.; SYRJANEN, R.; KONÖNEN, E.; ASIKAINEN, S. 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.
40. HASENCLEVER, H.F. The consistent formation of chlamydospores by *Candida tropicalis*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.9, n.2, p.164-166, Jul. 1971.
41. HASENCLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, Washington, v.82, p.570-573. 1961. *Apud* LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
42. HELLSTEIN, J.; VAWTER-HUGART, H.; FOTOS, P.; SCHMID, J.; SOLL, D.R. Genetic similarity and phenotypic diversity of commensal and pathogenic strains of *Candida albicans* isolated from the oral cavity. **J Clin Microbiol**, Washington, v.31, n.12, p.3190-3199, Dec. 1993.
43. 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, p.296-301. 1972.
44. HOLMES, A.R.; CANNON, R.D.; JENKINSON, H.F. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. **J Ind Microbiol**, Amsterdam, v.15, n.3, p.208-213, Sep. 1995.

45. HOLMES, A.R.; RODERICK, Mc.N.A.B.; JENKINSON, H.F. *Candida albicans* binding to the oral bacterium *Streptococcus gordonii* involves multiple adhesin-receptor interactions. **Infect Immun**, Whashington, v.64, n.11, p. 4680-4685, Nov. 1996.
46. HOLMSTRUP, P.; AXÉLL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.57-59, Feb. 1990.
47. INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAN AND ANIMAL MYCOLOGY NOMENCLATURE OF MYCOSES. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.18, p.78-84. 1980.
48. JACOB, L.S.; FLAITZ, C.M.; NICHOLS, C.M., HICKS, M.J. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.129, n.2, p.187-194, Feb. 1998.
49. JAINKITTIVONG, A.; JOHNSON, D.A.; YEH, C.K. The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.13, n.3, p.181-187, Jun. 1998.
50. JENKINSON, I.I.F.; LALA, I.I.C.; SHEPHERD, M.G. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans* **Infect Immun**, Washington, v.58, p.1429-1436. 1990.
51. JORGE, A.O.C.; KOGA-ITO, C Y.; GONÇALVES, C.R.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER C.S. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ São Paulo**, São Paulo, v.11, n.4, p.279-285, Out-Dez. 1997.
52. KAMINISHI, H.; HAGIHARA, Y.; HAYASHI, S.; CHO, T. Isolation and characteristics of collagenolytic enzyme produced by *Candida albicans*. **Infect Immun**, Washington, v.53, n.2, p.312-316, Aug. 1986.

53. KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D.; GALLIS, H.A.; MCKINSEY, D.S.; KARCHMER, A.W.; SUGAR, A.M.; SHARKEY, P.K.; WISE, G.J.; MANGI, R.; MOSHER, A.; LEE, J.Y.; DISMUKES, W.E. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.30, n.1, p.14-18, Jan. 2000.
54. KENNEDY, M.J. Inhibition of *Candida albicans* by the anaerobic oral flora of mice *in vitro*. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.19, p.205-208. 1981.
55. KLEINEGGER, C.L.; LOCKHART, S.R.; VARGAS, K.; SOLL, D.R. 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, Sep. 1996.
56. 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.
57. KNIGHTON, H.T. A study of Monilia and other yeast like organisms found in the oral cavity. **J Dent Res**, Chicago, v.18, n. , p.103-125, mês. 1939. *Apud* LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
58. KOBAYASHI, H.; SHIBATA, N.; SUZUKI, S. Evidence for oligomannosyl residues containing both beta -1,2 and alpha -1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. **Infect Immun**, Washington, v.60, n.5, p.2106- 2109, May. 1992.
59. KOEHLER, A.P.; CHU, K.C.; HOUANG, E.T.; CHENG, A.F. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **J Clin Microbiol**, Washington, v.37, n.2, p.422-426, Feb. 1999.

60. KROGH, P.; HALD, B.; HOLMSTRUP, P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine. **Carcinogenesis**, New York, v.8, n.10, p.1543-1548, Oct. 1987.
61. LACAZ, C.S. *Candidíases*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
62. LAMKIN, M.S.; OPPENHEIM, F.G. Structural features of salivary function. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v.4, n.3-4, p.251-259. 1993.
63. 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.
64. LEHNER, T. Chronic candidiasis. **Br Dent J**, London, v.116, p.539-545. 1964.
65. LEHNER, T. Oral candidosis. **Dent Pract Dent Rec**, Bristol, v.17, n.6, p.209-216, Feb. 1967.
66. LENANDER-LUMIKARI, M. Inhibition of *Candida albicans* by the peroxidase/SCN-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.7, n.5, p.315-320, Oct. 1992.
67. LILIENTHAL, B. Studies of the flora of the mouth. III. Yeast-like organisms: some observations on their incidence in the mouth. **Aust J Exp Biol Med Sci**, Adelaide, v.28, n.3, p.279-286, May. 1950. Apud LACAZ, C.S. *Candidíases*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1980.
68. LOCKHART, S.R.; REED, B.D.; PIERSON, C.L.; SOLL, D.R. Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain 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.

69. LODDER, J. **The yeast: A taxonomic study**. Amsterdam : North-Holland Publishing Company, 1971. p.914-920, 968-970, 982-985, 1022-1024, 1059-1063.
70. LOESCHE, W.J. **Cárie Dental: Uma infecção tratável**. São Paulo : Editora Cultura Médica. 1993
71. LOESCHE, W.J.; GUSBERTI, F.; METTRAUX, G.; HIGGINS, T.; SYED, S. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. **Infect Immun**, Washington, v.42, n.2, p.659-667, Nov. 1983.
72. LYNCH, E.; BEIGHTON, D. A comparison of primary root caries lesions classified according to colour. **Caries Res**, Basel, v.28, n.4, p.233-239. 1994.
73. MAGEE, B.B.; D'SOUZA, T.M.; MAGEE, P.T. Strain and species identification by restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal DNA repeat of *Candida* species. **J Bacteriol**, Washington, v.169, n.4, p.1639-1643, Apr. 1987.
74. MANNING, D.J.; COUGHLIN, R.P.; POSKITT, E.M.E. *Candida* in the mouth or dummy? **Arch Dis Child**, London, v.60, n.4, p.381-382, Apr. 1985.
75. MARCHANT, S.; BRAILSFORD, S.R.; TWOMEY, A.C.; ROBERTS, G.J.; BEIGHTON, D. The predominant microflora of nursing caries lesions. **Caries Res**, Basel, v.35, n.6, p.397-406, Nov-Dec. 2001.
76. MARTIN, M.V. Germ-tube positive *Candida tropicalis*. **Am J Clin Pathol**, Philadelphia, v.71, p.130-131. 1979.

77. MARTIN, M.V.; WILKINSON, G.R. The oral yeast flora of 10-year-old schoolchildren. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.21, n.2, p.129-135, Jun. 1983.
78. MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.17, n.2, p.153-164, Aug. 1993.
79. MATTOS-GRANER, R.O.; RONTANI, R.M.P.; GAVIÃO, M.B.D.; BOCATTO, H.A.C.R. Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community Dent Health**, London, v.13, n.2, p.96-98, June. 1996.
80. 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 stellatoidea*. **J Clin Microbiol**, Washington, v.37, n.2, p.417-421, Feb. 1999.
81. MOALIC, E.; GESTALIN, A.; QUINIO, D.; GEST, P.E.; ZERILLI, A.; LE FLOHIC, A.M. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. **Caries Res**, Basel, v.35, n.2, p.149-155, Mar-Apr. 2001.
82. MONOD, M.; PORCHET, S.; BAUDRAZ-ROSSELET, F. ET AL. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. **J Med Microbiol**, London, v.32, n.2, p.123-129, Jun. 1990.
83. MOREIRA, D.; SPOLIDORIO, D.M.; RODRIGUES, J.A.; BORIOLLO, M.F. PEREIRA CV, ROSA EA, HÖFLING, J.F. *Candida spp.* biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba-SP, Brazil. **Pesqui Odontol Bras**, São Paulo, v.15, n.3, p.187-195, Jul-Sep. 2001.

84. MORITA, M. C.; WALTER, L.R.F.; GUILLAIN, M. Prévalence de la carie dentaire chez de enfants brésiliens de 0 à 36 mois. **J d'Odontostomatol Pédiatr**, v.3, n.1, p.19-28, Mars. 1993.
85. NAIR, R.G.; SAMARANAYAKE, L.P. The effect of oral commensal bacteria on candidal adhesion to denture acrylic surfaces. An *in vitro* study. **APMIS**, Copenhagen, v.104, n.5, p.339-349, May.1996.
86. NEGRONI, M.; GONZALEZ, M.I.; LEVIN, B.; CUESTA, A.; IOVANNITI, C. *Candida* carriage in the oral mucosa of a student population: adhesiveness of the strains and predisposing factors. **Rev Argent Microbiol**, Buenos Aires, v.34, n.1, p.22-28, Jan-Mar. 2002.
87. NIESTERS, H.G.M.; GOESSENS, W.H.F.; MÉIS, J.F.M.G.; QUINT, W.G. Rapid, polymerase chain reaction-based identification assays for *Candida* species. **J Clin Microbiol**, Washington, v.31, n.4, p.904-910. 1993.
88. NIKAWA, H.; SAMARANAYAKE, L.P.; TENOVUO, J.; PANG, K.M.; HAMADA, T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.38, n.12, p.1057-1063, Dec. 1993.
89. NIKAWA, H.; NISHIMURA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L.P. The role of salivary or serum pellicle in the colonization process of *Candida albicans* on denture acrylic in vitro. **Microb Ecol Health Dis**, Oslo, v.9, p.35-48. 1996.
90. ODDS, FC.; ABBOTT, A.B. A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. **Sabouraudia**, Edinburgh, v.18, n.4, p.301-317, Dec.1980.

91. ODDS, F.C. *Candida* infections: an overview. **Crit Rev Microbiol**, Boca Raton, v.15, n.1, p.1-5. 1987.
92. ODDS, F.C. ***Candida and candidosis***. 2nd ed. London : Baillière Tindall: 1988. 468p.
93. ODDS, F.C. Sabouraud('s) agar. **J Med Vet Mycol**, Abingdon, v.29, n.6, p.355-359. 1991.
94. ODDS, F.C. Mycology in oral pathology. **Acta Stomatol Belg**, Bruxelles, v.94, n.2, p.75-80, Jun. 1997.
95. ODDS, F.C.; BERNAERTS, R. 1994. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **J Clin Microbiol**, Washington, v.32, n.8, p.1923-1929, Aug. 1994.
96. OLLILA, P.; NIEMELÄ, M.; UHARI, M.; LARMAS, M.. Risk factors for colonization of salivary lactobacilli and *Candida* in children. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.55, n.1, p.9-13, Jan. 1997.
97. OLSEN, I.; STENDERUP, A. Clinical mycologic diagnosing of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.11-18, Feb. 1990.
98. PAGANO, J.; LEVIN, J.D.; TREJO, W. Diagnostic medium for differentiation of species of *Candida*. **Antibiot Ann**, v.58, p.137-143. 1958. *Apud* WILLIAMS, D.W.; LEWIS, M.A.O. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **Oral Dis**, Copenhagen, v.6, n.1, p.3-11, Jan. 2000.
99. PARVINEN, T.; LARMAS, M. The relation of stimulated salivary flow rate and pH to *Lactobacillus* and yeast concentrations in saliva. **J Dent Res**, Chicago, v.60, n.12, p.1929-1935, Dec. 1981.

100. PERRY, J.L.; MILLER, G.R. Umbelliferyl-labelled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, Washington, v.25, p.2424-2425. 1988.
101. PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **J Clin Microbiol**, Washington, v.34, n.1, p.51-61, Jan. 1996.
102. 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.
103. PINJON, E.; SULLIVAN, D.; SALKIN, I.; SHANLEY, D.; COLEMAN, D. Simple, inexpensive, reliable, method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, Washington, v.36, n.7, p.2093-2095, Jul. 1998.
104. PINTO, V.G. Saúde Bucal: odontologia social e preventiva. 3.ed. São Paulo : Santos, 1992. 415p.
105. PITTET, D.; MONOD, M.; SUTER, P.M.; FRENK, E.; AUCKENTHALER, R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. **Ann Surg**, Philadelphia, v.220, n.6, p.751-758, Dec. 1994.
106. POWDERLY, W.G.; ROBINSON, K.; KEATH, E.J. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. **J Infect Dis**, Chicago, v.168, n.2, p.463-466, Aug. 1993.

107. RADFORD, J.R.; BALLANTYNE, H.M.; NUGENT, Z.J.; BEIGHTON, D.; ROBERTSON, M.; LONGBOTTOM, C.; PITTS, N.B. Caries-associated microorganisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. **J Dent**, Oxford, v.28, n.5, p.307-312, Jul. 2000.
108. RAMS, T.E.; BABALOLA, O.O.; SLOTS, J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.5, p.166-168. 1990.
109. RAMS, T.E.; SLOTS, J. *Candida* biotypes in human adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.6 ,n.3, p.191-192, Jun. 1991.
110. RIPA, L.W. Nursing caries: a comprehensive review. **Pediatr Dent**, Chicago, v.10, n.4, p.268-282, Dec. 1988.
111. ROGERS, T. J.; BALISH, E. Immunity to *Candida albicans*. **Microbiol Rev**, Washington, v.44, n.4, p.660-682, Dec. 1980.
112. ROWEN, J.L.; TATE, J.M.; NORDOFF, N.; PASSARELL, L.; MCGINNIS, M.R. *Candida* isolates from neonates: frequency of misidentification and reduced fluconazole susceptibility. **J Clin Microbiol**, Washington, v.37, n.11, p.3735-3737, Nov. 1999.
113. RUSSELL, 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.

114. SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Biotechnology**, Washington, v.24, n. , p.476-480. 1992.
115. SAIMAN, L.; LUDINGTON, E.; DAWSON, J.D.; PATTERSON, J.E.; RANGEL-FRAUSTO, S.; WIBLIN, R.T.; BLUMBERG, H.M.; PFALLER, M.; RINALDI, M.; EDWARDS, J.E.; WENZEL, R.P.; JARVIS, W. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. **Pediatr Infect Dis J**, Baltimore, v.20, n.12, p.1119-1124, Dec. 2001.
116. SAMARANAYAKE, L.P.; GEDDES, D.A.M.; WEETMAN, D.A.; MACFARLANE, T.W. Growth and acid production of *Candida albicans* in carbohydrate supplemented media. **Microbios**, Cambridge, v.37, n.148, p.105-115. 1983.
117. SAMARANAYAKE, L.P.; HUGHES, A.; WEETMAN, D.A.; MacFARLANE, T.W. 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. 1986a.
118. SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W.; LAMEY, P.J.; FERGUSON, M.M. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.15, n.7, p.386-388, Aug. 1986b.
119. SANDVEN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.27-36, Feb. 1990.

120. SCHEMMEL, R.A.; KROHN-LUTZ, K.; LYNCH, P.; KABARA, J.J. 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.
121. SCHMID, J.; ODDS, F.C.; WISELKA, M.J.; NICHOLSON, K.G.; SOLL, D.R. Genetic similarity and maintenance of *Candida albicans* strains from a group of AIDS patients, demonstrated by DNA fingerprinting. **J Clin Microbiol**, Washington, v.30, n.4, p.935-941, Apr. 1992.
122. SCULLY, C.; el-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, Alexandria, v.5, n.2, p.125-157. 1994.
123. SEN, B.H.; SAFAVI, K.E.; SPANBERG, L.S.W. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.42, n7, p.513-520, Jul. 1997.
124. SHARP, A.M.; ODDS, F.C.; EVANS, E.G.V. *Candida* strains from neonates in a special care baby unit. **Arch Dis Child**, London, v.67, n.1, p.48-52, Jan.. 1992.
125. SHERWOOD, J.; GOW, N.A.R.; GOODAY, G.W.; GREGORY, D.W.; MARSHALL, D. Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration. **J Med Vet Mycol**, Abingdon, v.30, n.6, p.461-469. 1992.
126. SIO, J.O.; MINWALLA, F.K.; GEORGE, R.H.; BOOTH, I.W. Oral candida: is dummy carriage the culprit? **Arch Dis Child**, London, v.62, n.4, p.406-408, Apr. 1987.
127. SLOTS, J.; RAMS, T.E. New views on periodontal microbiota in special patient categories. **J Clin Periodontol**, Copenhagen, v.18, n.6, p.411-420, Jul. 1991.

128. SOLL, D.R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v.5, n.2, p.183-203, Apr. 1992.
129. SOLL, D.R. *Candida* commensalisms and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Trop**, Amsterdam, v.81, n.2, p.101-110, Feb. 2002.
130. STARR, J.R.; WHITE, T.C.; LEROUX, B.; LUIS, H.S.; BERNARDO, M.; LEITÃO, J.; ROBERTS, M.C. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.17, n.5, p.304-310, Oct. 2002.
131. STENDERUP, A. Oral mycology. **Acta Odont Scand**, Oslo, v.48, n.1, p.3-10, Feb. 1990.
132. STEVENS, D.A.; ODDS, F.C.; SCHERER, S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. **Rev Infect Dis**, Chicago, v.12, n.2, p.258-266, Mar-Apr. 1990.
133. SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **J Clin Microbiol**, Washington, v.36, n.2, p.329- 334, Feb. 1998.
134. SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiology**, Reading, v.141, n.7, p.1507-1521, Jul. 1995.
135. SZIEGOLEIT, F.; SZIEGOLEIT, A.; WETZEL, W.E. Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida*. **Med Mycol**, Oxford, v.37, n.5, p.345-350, Oct. 1999.

136. TOBGI, R.S.; SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to lysozyme. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v.3, n.1, p.35-39, Mar. 1988.
137. TOMITA, N. E.; BIJELLA, V. T.; LOPES, E.S.; FRANCO, L. Prevalência de cárie dentária em crianças da faixa etária de 0 a 6 anos matriculadas em creches: importância de fatores sócio-econômicos. **Rev Saude Pública**, v. 30, n.5, p.413-420, Out. 1996.
138. Van BURIK, J.A.H.; MAGEE, P.T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Annu Rev Microbiol**, Palo Alto, v.55, p.743-772. 2001.
139. VITKOV, L.; WEITGASSER, R.; LUGSTEIN, A.; NOACK, M.J.; FUCHS, K.; KRAUTGARTNER, W.D. Glycaemic disorders in denture stomatitis. **J Oral Pathol Med** Copenhagen, v.28, n.9, p.406-409, Oct. 1999.
140. WAGGONER-FOUNTAIN, L.A.; WALKER, M.W.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A.; FERGUSON, J.E.; WENZEL, R.P.; DONOWITZ, L.G. Vertical and horizontal transmission of unique *Candida* species to premature newborns. **Clin Infect Dis**, Chicago, v.22, n.5, p.803-808, May. 1996.
141. WEBSTER, C.E.; ODDS, F.C. Growth of pathogenic *Candida* isolates anaerobically and under elevated concentrations of CO<sub>2</sub> in air. **J Med Vet Mycol**, Abingdon, v.25, p.47-53. 1986.
142. WETZEL, W.E.; HANISCH, S.; SZIEGOLEIT, A. The germ colonization of the oral cavity in small children with the nursing bottle syndrome. **Schweiz Monatsschr Zahnmed** v.103, n.9, p.1107-1112. 1993.

143. WHELAN, W.L.; KIRSCH, D.R.; KWON-CHUNG, K.J.; WAHL, S.M.; SMITH, P.D. *Candida albicans* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: absence of a novel or hyper virulent strain. **J Infect Dis**, Chicago, v.162, n.2, p.513-518, Aug. 1990.
144. WHITE, T.C.; MIYASAKI, S.H.; AGABIAN, N. Three distinct secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, Washington, v.175, n.19, p.6126-6133, Oct. 1993.
145. WHITE, T.C. Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **ASM News**, Ann Arbor, v.63, p.427-433. 1997.
146. WICKES, B.L.; HICKS, J.B.; MERZ, W.G.; KWON-CHUNG, K.J. The molecular analysis of synonymy among medically important yeasts within the genus *Candida*. **J Gen Microbiol**, Cambridge, v.138, n.5, p.901-907, May. 1992.
147. WILLIAMS, D.W.; LEWIS, M.A.O. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity, **Oral Dis**, Copenhagen, v.6, n.1, p.3-11, Jan. 2000.
148. WILLIAMSON, J.J. A study of extent of variation in daily counts of *Candida albicans* in saliva. **Aust Dent J**, Sydney, v.17, n.2, p.106-109, Apr. 1972.
149. WU, T.; SAMARANAYAKE, L.P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **J Med Microbiol**, London, v.48, n.8, p.711-720, Aug. 1999.
150. YÜCESOY, M.; ESEN, N.; YULUG, N. Use of chromogenic tube and methyl blue-sabouraud agar for the identification oação Brasileira de Normas Técnicas, 2000.

## ANEXO 1

Características bioquímicas, de microcultivo e formação de tubo germinativo de espécies do gênero *Candida*.

Espécies de <i>Candida</i>	Fermentação				Assimilação						T.G.	C.	P.H.
	Gl.	Sac.	Ma.	La.	Gl.	Ga.	Sac	Ma.	La.	Xyl			
<i>C. albicans</i>	AG	A/-	AG	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>C. dubliniensis</i>	AG	A/-	AG	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	AG	A/AG	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. krusei</i>	AG	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	AG	-/-	-/-	-/-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>C. pseudotropicalis</i>	V	V	V	V	+	+	+	-	+	V	-	-	+
<i>C. tropicalis</i>	AG	AG	AG	-/-	+	+	+	+	-	+	-	V	+
<i>C. glabrata</i>	AG	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Baseado em SAMARANAYAKE & Mc FARLANE, 1990 e SANDVEN, 1990.

A= produção de ácido

B= produção de gás

V= variável (+ou-)

T.G. – Tubo Germinativo

C. = Clamidósporos

P.H. = Pseudo-hifas

## ANEXO 2

Padrão de cárie na dentição decídua de crianças com cárie rampante:

<i>Superfície</i>	<i>Incisivo Central</i>		<i>Incisivo Lateral</i>		<i>Canino</i>		<i>Primeiro Molar*</i>		<i>Segundo Molar*</i>	
	<i>Max</i>	<i>Mand</i>	<i>Max</i>	<i>Mand</i>	<i>Max</i>	<i>Mand</i>	<i>Max</i>	<i>Mand</i>	<i>Max</i>	<i>Mand</i>
Vestibular	X		X		X	X				
Lingual	X		X		X	X				
Mesial	X		X		X	X				
Distal	X		X		X	X				
Oclusal	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X

Rippa, 1988

- Outras superfícies poderão estar envolvidas.

### ANEXO 3

**Título da pesquisa:** Prevalência de *Candida spp.* em crianças com cárie precoce na infância, antes e após o tratamento odontológico

**Pesquisadores:** Magda Elizabeth Baglioni Gouvêa; Prof. Dr. José Francisco Höfling

**Local:** FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - UNICAMP

**Introdução:** Por favor, leia este termo cuidadosamente, pois as informações a seguir irão descrever esta pesquisa e sua função nela como participante. Caso tenha qualquer dúvida sobre este estudo ou termo, você deverá esclarecê-la com os pesquisadores responsáveis pelo trabalho.

**Propósito:** Você está tendo a oportunidade de participar de uma pesquisa cujos objetivos principais são o estudo de algumas espécies de microrganismos que geralmente estão presentes na boca de seres humanos saudáveis. O microrganismo que iremos estudar pertence ao gênero *Candida*, que está relacionado com manifestações orais como a candidose (por exemplo, as placas brancas que aparecem na boca de alguns recém-nascidos durante os primeiros meses de vida, chamada popularmente de “sapinho”). Nosso objetivo é estudar a presença deste microrganismo na cavidade bucal de voluntários que não tenham ou tenham tido cárie e voluntários que tenham cárie ativa. Estes dois grupos de voluntários participarão de um programa preventivo e restaurador (no caso da presença de cárie). Serão coletadas amostras da saliva de criança, da bochecha, da superfície da língua e da superfície dos dentes, passando-se delicadamente uma haste de algodão esterilizada sobre estas superfícies (semelhante a um “cotonete”). Esta coleta será feita na primeira consulta, antes da criança começar o tratamento, e no final deste. Os resultados desta pesquisa irão mostrar se a doença cárie, e outros fatores exercem influência na presença ou não destes microrganismos, e se após o tratamento da doença cárie a quantidade e o tipo de microrganismo se alteram. Você deve decidir se deseja ou não colaborar com esta pesquisa, entendendo-a o suficiente para fazer uma decisão consciente.

**Descrição do estudo:** Participarão deste estudo crianças na faixa etária de 24-36 meses de idade, de ambos os sexos. Os voluntários da pesquisa serão divididos em dois grupos: Grupo 1 - crianças que apresentem cárie dental e Grupo 2 - crianças sem cárie. O tratamento para as crianças com cárie (grupo 1) será a reabilitação total da cavidade bucal, com restaurações de todas as cavidades. Para o grupo 2, crianças sem cárie, o tratamento se baseará no ensino e motivação de técnicas de escovação e uso de fio dental. O paciente retornará após 3 meses terminado o tratamento para controle.

**Coleta dos microrganismos:** O procedimento da coleta não representa nenhum risco nem desconforto aos voluntários. Como dito anteriormente a coleta de amostras da saliva, superfície dos dentes, bochecha e superfície da língua será realizada com o auxílio de uma haste de algodão estéril, que será passado delicadamente sobre a superfície dos dentes, dorso da língua e bochechas. A saliva será coletada mantendo-se a ponta da haste por 10 segundos embaixo da língua.

Após a coleta, este material seguirá para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da F.O.P. – Unicamp, onde será analisado.

**Desconfortos e Riscos:** Os métodos utilizados nos exames clínicos, radiográficos, tratamento odontológico integral, coleta de amostra para análise microbiológica e entrevista, aos quais os pacientes da pesquisa serão submetidos não são traumáticos e não conferem risco ao paciente.

**Benefícios esperados:** Ao ser voluntário, o paciente além de estar contribuindo para uma pesquisa que trará benefícios para a comunidade, receberá o tratamento odontológico integral e acompanhamento até 3 meses após o tratamento, onde estará em contato com orientação de técnicas preventivas e um ambiente propício para a sua saúde bucal.

**Informações:** Os voluntários e seus pais/responsáveis têm garantia de que receberão respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, benefícios e aspectos pertinentes à pesquisa. A pesquisadora e seu orientador assumem o

compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

**Retirada de consentimento:** Os voluntários e seus pais/responsáveis têm a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

**Garantia de sigilo:** Os dados obtidos na pesquisa têm finalidade exclusivamente científica, sendo assegurada privacidade e não-estigmatização dos sujeitos da pesquisa. Os resultados deste projeto de pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revista científica, porém a identidade do voluntário não será divulgada nessas apresentações.

**Indenização aos danos:** Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

**Aspecto legal:** O projeto foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisas envolvendo seres humanos atendendo à resolução n. 196, de 10 de Outubro de 1996, do conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – Brasília-DF.

**Previsão de ressarcimentos de gastos:**

O tratamento odontológico será realizado na clínica de especialização em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP. Sempre que necessário, despesas com transporte serão ressarcidas ao paciente.

**Contatos:** Se ainda houver qualquer dúvida você poderá receber mais esclarecimentos conversando pessoalmente com a mestrandia Magda Elizabeth Baglioni Gouvêa (examinadora), ou pelos telefones (019) 432-5871 ou 9716-7165; ou ligando para : Prof. José Francisco Höfling, pelo telefone (019) 430-5322. Você poderá também discutir seus direitos como paciente de pesquisa com o presidente da Comissão de Ética da

FOP/UNICAMP, escrevendo para o seguinte endereço: Av. Limeira, 901 – CEP/FOP – 13414-900- Piracicaba – SP.

### Termo de Consentimento

Eu, \_\_\_\_\_  
responsável legal pelo(a) paciente \_\_\_\_\_  
por este instrumento de AUTORIZAÇÃO POR MIM ASSINADO, dou pleno consentimento aos pesquisadores para fazer qualquer diagnóstico, planejamento e tratamento de meu filho(a), de acordo com os conhecimentos enquadrados no campo da Odontologia Infantil.

Li o **Termo de Informação e Consentimento** para participação em Pesquisa Clínica, que foi me explicado dentro da minha compreensão. Também tirei minhas dúvidas sobre este estudo com o pesquisador até minha completa satisfação. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades e sem prejudicar ou influenciar os resultados do estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e também autorizo a liberação dos dados obtidos da pesquisa através de radiografias, fotografias, modelos, históricos de antecedentes familiares, resultados de exames clínicos e laboratoriais e quaisquer outras informações concernentes ao diagnóstico, planejamento e/ou tratamento, aos pesquisadores, ao patrocinador e para publicação em e congressos e revistas científicas do país e do exterior.

\*Não assine este termo se não teve a oportunidade de solucionar suas dúvidas e recebido respostas satisfatórias a todas elas.

Piracicaba, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 200\_\_.

Nome (legível) \_\_\_\_\_

R.G. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Assinatura do (a) responsável pelo paciente*



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
**CERTIFICADO**

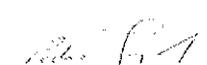


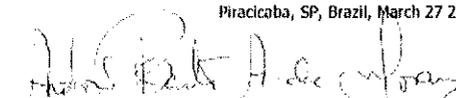
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Incidência de *Candida* sp. em crianças com cárie, na faixa etária de 24 a 36 meses, antes e após tratamento dentário", sob o protocolo nº 127/2000, da Pesquisadora **Magda Elizabeth Baglioni Gouvêa**, sob a responsabilidade dos Profs. Drs. **José Francisco Höfling e Regina Maria Puplin Rontani**, 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, 27 de março de 2001

We certify that the research project with title "Incidence of *Candida* sp. in caries-active children aging 2 to 3 years-old, before and after dental treatment", protocol nº 127/2000, by Researcher **Magda Elizabeth Baglioni Gouvêa**, responsibility by Prof. Dr. **José Francisco Höfling and Regina Maria Puplin Rontani**, 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 27 2001

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

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

## ANEXO 5

### QUESTIONÁRIO PADRÃO

Data \_\_/\_\_/\_\_

#### 1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: \_\_\_\_\_ Apelido: \_\_\_\_\_  
Data de nascimento \_\_/\_\_/\_\_ Idade \_\_ anos e \_\_ meses  
Sexo \_\_ Raça \_\_\_\_\_  
Endereço \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_  
Cidade \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_ Telefone \_\_\_\_\_ Mãe \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Idade: \_\_ anos

Estado civil: solteiro casado divorciado viúvo outros

Grau de instrução: sem escolaridade 1<sup>o</sup>. grau 2<sup>o</sup>. grau  
superior

Profissão: \_\_\_\_\_  
Endereço comercial \_\_\_\_\_

**Pai** \_\_\_\_\_ Idade: \_\_ anos  
Estado civil: solteiro casado divorciado viúvo outros

Grau de instrução: sem escolaridade 1<sup>o</sup>. grau 2<sup>o</sup>. grau  
superior

Profissão: \_\_\_\_\_  
Endereço comercial \_\_\_\_\_

**Irmãos** \_\_\_\_\_ Idades \_\_\_\_\_

Renda familiar total \_\_\_\_\_  
Pediatria ou clínico responsável \_\_\_\_\_

#### 2. HISTÓRIA PRÉ-NATAL

GRAVIDEZ - Normal Anormal

Manifestações durante a gravidez:

Doenças \_\_\_\_\_

Medicamentos \_\_\_\_\_

Ingestão freqüente de alimentos açucarados? Sim Não

### 3. HISTÓRIA NATAL

PARTO - Normal      Fórceps      Cesariana

Complicações durante o parto \_\_\_\_\_

NASCIMENTO - a termo      prematuro      \_\_\_\_ meses

Peso \_\_\_\_\_      Altura \_\_\_\_\_

### 4. HISTÓRIA NEO-NATAL

Problemas durante o primeiro mês de vida

Icterícia

Febre alta

Doenças graves

Dificuldades respiratórias

Dificuldades de alimentação

Dentes do nascimento ao primeiro mês

Candidose (sapinho)

Comentários \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### 5. HISTÓRIA PÓS-NATAL

Doenças sistêmicas (época):

\_\_\_\_\_

(alergia, diabete, problemas respiratórios, problemas renais, discrasias sanguíneas, problemas cardíacos, desidratação, febre reumática, verminose, hepatite, anemia, outros)

Doenças da infância (época)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(catapora, coqueluche, sarampo, caxumba, escarlatina, rubéola, outros)

HOSPITALIZAÇÃO      Sim      Não

Motivo \_\_\_\_\_

Medicamentos \_\_\_\_\_

(antibióticos, anti-inflamatórios, analgésicos, anticonvulsivos, antitussígeno, descongestionantes, antialérgicos, vitaminas, outros)

Vacinas \_\_\_\_\_

Informações médicas adicionais \_\_\_\_\_

Data do último exame médico \_\_\_\_\_

## 6. ANTECEDENTES HEREDITÁRIOS

Doenças na família (diabetes, problemas cardíacos, problemas respiratórios, problemas hematológicos, outros)

## 7. ALIMENTAÇÃO

Amamentação natural

até quantos meses? \_\_\_\_\_

mama ou mamou no seio à noite? Sim. Até \_\_\_\_\_ meses Não

antes da hora de dormir

várias vezes durante a noite

Qual o tempo de duração das mamadas? \_\_\_\_\_

Toma mamadeira suplementar? Sim Não

Desmame (como e quando ocorreu): \_\_\_\_\_

### Alimentação artificial:

leite de vaca

leite de soja

leite em pó Marca \_\_\_\_\_

adoçante açúcar mel outros \_\_\_\_\_

Mamadeira noturna: Sim Não

- frequência das mamadeiras: \_\_\_\_\_

- comportamento da mãe durante as mamadas: colo cama

- mamadeira usada como chupeta? Sim Não

- idade da retirada da mamadeira: \_\_\_\_\_

- outros líquidos: mamadeira copo

- idade que começou a comer frutas e tomar sopa: \_\_\_\_\_

- considera a alimentação do seu filho equilibrada? Sim Não

Comentários: \_\_\_\_\_

8. PESO \_\_\_\_\_ Kg ALTURA \_\_\_\_\_ cm

### 10. AVALIAÇÃO PREVENTIVA

Cárie dental na família mãe pai irmãos

Comentários \_\_\_\_\_

Higiene dental: escova fio dental pasta outros

freqüência: \_\_\_\_\_

pais crianças ambos

Informação sobre higiene bucal: Sim Não

por \_\_\_\_\_

Com que idade os dentes de seu filho começaram a ser escovados?

Água fluoretada: sim não

Comprimidos ou gotas: Sim Não

### 11. HISTÓRIA DENTAL

Primeira visita ao dentista \_\_\_\_\_

Comportamento: Bom Regular Ruim

Problemas manifestados:

Cárie

Dor de dente- ao comer espontânea à noite

Abscesso - inflamação Febre

Traumatismo

Dentes manchados

sangramento gengival

12. Responsável pelos cuidados diários da criança

mãe: período integral desde que idade? \_\_\_\_\_

avó: período integral desde que idade? \_\_\_\_\_

babá: período integral desde que idade? \_\_\_\_\_

creche período integral desde que idade? \_\_\_\_\_

outros \_\_\_\_\_

**12. EXAME CLÍNICO**

Exame extra-bucal:

\_\_\_\_\_

Exame intrabucal:

Lábios: \_\_\_\_\_

Freios labiais: \_\_\_\_\_

Comissura: \_\_\_\_\_

Gengiva: \_\_\_\_\_

Língua: \_\_\_\_\_

Anomalias de forma \_\_\_\_\_

Anomalias de número \_\_\_\_\_

Agenesias \_\_\_\_\_

Supranumerários \_\_\_\_\_

Anomalias de tamanho \_\_\_\_\_

Anomalias de estrutura \_\_\_\_\_

Alterações cromáticas \_\_\_\_\_

Freio lingual \_\_\_\_\_

Palato \_\_\_\_\_

Assoalho bucal \_\_\_\_\_  
Fístula \_\_\_\_\_  
Abscessos \_\_\_\_\_  
Traumatismos \_\_\_\_\_  
data \_\_\_\_\_ -tipo \_\_\_\_\_ seqüela \_\_\_\_\_  
Destruições coronárias \_\_\_\_\_  
Dentes decíduos anquilosados \_\_\_\_\_  
Dentes decíduos precocemente perdidos \_\_\_\_\_

### 13. EXAMES COMPLEMENTARES

Radiográfico Técnica: \_\_\_\_\_  
Laboratoriais: \_\_\_\_\_  
Fotografias: \_\_\_\_\_

### 14. DESCRIÇÃO GERAL DO ESTADO CLÍNICO E RADIOGRÁFICO

Lesões brancas ativas e passivas (face e dente) – Clínico e Rx

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Cavidades ativas e passivas (face e dente)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Restaurações (face e dente)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Placa visível/Sangramento gengival (face e dente)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

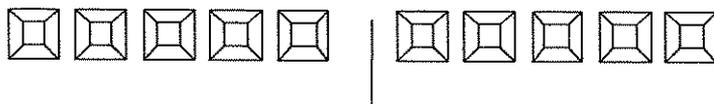
Risco/atividade de cárie \_\_\_\_\_

## 15. ODONTOGRAMAS

Data \_\_/\_\_/\_\_



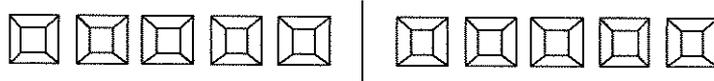
**PALATINA OU LINGUAL**



Data \_\_/\_\_/\_\_



**PALATINA OU LINGUAL**



### QUESTIONÁRIO SÓCIO-ECONÔMICO

- (um círculo) dentes presentes e em irrompimento
- (vermelho) - cárie
- (azul) - tratamento realizado
- (verde) - restauração presente no exame
- mancha branca
- X** - indicado para extração
- /** - extraído

## AVALIAÇÃO SÓCIO-ECONÔMICA

Assinale com um X a quantidade de itens que você possui na sua casa:

Item	Não Tem	Tem					
		1	2	3	4	5	6 ou +
televisão							
rádio							
banheiro							
automóvel							
empregada							
aspirador de pó							
máquina de lavar roupa							

Grau de Instrução do chefe de família:

- Até o primário incompleto
- Até o ginásial incompleto
- Até colegial incompleto
- Até superior incompleto
- Com superior completo

Grau de instrução da mãe:

- sem instrução
- Até o primário incompleto
- Até o ginásial incompleto
- Até colegial incompleto
- Até superior incompleto
- Com superior completo

Renda familiar:

- menos de 1 salário mínimo
- 1 a 2 salários mínimos
- 3 a 4 salários mínimos
- 5 a 6 salários mínimos
- mais de 6 salários mínimos

## ANEXO 6

### MEIOS DE CULTURA

#### Meio Completo para Leveduras (M.C.L.)

Peptona.....	10g
Extrato de Levedura.....	10g
Glucose.....	20g
Fosfato bibásico de potássio.....	0,5g
Ágar.....	20g
Água destilada.....	q.s.p. 1000 ml

Todos os componentes serão adicionados à água destilada e levados a ebulição em banho-maria. Serão fracionados em alíquotas de 10 ml, em tubos de cultura autoclavados a 120°C, sob 1 atm, por 20 minutos. Os tubos serão inclinados enquanto o meio estiver liqüefeito.

#### Meio Ágar Fubá Tween 80:

Fubá.....	40g
Ágar (Difco).....	20g
Tween 80.....	10ml
Água destilada.....	q.s.p. 1000ml

#### Meio para prova de Assimilação de Carboidratos:

Sulfato de Amônia (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> .....	5g
Sulfato de magnésio (MgSO <sub>4</sub> .....	0,5g
Fosfato de Potássio Monobásico(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1g
Ágar (Difco).....	20g
Água destilada.....	q.s.p. 1000ml

#### Solução salina

Sol. de Na Cl a 0,9% em água destilada.

## ANEXO 7

### Higiene bucal em crianças

#### Técnica de higiene

A criança poderá ficar recostada com a cabeça nas pernas da mãe. É importante ter boa visibilidade e posição segura para evitar movimentos bruscos da criança que podem feri-la.

- ✓ É recomendável que você distraia a criança com histórias ou músicas durante o procedimento, pois elas se dispersam rapidamente.
- ✓ É importante que a higiene seja realizada sobre todos os lados de todos os dentes e gengivas.
- ✓ Coloque a cabeça da escova inclinada lateralmente sobre a gengiva e faça movimentos vibratórios circulares várias vezes a cada 2 dentes.
- ✓ Deslize as cerdas de cima para baixo sobre os dentes
- ✓ Repita os itens 1 e 2 em todos os dentes no lado da bochecha e da língua
- ✓ Na região interna dos dentes da frente coloque a escova verticalmente e faça movimentos para cima e para baixo
- ✓ Faça movimentos de vai e vem sobre a superfície mastigatória dos dentes
- ✓ Limpe a língua

A escovação deve ser complementada com o uso do fio dental para a limpeza entre os dentes. Inicie quando a criança já estiver com os 8 primeiros dentes e faça uma vez/dia. Corte um pedaço de aproximadamente 25 cm, enrole nos dedos médios de ambas as mãos; em um enrole um pedaço pequeno e no outro o restante; o espaço contido entre os dedos (2 cm) será utilizado para limpar as áreas de contato dos dentes.

Curve o fio dental formando um “C” sobre a superfície de cada dente e deslize suavemente entre o dente e a gengiva. Repita esse movimento várias vezes entre todos os dentes, desenrolando o fio de um lado e enrolando no outro dedo.

Utilize uma escova com cabeça pequena, cerdas macias e troque-as quando as cerdas começarem a virar para os lados.

O uso de dentifício nessa fase ( 2- 3 anos) deve ser feito com muita moderação apenas 1 vez/dia. Cuide para que seu filho não o engula, já que o flúor, componente presente nos dentifícios, é benéfico na prevenção de cárie, porém quando ingerido em excesso pode provocar o surgimento de manchas nos dentes permanentes que estão em formação.

2 a 8 dentes: quantidade de pasta = tamanho do grão de alpiste

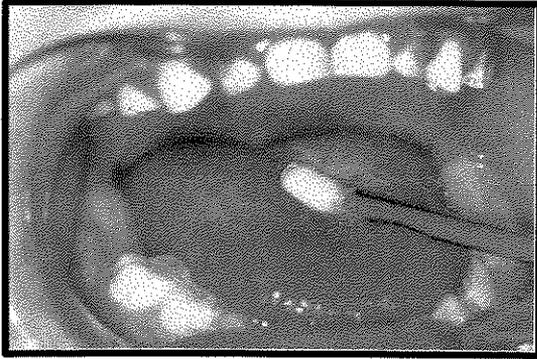
10 a 16 e 20 dentes: quantidade de pasta = tamanho do grão de ervilha

As crianças geralmente querem fazer a escovação sozinhas; é importante que isso seja respeitado e até motivado, mas sempre um adulto deve refazer a limpeza pelo menos uma vez/dia até que a criança esteja com aproximadamente 7 anos de idade.

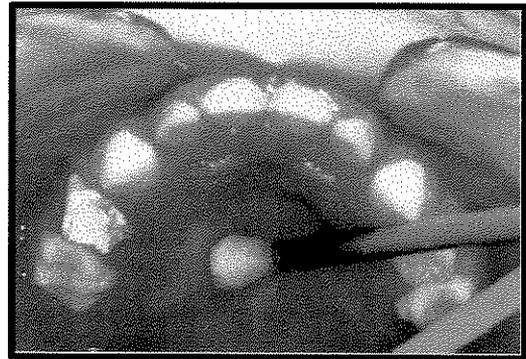
A cárie é uma doença transmissível, e a transmissão ocorre através da saliva. Para prevenir a transmissão evite:

- ✓ Utilizar a sua própria colher, já contaminada, para alimentar a criança
- ✓ Compartilhar com a criança objetos como copos, talheres, escova-de-dentes
- ✓ Beijar a criança na boca

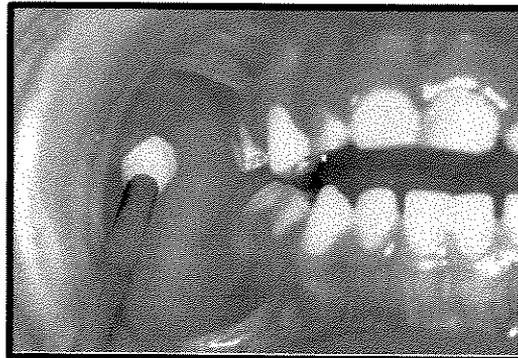
**ANEXO 8**



**Dorso da língua**



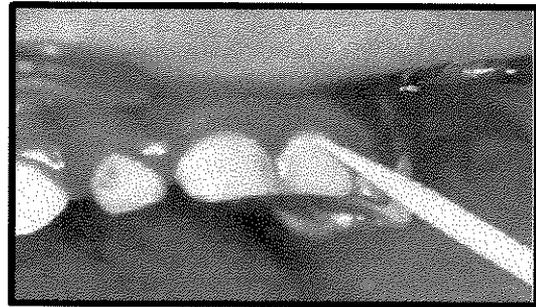
**Palato duro**



**Mucosa jugal**



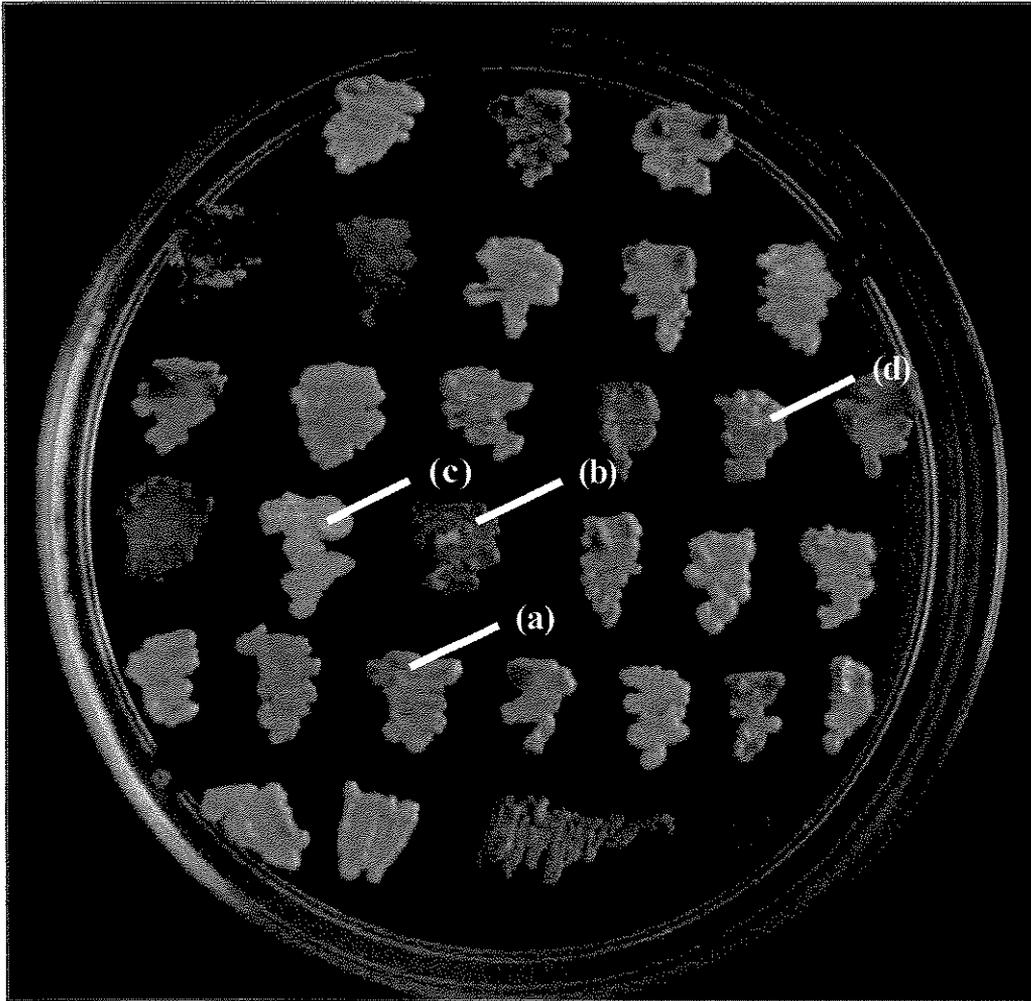
**Saliva**



**Biofilme dental**

Ilustração representativa da coleta das amostras intrabucais

## ANEXO 9



Placa de Petri com amostras de *Candida spp.* isoladas em meio CHROMagar® *Candida*.  
(a) *C. albicans*; (b) *C. tropicalis*; (c) *C. krusei*; (d) *C. spp.*

## ANEXO 10

### QUADRO DA ANALISE DE VARIANCIA

CAUSAS DA VARIACAO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
CARIE	1	1889.9797027	1889.9797027	19.2930	0.00009
SITIO	5	3948.9133844	789.7826769	8.0622	0.00001
TRAT	1	463.0983265	463.0983265	4.7273	0.02847
CAR*SIT	5	1944.4979627	388.8995925	3.9699	0.00198
CAR*TRA	1	452.1867092	452.1867092	4.6160	0.03035
SIT*TRA	5	315.4459241	63.0891848	0.6440	0.66901
CAR*SIT*TRA	5	230.7711636	46.1542327	0.4711	0.79953
RESIDUO	348	34090.6727014	97.9617032		
TOTAL	371	43335.5658746			

DADOS TRANSFORMADOS EM *Log*

MEDIA GERAL = 4.162180

COEFICIENTE DE VARIACAO = 237.798 %

