



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DA FLORA FÚNGICA ORAL EM INDIVÍDUOS
DIABÉTICOS NÃO PORTADORES DE PRÓTESE**

Trabalho submetido por
Vânia Sofia Saraiva Neves
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Maria Guilhermina Martins Moutinho

e coorientado por
Teresa Nascimento

outubro de 2015

Dedicatória

Dedico este trabalho:

À melhor amiga, melhor conselheira, melhor mãe do mundo, por todo o esforço feito e
pela paciência;

Ao melhor pai, melhor ouvinte, que sempre acreditou e nunca me deixou desistir desta
conquista;

À melhor irmã pelos abraços bem apertados quando mais precisei;

Aos amigos que sempre acompanharam este trilha.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”*
(Marthin Luther King)

Agradecimentos

Agradeço à Professora Doutora Guilhermina Moutinho por ter aceite orientar-me neste projeto que hoje entrego como Dissertação de Mestrado. Obrigado pelas palavras de tranquilidade, pelo apoio, pelas críticas e opiniões e por todos os ensinamentos ao longo deste último ano, são sem dúvida enriquecedores e vou fazer uso deles.

À Mestre Teresa Nascimento, que foi incansável comigo, sempre disponível, pronta a ajudar. Obrigado por todo o esforço e empenho e por acreditar sempre em mim, sem me deixar desistir.

Sandra, Susana e Natacha, foram peças fundamentais para que todo o estudo decorresse, foram horas a fio no laboratório e sempre estiveram lá para auxiliar em qualquer necessidade minha. Obrigado pela paciência, pela ajuda e pela boa disposição. Um Obrigado gigante não chega por tudo o que fizeram por mim, Obrigado do fundo do coração.

Agradeço à Prof.^a Doutora Fernanda Mesquita e ao Prof. Doutor José João por terem aceite que a Clínica Dentária Egas Moniz fosse um dos locais de estudo e pudesse recolher as amostras necessárias para que o projeto prosseguisse, e também à Dr. Cristina Ferreira Gomes do laboratório de análises clínicas Lumilabo, Muito Obrigado!

Ao Prof. Doutor Carlos Família, Prof. Doutor Rui Martins e Prof. Doutor José Brito, obrigado pela ajuda no tratamento estatístico, etapa crucial para o desenvolvimento de todo o estudo, Obrigado!

Pai, Mãe e Irmã, obrigado por todo o apoio, por todas as palavras, pela paciência em aturarem o meu mau feitio, por me saberem desculpar quando desatino. Obrigado por estes cinco anos, sem vocês não seria possível, todo o esforço, toda a dedicação, tudo! Obrigado melhor família, é amor incondicional!

Aos amigos que nunca desistiram, sempre acreditaram, sempre se interessaram, Maria Belmira, Sara e Rui (e mais uns quantos que guardo no coração), foram sem dúvida importantes nesta caminhada. Sempre persistiram e nunca me abandonaram. Obrigado por me terem acompanhado e fazerem parte de mim! “Os amigos são a família que eu escolhi”, Obrigado!

Resumo

Objetivos:

Avaliar a prevalência do género *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos diabéticos e não diabéticos, ambos não portadores de prótese dentária; avaliar os fatores de virulência de *Candida* sp. associados às espécies isoladas e ao grupo portador e relacionar os valores de HbA1c com a colonização por *Candida* sp..

Material e Métodos:

A amostra incluiu 117 indivíduos de ambos os géneros. A recolha das amostras foi efetuada na Clínica Dentária Universitária do ISCSEM e no laboratório de análises clínicas Lumilabo. Após leitura e assinatura do consentimento informado, foi recolhida uma amostra da mucosa oral com auxílio de uma zaragatoa estéril com meio de transporte. No laboratório de Microbiologia do ISCSEM, as amostras foram inoculadas em meios específicos e identificadas, para que se realizassem os testes fenotípicos. Para tratamento estatístico foi usado o programa IBM SPSS.

Resultados:

Dos indivíduos incluídos na amostra, 56,4% eram diabéticos, e 43,6% pertenciam ao grupo controlo. Foi possível verificar a presença de *Candida* sp. em 43,9% no grupo de estudo e 17,6% no grupo controlo. *Candida albicans* (*C. albicans*) foi a espécie mais prevalente. Quanto à capacidade de expressar: (i) proteinases, verificou-se que das 38 estirpes isoladas, 36,8% expressaram estas enzimas e 29% correspondiam a estirpes isoladas da cavidade oral de diabéticos; (ii) fosfolipases, verificou-se que 68,4% produziram estas enzimas e 50% foram isoladas de diabéticos.

Quanto à HbA1c $\geq 6,5\%$ vs colonização por *Candida* sp.: 67,9% apresentavam HbA1c $\geq 6,5\%$ e estavam colonizados e 72,4% tinham HbA1c $\geq 6,5$ mas não estavam colonizados por estes fungos leveduriformes.

Conclusão:

Ser diabético é um fator importante para a colonização por *Candida* sp. na cavidade oral.

C. albicans foi a espécie mais prevalente e a que apresentou maior capacidade de expressar proteinases e fosfolipases. A HbA1c descontrolada não apresentou significado estatístico para colonização por *Candida* sp.

Palavras Chave:

Candida sp., Cavidade Oral, Diabetes *mellitus*, Enzimas extracelulares

Abstract

Objectives:

Evaluate the prevalence of *Candida* sp. in the oral cavity of diabetics and non-diabetics, both non-carriers of dental prosthesis; assess the virulence factors of *Candida* sp. associated to single species and bearer group and relate HbA1c values with colonization by *Candida* sp.

Material and methods:

The sample included 117 individuals of both genders. The collection of samples was performed at the University Dental Clinic of ISCSEM and laboratory analyzes Lumilabo clinics. After reading and signing the informed consent, a sample of the oral mucosa was collected with the aid of sterile swabs as transport medium. At the microbiology laboratory of ISCSEM, the samples were inoculated in specific mediums and identified so that the phenotypic tests. For statistical analysis we used the SPSS program.

Results:

The sample included 56,4% individuals with diabetes, and 43,6% without diabetes. It was possible to verify the presence of *Candida* sp. 43,9% in study group and 17,6% the control group. *Candida albicans* (*C. albicans*) was the most prevalent species. Concerning the ability to express: (i) proteinase, it was found that of 38 isolated strains, expressed only 36,8% these enzymes and 29% correspond to strains isolated from the oral cavity of diabetic; (ii) phospholipases, it was found that these enzymes were produced by 68,4% of strains and 50% were isolated from diabetic patients.

As for HbA1c $\geq 6,5\%$ vs colonization by *Candida* sp., 67,9% had HbA1c $\geq 6,5\%$ and were colonized and 72,4% had HbA1c $\geq 6,5$ but were not colonized by these yeast fungi.

Conclusion:

Being diabetic is an important factor for the colonization of *Candida* sp. in the oral cavity.

C. albicans was the most prevalent species and showed a great ability to express proteinases and phospholipases. The uncontrolled HbA1c does not have a statistical significance for colonization by *Candida* sp.

Key words:

Candida sp., Oral Cavity, Diabetes *mellitus*, extracellular enzymes

Índice Geral

Dedicatória	5
Agradecimentos	7
Resumo	9
Abstract	11
Índice Geral	13
Índice de Figuras	15
Índice de Tabelas	17
Índice de Gráficos	19
Lista de Abreviaturas	21
Introdução	23
Caracterização de leveduras do género <i>Candida</i>	24
<u>TAXONOMIA</u>	24
<u>MORFOLOGIA E MORFONGÉNESE</u>	24
<i>C. albicans</i>	26
<u>FATORES DO HOSPEDEIRO</u>	28
<u>FATORES PATOGÉNICOS DE CANDIDA</u>	29
<u>INFEÇÕES CAUSADAS</u>	32
Diabetes <i>Mellitus</i> – caracterização da doença	35
<u>HEMOGLOBINA GLICADA (HBA1C)</u>	36
<u>TERAPÊUTICA</u>	36
<u>CANDIDA VS HOSPEDEIRO</u>	37
Identificação de <i>Candida</i> sp. no laboratório	39
<u>MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO</u>	39
Objetivos	42
Material e métodos	43
Tipo de estudo	43
Local de estudo	43
Amostra estudada	43
Protocolo Laboratorial	44
Operacionalização das variáveis	50
Análise de dados	51
Resultados e Discussão	53
Conclusões	71
Referências bibliográficas	73
Anexos	

Índice de Figuras

Figura 1 - Diferentes formas morfológicas de crescimento de <i>C. albicans</i> : A – Blastoconídio; B – Reprodução por gemulação; C – Formação de Pseudo-hifas; D - Formação do tubo germinativo; E – Formação de hifas (Ampliação 400X).....	26
Figura 2 - Formação de Pseudomicélio de <i>C. albicans</i>	27
Figura 3 - A - Meio Sabouraud para identificação de <i>Candida</i> sp.; B – Meio diferencial e cromogénico Brilliance Agar® (Identificação presuntiva de <i>Candida</i> sp.: colónias verdes – <i>C. albicans</i> ; colónias azuis – <i>C. tropicalis</i> ; colónias castanhas – <i>Candida</i> sp.).....	28
Figura 4 - Etapas de formação de um biofilme de <i>C. albicans</i> na superfície de um dispositivo médico: (a) Superfície revestida com proteínas (saliva); (b) fase de adesão: adesão primária de <i>C. albicans</i> à superfície; (c) fase intermédia: formação de camadas basais de microcolónias de levedura; (d) fase de maturação do biofilme: formação de hifas, pseudo-hifas e da matriz extracelular que envolve as células (Adaptado de Seabra, 2011).....	32
Figura 5 - Diferentes formas de candidose oral: (a) candidose pseudomembranosa; (b) candidose eitematosa crónica; (c) candidose eritematosa aguda; (d) candidose hiperplástica crónica (Adaptado de Williams & Lewis, 2011).	34
Figura 6 - Protocolo Laboratorial: A – Colheita com zaragatoa estéril em meio de transporte (Stuart); B – Inoculação por estrias; C – Incubação a 37 °C durante 48/72 horas; D –Resultado de <i>Candida</i> sp. em SDA após 72h; E- Exame cultural de <i>Candida</i> sp. em meio de cultura cromogénico (Brilliance <i>Candida</i> agar); F – Identificação micromorfológica de <i>Candida</i> sp. (Prova da blastese) – ampliação 400X; G – Identificação bioquímica de <i>Candida</i> sp. (API <i>Candida</i> (BioMérieux®))	45
Figura 7 - Resultado da expressão de enzimas extracelulares: proteínases em meio YCB-BSA coradas com a solução de amidoblack para revelação.	61
Figura 8 - Resultado da expressão de enzimas extracelulares: fosfolipases em meio fosfolipase.....	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Fatores de virulência de <i>C. albicans</i> na cavidade oral (Williams & Lewis, 2011).....	31
Tabela 2 - Frequência absoluta e valor percentual referente ao gênero	54
Tabela 3 - Média, desvio padrão e intervalo de confiança para ambos os grupos	55
Tabela 4 – Frequências e respectivas percentagens do tipo de diabetes	55
Tabela 5 - Frequências absolutas e respectivas percentagens de produção de proteinases por espécie vs grupo diabético/não diabético.	62
Tabela 6 - Frequências absolutas e respectivas percentagens de produção de fosfolipases por espécie vs grupo diabético/não diabético	67

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica de percentagens da variável Diabético vs Não Diabético.....	54
Gráfico 2 - Combinação terapêutica no grupo “diabético”.....	56
Gráfico 3 - Higiene oral diária no grupo "diabéticos"	57
Gráfico 4 - Higiene oral diária no grupo "não diabéticos"	58
Gráfico 5 - Colonização por <i>Candida</i> sp. em ambos os grupos.....	59
Gráfico 6 – Presença de diferentes espécies em ambos os grupos	60
Gráfico 7 – Expressão de enzimas extracelulares: proteinases	61
Gráfico 8 - Expressão de proteinases por espécie	62
Gráfico 9 - Produção de proteinases por espécie vs grupo diabético/não diabético.....	63
Gráfico 10 - Expressão de enzimas extracelulares: fosfolipases	64
Gráfico 11 - Expressão de fosfolipases por espécie	66
Gráfico 12 - Produção de fosfolipases por espécie vs grupo diabético/não diabético...	67
Gráfico 13 - Controlo de HbA1c em indivíduos diabéticos	68
Gráfico 14 - Presença de <i>Candida</i> sp. em indivíduos diabéticos.....	69
Gráfico 15 - Presença de diferentes espécies no grupo diabético de acordo com valores HbA1c $\geq 6,5\%$ ou $< 6,5\%$	70

Lista de Abreviaturas

ADO – Antidiabéticos Orais

ALS - *Agglutinin-Like Sequence*

ATCC - American Type Culture Collection

BSA – Albumina Bovina

DGS – Direção Geral da Saúde

DM – Diabetes *Mellitus*

DM1 – Diabetes *Mellitus* tipo 1

DM2 - Diabetes *Mellitus* tipo 2

HbA – Hemoglobina A

HbA1c – Hemoglobina glicada

Hwp1 - *Hyphal wall protein 1*

iDPP4 - inibidor da dipeptidil peptidase 4

IgA – Imunoglobulina A

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

mdc – meio de cultura

Met - Metformina

NaCl – Cloreto de Sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PLB – gene fosfolipases B

PTGO – Prova de Tolerância à Glicose Oral

Pz – Actividade enzimática

SAP - Aspartil Proteinases Secretórias

SDA – Sabouraud Dextrose Agar

SI – Sistema Imunitário

SU – Sulfonilureia

YCB - Yeast Carbon Base

YCB-BSA - Yeast Carbon Base, Albumina Bovina Fração V

YPD - Yeast Peptone Dextrose

Introdução

Nos dias que decorrem, os microrganismos encontrados na cavidade oral têm sido denominados de diversas formas, desde microflora oral, microbiota oral e mais recentemente de microbioma oral. O termo “microbioma” significa comunidade ecológica comensal, simbiótica e microrganismos patogénicos que partilham o mesmo espaço corporal (Dewhirst et al., 2010).

Assim, verifica-se que a cavidade oral contempla variados habitats microbianos, como dentes, sulco gengival, língua, bochecha, lábio e palato, sendo desse modo susceptível ao alojamento de uma grande variedade de microrganismos. São cerca de 750 espécies distintas que originam um dos mais diversificados microbiomas do organismo humano - microbioma oral – podendo conter vírus, protozoários, bactérias e fungos (Avila, Ojcius, & Yilmaz, 2009; Cho, Nagao, Imayoshi, & Tanaka, 2014; Dewhirst et al., 2010; Lopes, 2014; Wade, 2013; Zarco, Vess, & Ginsburg, 2012).

O Homem e os microrganismos comensais têm uma relação de há muitos anos, pois evoluíram juntos cerca de 2 milhões de anos e hoje dependem uns dos outros apresentando benefícios para a saúde. No entanto, quando reunidas as condições favoráveis ao desequilíbrio, que se manifestam por uma multiplicação anormal dos microrganismos, estes podem ter uma ação patogénica (Avila et al., 2009).

O simples facto de existir flora comensal na cavidade oral, é uma mais valia no que respeita ao impedimento de infeções patogénicas, uma vez que se verifica o fenómeno de resistência à colonização. No entanto, perante uma desregulação da flora comensal após, por exemplo, terapia antimicrobiana, este fenómeno fica comprometido podendo ocorrer infeções oportunistas causadas principalmente por *Candida* sp. e *Staphylococcus aureus* (Lopes, 2014).

A incidência de infeções causadas por fungos tem vindo a aumentar principalmente em doentes imunocomprometidos, pois há um desequilíbrio na interação agente-hospedeiro, podendo levar a uma expressão patogénica por parte do fungo (A. P. V. Pereira, 2010).

A Diabetes *Mellitus* (DM) através dos mecanismos fisiopatológicos vai influenciar o microbioma oral. A DM define-se como uma alteração metabólica em que os níveis de glicemia não se encontram controlados, nomeadamente a hiperglicemia, que leva a um aumento de glucose nos fluidos orais e por consequência a uma diminuição do fluxo salivar, xerostomia e atrofia da mucosa, condições excelentes para o desenvolvimento de candidoses (Boparai, Amasi, Patil, & Harakuni, 2014; Garcia, Zapata, Sanchez-

Vargas, & Padilla, 2013; Lopes, 2014; Salerno et al., 2011; Sánchez-Vargas, Estrada-Barraza, Pozos-Guillen, & Rivas-Caceres, 2013).

Caracterização de leveduras do género *Candida*

O género *Candida* é um fungo ubiqüitário com comportamento oportunista que pode fazer parte da flora da cavidade oral, do trato gastrointestinal, do trato genital feminino e da pele.

Nos indivíduos portadores de *Candida*, em geral, verifica-se que cerca de 60 a 70% são colonizados por *C. albicans*, 7% por *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) e em menor percentagem por *Candida krusei* (*C. krusei*) e *Candida guilliermondii* (*C. guilliermondii*) (Boparai et al., 2014; Deepa et al., 2014; Garcia et al., 2013; JCO, FP, NS, AM, & MJS, 2013; Melo & Guerra, 2014; Raju & Rajappa, 2011; Suárez, Inés, Matilde, & Andrés, 2013).

TAXONOMIA

Taxonomicamente, *Candida* sp. foi incluída no reino *Fungi*, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes e na família Cryptococcacea (Giolo & Svidzinski, 2010).

O género *Candida* apresenta cerca de 150 espécies, em que cerca de 10 são responsáveis por infeções no Homem, sendo, em geral, *C. albicans* a mais isolada na cavidade oral. Apesar de o número de espécies patogénicas ser pouco significativo quando comparado com a abundância de espécies, verifica-se que estas leveduras são a quarta causa mais comum de infeções sistémicas (François, Duncan, & Bernhard, 2013; A. P. V. Pereira, 2010; Raju & Rajappa, 2011; Sánchez-Vargas et al., 2013; Suárez et al., 2013; Zarco et al., 2012).

MORFOLOGIA E MORFONGÉNESE

Alguns dos microrganismos pertencentes ao género *Candida* são dimórficos, (caso dos fungos pertencentes a *C. albicans*, *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) e *C. tropicalis*) que se apresentam na maioria das vezes como leveduras. No entanto, podem ser observadas hifas verdadeiras – tigmotropismo ou pseudo-hifas (leveduras alongadas unidas entre si) (Figura 1 – C, E), com a exceção da espécie *Candida glabrata* (*C. glabrata*). Esta sua transformação poderá ser uma resposta a alterações que existam no

microambiente, como alteração de pH e variação de temperatura, etc.. Um exemplo desta transformação verifica-se quando estamos perante um pH inferior a 6. Nestas condições, o fungo apresenta-se sob a forma de levedura, e em situações de pH superior a 7 este apresenta-se sob a forma de hifa (D. L. N. Alves, 2009; Barbedo & Sgarbi, 2010; Barroso, Taveira, & Meliço-Silvestre, 2014; François et al., 2013; Mayer, Wilson, & Hube, 2013; Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2011; Pardi & Cardozo, 2002; Raju & Rajappa, 2011).

Microscopicamente, as leveduras do género *Candida* são bastante semelhantes: apresentam características das células eucariotas, incluindo núcleo, mitocôndrias, complexo de Golgi, membrana celular e parede celular rígida.

Quimicamente, a sua parede celular é constituída por manoproteínas, glucoproteínas e quitina associadas a outras proteínas estruturais.

São classificadas como gram positivas e apresentam uma forma celular circular ou oval (conídios) com dimensões de 2 a 8 µm por 3 a 14 µm ou forma de hifa que pode atingir centenas de micrómetros. São células aeróbias, podendo, no entanto, desenvolver-se em condições de anaerobiose. Metabolicamente necessitam de fonte de carbono e iões de amónia ou nitrato como fonte de azoto (D. L. N. Alves, 2009; Giolo & Svidzinski, 2010).

Os blastoconídios (conídios) (Figura 1- A) são uma forma de apresentação do fungo que pode tornar-se invasiva e patogénica perante um desequilíbrio do sistema imunitário. Reproduzem-se assexuadamente por um processo de divisão específico conhecido por gemulação ou divisão binária (Figura 1- B) (D. L. N. Alves, 2009; Pardi & Cardozo, 2002).

Macroscopicamente, as leveduras do género *Candida* sp. em meio Sabouraud dextrose Agar (SDA) apresentam a coloração branca ou creme com aspeto que pode variar de liso brilhante a rugoso opaco, consoante a espécie. Em meio cromogénico, como o Brilliance Agar, as diferentes espécies podem ser detetadas de acordo com a cor que apresentam neste meio, sendo vantajoso identificá-las na mesma amostra. É útil na identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, pela morfologia e cor, podendo apresentar a cor verde, azul e rosa, respetivamente (Barbedo & Sgarbi, 2010; Spolidorio, Boriollo, Estrela, & Spolidorio, 2009).

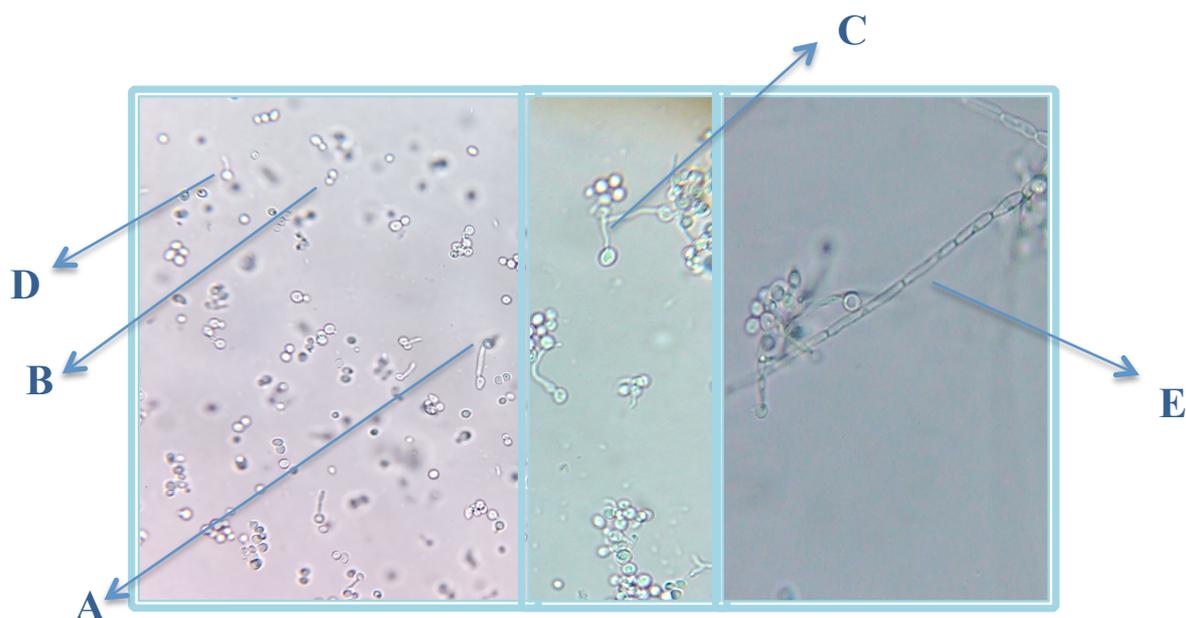


Figura 1 - Diferentes formas morfológicas de crescimento de *C. albicans*: A – Blastoconídio; B – Reprodução por gemulação; C – Formação de Pseudo-hifas; D - Formação do tubo germinativo; E – Formação de hifas. (Ampliação 400X)

C. albicans

Em particular, a espécie *C. albicans* forma tubos germinativos (Figura 1- D) e perante condições ambientais adversas, poderá formar clamidósporos (estruturas esféricas com parede muito espessa), estas são consideradas estruturas de resistência que se formam quando o fungo se encontra sem os nutrientes essenciais para se desenvolver, estruturas estas visíveis apenas in vitro. Estas estruturas, são esporos grandes com diâmetro entre 7 e 8 μm que podem originar um pseudomicélio, característica importante que diferencia *C. albicans* de outras espécies (Figura 2) (Barbedo & Sgarbi, 2010; Barroso et al., 2014; François et al., 2013; Pardi & Cardozo, 2002).

Macroscopicamente, *C. albicans* em meio SDA apresenta colónias de cor branca ou creme, lisas e brilhantes, com forma convexa e com cheiro característico (Figura 3 - A) e em meio cromogénico, apresentam cor verde (Barbedo & Sgarbi, 2010; Spolidorio et al., 2009). Quimicamente, a parede celular é constituída por duas camadas: uma interna e uma externa. A camada externa contém glicoproteínas e a interna contém polissacáridos. Na camada externa existe predominantemente hidratos de carbono

(80 a 90%) com oxigénio e azoto ligado a polímeros de manose que estão associados às proteínas para formar as glicoproteínas. Em relação à composição lipídica, esta é bastante variável, de acordo com a fonte de carbono originária (Gow, Veerdonk, Brown, & Netea, 2011; Pardi & Cardozo, 2002).

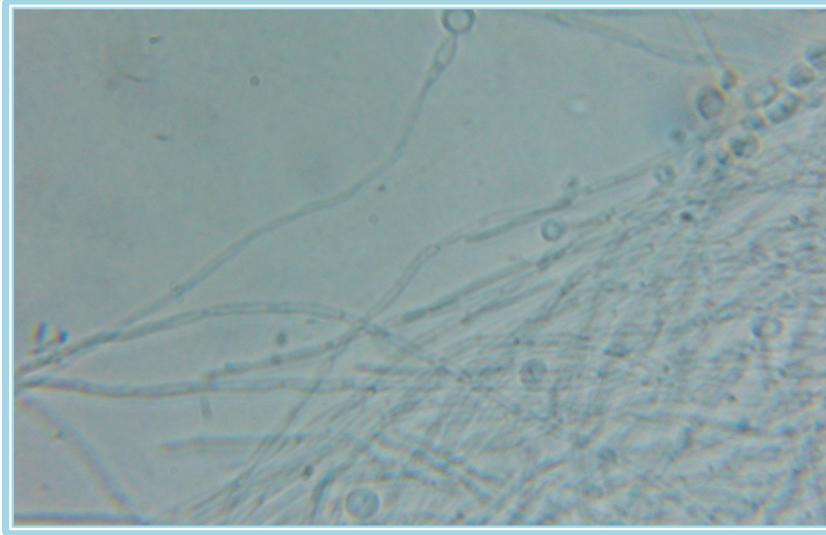


Figura 2 - Formação de Pseudomicélio de *C. albicans*

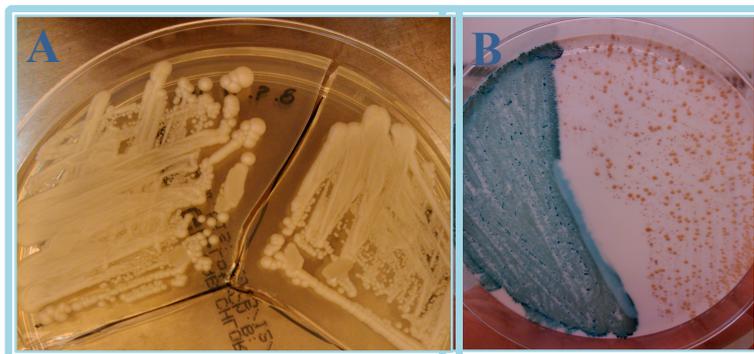


Figura 3 - A - Meio Sabouraud para identificação de *Candida* sp.; B – Meio diferencial e cromogénico Brilliance Agar® (Identificação presuntiva de *Candida* sp.: colónias verdes – *C. albicans*; colónias azuis – *C. tropicalis*; colónias castanhas – *Candida* sp.)

Colonização Oral – *Candida* vs Hospedeiro

Leveduras do género *Candida* facilmente incorporam o microbioma oral de diversos indivíduos e, normalmente, estas permanecem estáveis, sem causar doença em indivíduos saudáveis (François et al., 2013; Khaled, Mawieh, & Suleiman, 2006).

A relação comensal depende da integridade do tecido hospedeiro, do microbioma normal e ainda do sistema imunitário (De Rossi et al., 2011). Quando perante alterações metabólicas, doenças malignas e/ou outras condições, as espécies do género *Candida* podem tornar-se virulentas e causar candidoses superficiais (candidose oral ou vaginal) e infeções sistémicas potencialmente fatais, com taxas de mortalidade que se aproximam de 50% (Boparai et al., 2014; François et al., 2013; Pfaller & Diekema, 2007).

FATORES DO HOSPEDEIRO

O sistema imunitário (SI) do Homem é fulcral na resposta à patogenicidade de leveduras com essa característica. Este sistema pode ser equiparado a um antifúngico, uma vez que desempenha um papel fundamental na destruição do fungo e na sinalização do mesmo para as células do SI adaptativo, por meio de produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, o SI inato atua de imediato, através das barreiras físicas (pele, mucosas gastrointestinal, respiratória e genital) e químicas

impedindo a invasão tecidual por parte destes microrganismos.

As leveduras são fungos que rapidamente se adaptam às diferentes condições e se desenvolvem, e quando perante um SI debilitado, não existe uma defesa consistente que consiga impedir a invasão por parte do fungo ou diminuir os seus danos. Para além deste, existem outros fatores que podem predispor o Homem à infeção, são eles: (i) diferenças de pH e temperatura; (ii) xerostomia e traumas locais; (iii) desnutrição clínica - dietas ricas em hidratos de carbono, deficiência de ferro, ácido fólico e vitamina B12; (iv) distúrbios endócrinos – hipotireoidismo, DM, doença de Addison; (v) doenças sistémicas – leucemia aguda e agranulocitose; (vi) administração de contraceptivos hormonais, antibioterapia prolongada de largo espectro e corticoesteróides (Al-Fattani & Douglas, 2006; D. L. N. Alves, 2009; Boparai et al., 2014; De Rossi et al., 2011; Hernández-solís & Rueda-gordillo, 2015; Pereira-Cenci, Del Bel Cury, Crielaard, & Ten Cate, 2008; Raju & Rajappa, 2011; Shenoy et al., 2014; Williams & Lewis, 2011).

FATORES PATOGENICOS DE *CANDIDA*

A patogenicidade da levedura do género *Candida* tem sido atribuída a diversos fatores, como:

- (i) a heterogeneidade fenotípica: capacidade de adesão celular pelas adesinas e capacidade de expressão de enzimas extracelulares, aspartil proteinases secretórias (*SAP*) e fosfolipases, que são responsáveis pela invasão das células orais e degradação dos tecidos;
- (ii) produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular; formação de biofilmes; produção de tubo germinativo por algumas espécies do género *Candida*;
- (iii) produção de hemolisinas;
- (iv) hidrofobicidade relativa da superfície celular e
- (v) resistência ao peróxido de hidrogénio (Boparai et al., 2014; Deepa, Jeevitha, & Michael, 2015; Fatahinia, Poormohamadi, & Mahmoudabadi, 2015; Giolo & Svidzinski, 2010; Hernández-solís & Rueda-gordillo, 2015; Raju & Rajappa, 2011; Sánchez-Vargas et al., 2013).

Para que haja adesão do fungo ao tecido, tem de existir um contato entre a parede celular do fungo e a superfície celular do hospedeiro. Esta fase está dependente de processos biológicos e processos não biológicos. Entende-se como processos não biológicos, as interações químicas entre as macromoléculas, como as forças de Van der

Walls, interações hidrofóbicas, electrostáticas e pontes de hidrogénio. Por processos biológicos, entende-se a expressão de adesinas (Tabela 1). Pós adesão aos tecidos, há uma interação entre diversos microrganismos, que vão promover a formação de uma comunidade na cavidade oral, facilitando a formação de biofilme (Giolo & Svidzinski, 2010).

As adesinas, responsáveis pela adesão, pertencem à família de genes *Agglutinin-Like Sequence* (ALS). Estas são expressas na superfície da levedura e são mediadas por proteínas que se encontram à superfície das células hospedeiras, que se ligam às caderinas das células endoteliais e a células do epitélio oral. Estas ligações induzem as células do hospedeiro a fagocitar a levedura. A ALS3 é das proteínas mais importante na fase de adesão da levedura às células hospedeiras, juntamente com a *hyphal wall protein 1* (Hwpl) que é uma proteína expressa na superfície das hifas (Barbedo & Sgarbi, 2010; De Rossi et al., 2011; François et al., 2013; Gow et al., 2011; Williams & Lewis, 2011).

A capacidade do fungo alterar a morfologia, converter a forma de levedura em hifas, denominado de dimorfismo, é o primeiro passo para a manifestação da sua patogenicidade. Esta alteração aumenta significativamente a adesão aos tecidos do hospedeiro, o que vai facilitar a sua invasão e posterior disseminação corporal. Assim, verifica-se que a forma de hifa tem sido considerada como a forma mais virulenta em resposta às condições ambientais (Tabela 1) (De Rossi et al., 2011; Giolo & Svidzinski, 2010).

As proteinases e fosfolipases, são enzimas extracelulares secretadas pela levedura que favorecem a invasão tecidual (Tabela 1). As proteinases são reguladas por genes da família *SAP* que possuem atividade proteolítica, ou seja, usam as proteínas como substrato, digerindo-as. Esta digestão pode ser crucial para a levedura conseguir obter o azoto essencial ao seu desenvolvimento e posterior colonização (De Rossi et al., 2011; Sanitá et al., 2014). Para além de atuarem a nível das proteínas presentes no substrato, as *SAP* também interagem com o sistema imunológico, degradando imunoglobulinas e citocinas e assim, facilitam a invasão celular. Diversos estudos têm demonstrado uma grande evidencia na relação – síntese e secreção destas enzimas com o aparecimento de candidoses mais graves (Akçağlar, Ener, & Töre, 2011; Giolo & Svidzinski, 2010; Hernández-solís & Rueda-gordillo, 2015; Sanitá et al., 2014).

As *SAP* são constituídas por 10 isoenzimas, em que algumas são secretadas para o meio (*SAP1-8*) e outras permanecem ligadas à parede (*SAP9-10*). As *SAP* fulcrais para a

candidose oral são a *SAP1-3*, enquanto outras são responsáveis por vaginites e infecções oculares (De Rossi et al., 2011; Williams & Lewis, 2011).

As fosfolipases são um grupo de enzimas, que se divide em quatro classes diferentes, A, B, C e D. Destas, apenas 5 membros da classe B são extracelulares (*PLB1-5*) e contribuem para a patogenicidade. A expressão destas enzimas é influenciada por fatores nutricionais, condições ambientais (pH, temperatura) e pela fase de crescimento da própria levedura, em que os fosfolípidos presentes na membrana das células do hospedeiro servem de substrato, sendo posteriormente hidrolisados em ácidos gordos (De Rossi et al., 2011; Deepa et al., 2015; Giolo & Svidzinski, 2010; Williams & Lewis, 2011). A expressão destas enzimas por parte da levedura, é um foco importante na libertação de mediadores inflamatórios, uma vez que estas induzem à acumulação de células inflamatórias e proteínas plasmáticas (Sanitá et al., 2014).

Tabela 1 - Fatores de virulência de *C. albicans* na cavidade oral (Williams & Lewis, 2011)

Fator de Virulência	Efeito
Adesão à superfície	Promove a retenção na cavidade oral
Hidrofobicidade célula-superfície	Mecanismos de adesão não específicos
Adesinas da superfície celular	Mecanismos de adesão específicos
Evasão dos mecanismos de defesa	Promove a retenção na cavidade oral
Elevada frequência fenotípica	Modificação antigénica devido a alterações na superfície da célula
Desenvolvimento de hifas	Prejudica a fagocitose
Secreção de enzimas hidrolíticas, nomeadamente produção de proteinases	IgA é destruída
Invasão e destruição de tecidos do hospedeiro	Melhora a patogenicidade
Desenvolvimento de hifas	Promove a invasão do tecido epitelial oral
Produção de enzimas hidrolíticas, nomeadamente proteinases e fosfolipases	Provoca danos na matriz extracelular e nas células hospedeiras

A formação de biofilme é complexa e variável. O biofilme é constituído por um conjunto de microrganismos diferentes que sobrevivem em associação, com benefícios mútuos (Filoche, Wong, & Sissons, 2010). O biofilme composto por espécies de *Candida* sp, consiste numa matriz fechada, composta por microcolónias de leveduras, hifas, pseudo-hifas e poderá ainda alojar bactérias que se encontram envolvidas por uma

matriz extracelular em que há passagem de água e nutrientes, criando uma barreira à ação dos antifúngicos (Figura 4) (Al-Fattani & Douglas, 2006; Filoche et al., 2010; Melo & Guerra, 2014; Pathak, Sharma, & Shrivastva, 2012; Sánchez-Vargas et al., 2013).

O primeiro passo para que haja formação de biofilme é a adesão, precedida pela fase de maturação. A fase de adesão poderá ser facilitada, quando a mucosa oral está colonizada por outras bactérias como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces viscosus* (Avila et al., 2009; Boparai et al., 2014; Filoche et al., 2010).

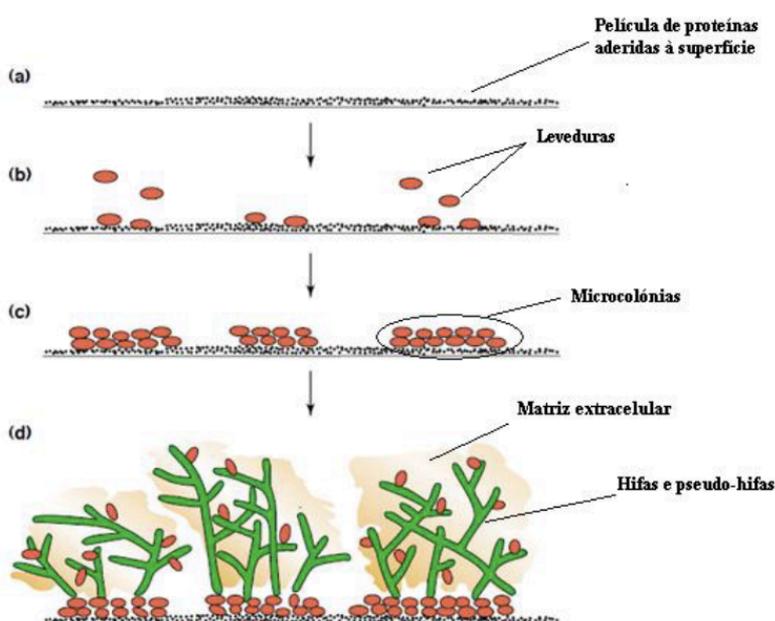


Figura 4 - Etapas de formação de um biofilme de *C. albicans* na superfície de um dispositivo médico: (a) Superfície revestida com proteínas (saliva); (b) fase de adesão: adesão primária de *C. albicans* à superfície; (c) fase intermédia: formação de camadas basais de microcolônias de levedura; (d) fase de maturação do biofilme: formação de hifas, pseudo-hifas e da matriz extracelular que envolve as células (Adaptado de Seabra, 2011).

INFEÇÕES CAUSADAS:

Quando o epitélio do hospedeiro é invadido por leveduras do género *Candida*, este pode ficar perante uma septicemia e/ou infeções sistémicas. As infeções sistémicas mais comuns provocadas por *Candida*, são infeções intra-abdominais e do trato urinário, sendo a candidemia uma das principais causas de mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, nomeadamente, os diabéticos que apresentam maior

predisposição para doenças orais como a candidose (Pathak et al., 2012; Sánchez-Vargas et al., 2013; Shenoy et al., 2014).

As candidoses são uma forma de infecção causadas por *Candida* e podem ser agrupadas em três grupos distintos em prol do local de ação: mucocutânea (atinge a mucosa oral e vaginal), cutânea e sistêmica (Garcia et al., 2013; Melo & Guerra, 2014). *C. albicans* é considerada a levedura mais patogénica, devido à sua grande capacidade de adesão e proliferação em tecidos duros e moles da cavidade oral (Salerno et al., 2011).

Na cavidade oral, a candidose pode apresentar-se sob quatro formas distintas: candidose pseudomembranosa (aftas), candidose eritematosa crónica, candidose eritematosa aguda, candidose hiperplástica crónica (Williams & Lewis, 2011).

A infecção vulgarmente conhecida por “**aftas**” apresenta lesões brancas cremosas e que facilmente são removíveis, no entanto, a mucosa poderá ficar com áreas eritematosas e hemorrágicas (Figura 5 – a). Esta é mais vulgar em crianças que naturalmente apresentam um sistema imunológico imaturo, denominando-se de “sapinhos”. Este tipo de infecção desenvolve-se muito bem em doentes com xerostomia e idosos, principalmente quando estes apresentam uma limitação nutricional ou supressão imunitária local (administração de corticoesteróides para tratamento de asma) – candidose aguda.

A **candidose eritematosa crónica** manifesta-se pela presença de manchas ou áreas vermelhas numa camada lisa e fina no palato (Figura 5– b).

A **candidose eritematosa aguda**, normalmente manifesta-se após administração de antibiótico de largo espectro que destrói a flora bacteriana a nível oral, existindo facilidade na adesão de *Candida* e sua manifestação. Normalmente as suas lesões são vermelhas e encontram-se no dorso da língua e palato, sendo esta o tipo mais doloroso para o Homem (Figura 5 – c).

Por fim, a **candidose crónica hiperplástica** apresenta placas brancas no dorso da língua e comissura labial, no entanto, o que as difere das conhecidas aftas, é que estas não podem sofrer raspagem (Figura 5 – d) (Barbedo & Sgarbi, 2010; Williams & Lewis, 2011).

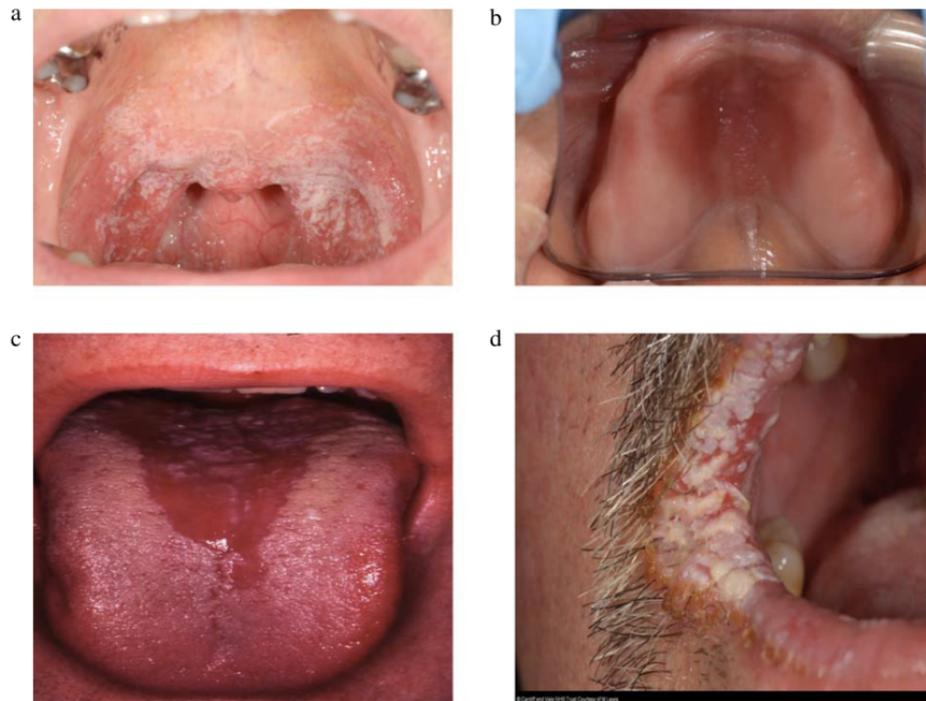


Figura 5 - Diferentes formas de candidose oral: (a) candidose pseudomembranosa; (b) candidose eitematosa crónica; (c) candidose eritematosa aguda; (d) candidose hiperplástica crónica (Adaptado de Williams & Lewis, 2011).

Diabetes Mellitus – caracterização da doença

A DM é um problema de saúde pública global, que ocorre principalmente em países desenvolvidos. Esta caracteriza-se como um distúrbio metabólico endócrino, em que há um aumento de glicose no sangue, provocando uma hiperglicemia. A sua prevalência aumenta com a idade, atingindo ambos os géneros. Conduz a uma desnutrição e decadência imunológica que posteriormente se reflete nas condições gerais do organismo (Direção Geral da Saúde (DGS), 2014; Fatahinia et al., 2015; Talabani, Kim, Ong, Kiat, & Ismail, 2013).

É classificada em tipo 1 ou insulino-dependente, tipo 2 ou insulino-independente e gestacional. Na DM tipo 1 (DM1), há uma deficiência completa de insulina, em que as células beta se encontram completamente destruídas. Por sua vez, na DM tipo 2 (DM2) há uma diminuição de secreção e resistência à insulina, sendo esta a mais frequente e relacionada com fatores genéticos e ambientais. A diabetes gestacional, surge devido a uma diminuição na tolerância aos hidratos de carbono e é diagnosticada durante a gestação, que pode ou não permanecer após o parto (Hammad, Darwazeh, & Idrees, 2013; Yamashita et al., 2013).

Estima-se que cerca de 217 milhões de pessoas em todo o mundo sejam portadoras desta disfunção metabólica, havendo tendência para este número aumentar. A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que em 2030, a DM atinja cerca de 366 milhões de pessoas (Hammad et al., 2013; Premkumar, Ramani, Chandrasekar, Natesan, & Premkumar, 2014; Yamashita et al., 2013).

A Direção Geral de Saúde (DGS) estimou que a prevalência de DM em Portugal no ano de 2013 foi de 13%, em idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, o que significa que mais de um milhão de portugueses era diabético, visto existirem cerca de 7,8 milhões de indivíduos nesta faixa etária.

É importante referir que existe uma diferença estatística significativa nos diferentes géneros: o género masculino é mais afetado do que o género feminino (15,6% e 10,7%, respectivamente). Segundo a DGS, a DM2 é a mais frequente e a sua prevalência aumenta com a idade. Cerca de um quarto da população diabética encontra-se na faixa etária entre 60 e 79 anos (Direção Geral da Saúde (DGS), 2014).

HEMOGLOBINA GLICADA (HbA1c)

Cada tipo de diabetes pode ser subdividida em dois grupos com base no grau da doença: diabetes controlada ou não controlada de acordo com os níveis séricos de hemoglobina glicada (HbA1c) (Talabani et al., 2013).

A HbA1c traduz-se por uma reação entre a hemoglobina A (HbA) e um açúcar. É o produto de uma reação não enzimática, lenta e irreversível denominada de glicação, que ocorre entre a glicose presente no sangue e os grupos amina livres presentes na hemoglobina dos eritrócitos. Devido à grande permeabilidade da hemácia à molécula de glicose, a hemoglobina interna fica exposta praticamente à mesma concentração de glicose plasmática e a glicação ocorrerá em maior ou menor grau em consequência do nível de glicemia. Assim, a HbA1c encontra-se dentro das hemácias e a sua concentração, em determinado momento, depende da taxa de glicemia média e o seu tempo de semi-vida (George, 2013; Netto et al., 2009; Sumita & Andriolo, 2008). Esta é determinada, por rotina, em diabéticos para avaliar o grau de controle glicêmico e deve ser realizada semestralmente, e com mais frequência em indivíduos com alterações de medicação (trimestral).

A determinação de HbA1c poderá ser considerada para diagnóstico quando estamos perante valores superiores a 6,5%. No entanto, é relevante o valor tradicional de glicose no plasma obtida em jejum ou valores da prova de tolerância à glicose oral (PTGO).

Em indivíduos já diagnosticados, o valor de HbA1c superior a 6,5% traduz-se numa diabetes não controlada e quando inferior a este valor, estará controlada (George, 2013). Segundo Javed *et al.* (2014), a diabetes não controlada (HbA1c \geq 6,5%) é mais propícia a infeções da cavidade oral, tais como as candidoses (Javed et al., 2014)

TERAPÊUTICA

A terapêutica da DM1 consiste na administração de insulina, uma vez que os indivíduos têm ausência completa de produção de insulina no seu organismo.

A terapêutica farmacológica da DM2, em monoterapia, destaca a Metformina (met) como o fármaco de primeira linha que é acompanhado ou precedido pela implementação de medidas não farmacológicas, como a dieta e a prática de exercício físico. Em caso de intolerância ou contraindicação, a met poderá ser substituída por uma sulfonilureia (SU), glicazida, glimepirida ou glipizida, como primeira linha (George, 2015; Pinto et al., 2011).

A terapêutica com dois fármacos deve iniciar-se quando após 3 meses não se verifica melhorias no controlo de glicemia com monoterapia e otimização de medidas não farmacológicas. Quando confirmada a otimização de medidas não farmacológicas e farmacológicas e mesmo assim a hiperglicemia mantem-se descontrolada, poderá existir a adição de um segundo fármaco. Quando perante um indivíduo com DM2 medicado com SU poderão surgir situações como: hipoglicemia ou esta estar contraindicada devido a idade superior a 75 anos, omissão de refeições, ou devido a diversas profissões que obriguem a alturas ou manipulação de maquinaria pesada, e nestes casos deverá adaptar-se a medicação, administrando-se um inibidor da α -glicosidade (Acarbose) ou inibidor da dipeptidil peptidase 4 (iDPP4).

Em indivíduos com glicemias bastante elevadas (300-350 mg/dL) ou HbA1c maior que 10% dever-se-á administrar insulina e após controlo de glicemia reduzir a dose de insulina ou iniciar terapêutica apenas com ADO.

Se a HbA1c se encontrar superior a 9% deve administrar-se insulina, se HbA1c se encontrar inferior a 9%, deverá adicionar-se uma SU como segundo fármaco. Quando mesmo assim não há um controlo adequado da glicemia, e se houve adesão à terapêutica, poderá adicionar-se um terceiro fármaco. Se o objetivo for reduzir menos que 1% de HbA1c, deve adicionar-se um terceiro fármaco, se o objetivo for reduzir mais que 1% de HbA1c deverá associar-se insulina aos ADO que o indivíduo já faça (George, 2015)

CANDIDA VS HOSPEDEIRO

Grande parte da população saudável, 40 a 60%, é portadora de *Candida*, sem apresentar quaisquer sinais ou sintomas de candidose. Fatores como o tipo de doença, duração de doença, controlo glicémico e uso de prótese, são associados à presença de leveduras na cavidade oral em indivíduos diabéticos (Shenoy et al., 2014).

A nível da cavidade oral, os indivíduos diabéticos apresentam uma redução do fluxo salivar, que conduz à presença de xerostomia e atrofia da mucosa, que potencia o aparecimento de infeções, nomeadamente candidoses (Deepa et al., 2014; Fatahinia et al., 2015; Garcia et al., 2013; Talabani et al., 2013).

A saliva alberga uma grande quantidade de microrganismos resultantes dos compartimentos da cavidade oral, como dentes e mucosas que se evidenciam com a mastigação, deglutição e o simples ato de falar. O aumento da concentração de glicose na saliva e nos fluidos orais pode conduzir a uma diminuição do pH da cavidade,

estabelecendo-se um substrato com condições excelentes para a colonização por *Candida* sp. (Talabani et al., 2013).

Identificação de *Candida* sp. no laboratório

Para que seja possível a identificação de *Candida* sp. em laboratório existem métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos são utilizados com o objetivo de isolar, diferenciar e identificar diferentes espécies de *Candida*, com base nas características de cada uma. As amostras são inoculadas em meios específicos compostos por nutrientes essenciais ao bom desenvolvimento das leveduras. Com essa finalidade são usados os seguintes métodos: crescimento em meio SDA e crescimento em meio diferencial cromogénico para isolar e diferenciar algumas espécies; a prova da blastese, testes de assimilação de hidratos de carbono, azoto e açúcares (galerias de identificação bioquímica- API) para diferenciação e identificação de espécies; testes que comprovem a virulência (produção de SAP e fosfolipases). Os métodos genotípicos, como por exemplo a reação em cadeia da polimerase (PCR) são testes associados a custos bastante elevados, sendo dispendioso e só usado quando estritamente necessário, como é o caso da diferenciação de *C. albicans* e *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*), pois são bastante semelhantes fenotipicamente.

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Isolamento:

a) Crescimento em SDA:

O meio mais utilizado para o isolamento de *Candida* sp. é o SDA que contém na sua composição gentamicina ou cloranfenicol. Neste meio, *Candida* sp. apresenta-se sob a forma de colónias brancas ou cremes com forma convexa e uma aparência lisa e brilhante ou rugosa e opaca, consoante a espécie inoculada. No entanto, não é possível uma diferenciação rigorosa de espécies pelo que terá de recorrer-se ao meio diferencial e cromogénico (Barbedo & Sgarbi, 2010; François et al., 2013; Martinez, Hernández-pérez, Miguel, Jaimes-aveldañez, & Arenas, 2013; Raju & Rajappa, 2011).

b) Crescimento em meio diferencial e cromogénico (Oxoid Brilliance *Candida* Agar)

Este meio permite a diferenciação de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *Candida* sp, que se apresentam com colónias verdes, azul, rosa e castanho/dourado, respetivamente em 72 horas a 37 °C. O meio é composto por dois substratos cromogénicos que indicam a presença de enzimas que algumas espécies de *Candida* possuem, sendo elas a hexominidase e fosfatase alcalina. A clivagem destas enzimas é responsável pela

atribuição de diferente coloração para identificação presuntiva das diferentes espécies. A clivagem da enzima hexominidase reflete a cor verde, e daí a identificação de *C. albicans*, no entanto, também *C. tropicalis* possuem hexominidase, mas devido a outras reações metabólicas, o seu pH diminui refletindo assim a cor azul escuro. *C. krusei* possui fosfatase alcalina que origina uma coloração rosa (Barbedo & Sgarbi, 2010; Boparai et al., 2014; Brilliance, 2008; Carlos, Anakaren, Nemesio, Israel, & Patricia, 2013; Ribeiro, Koga Ito, Junqueira, & Jorge, 2009).

Métodos fenotípicos:

a) Teste de assimilação de hidratos de carbono, azoto e açúcares

No teste de assimilação de hidratos de carbono é avaliada a capacidade da levedura se desenvolver apenas na presença de hidratos de carbono como fonte de energia; no teste de assimilação de azoto é avaliada a capacidade da levedura crescer na presença de apenas um composto azotado; no teste de assimilação aos açúcares avalia-se a capacidade da levedura se desenvolver na presença de açúcares como a galactose, glucose, sacarose, trealose e outros, como única fonte de energia. Os sistemas aos quais se recorre para aplicação destes testes rápidos denominam-se de API 20C (BioMérieux), ID 32C (BioMérieux), Vitek Yeast Biochemical Card (YBC), Vitek 2 ID-YST e API *Candida* (BioMérieux®). O API *Candida* (BioMérieux®) é constituído por 10 poços para realizar 12 testes bioquímicos colorimétricos: cinco testes de assimilação de açúcares (glucose, galactose, sacarose, trealose e rafinose) e sete testes enzimáticos por (β -maltosidase, α -amilase, β -xilosidase, β -glucuronidase, de hidrólise da ureia, N-acetil- β -glucosaminidase, e β -galactosidase). A inoculação dos poços é realizada através da adição de uma suspensão de levedura e após 18h a 24h a 35° C de incubação são lidos os resultados, em que são usados os sinais positivo (+) e negativo (-), consoante há turvação nos poços ou de acordo com a cor obtida. Posteriormente através de uma sequência de quatro dígitos que é gerada para cada amostra, dependendo das reações que produziu, a lista de perfis numéricos e um programa de computador do fabricante identifica a espécie que está em pesquisa (Barbedo & Sgarbi, 2010; Campbell, Davey, Holmes, Szekely, & Warnock, 1999).

b) Prova da blastese

A prova da blastese ou teste do tubo germinativo é usado para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis* de outras espécies, pois apenas estas têm a capacidade de formar tubos germinativos. Esta prova consiste na inoculação de colónias de levedura em soro animal

ou soro humano e incubação a 37 °C durante cerca de 2 horas. A formação de tudo germinativo é o começo da formação de uma hifa verdadeira, não podendo ser pseudo-hifa por não apresentar constrição na base (A. P. V. Pereira, 2010; Spolidorio et al., 2009).

Objetivos

A realização deste trabalho teve como objetivos avaliar em indivíduos diabéticos e não diabéticos não portadores de prótese dentária, da Clínica Dentária Universitária do ISCSEM e do Laboratório de análises clínicas Lumilabo:

- a) Prevalência e distribuição de espécies de *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos diabéticos não portadores de prótese dentária (grupo de estudo);
- b) Prevalência e distribuição de espécies de *Candida* sp. na cavidade oral de indivíduos não diabéticos não portadores de prótese dentária (grupo controlo);
- c) Fatores de virulência de *Candida* sp. associado às espécies isoladas e ao grupo portador;
- d) Avaliar relação entre o biofilme leveduriforme oral e o desenvolvimento de estomatite protética;
- e) Desenvolver um protocolo de higienização e seguidamente avaliar as alterações fenotípicas e genotípicas obtidas sobre a flora leveduriforme.
- f) Relacionar valores de HbA1c em diabéticos não portadores de prótese (grupo de estudo) com a colonização por *Candida* sp.;

É de referir que os objectivos d) e e) não foram cumpridos para o presente estudo e o objetivo f) foi posteriormente adicionado, não tendo sido objetivo inicial.

De acordo com os objetivos anteriormente citados, as hipóteses de investigação consideradas foram:

- 1) existe uma associação entre a colonização por *Candida* sp. com indivíduos diabéticos não portadores de prótese dentária;
- 2) existe uma associação entre a colonização por *Candida* sp. com indivíduos não diabéticos não portadores de prótese dentária;
- 3) existem fatores de virulência associados a cada espécie de *Candida* sp.;
- 4) existe fatores de virulência associados a cada um dos grupos de indivíduos diabéticos e não diabéticos;
- 5) existe uma associação entre o valor de HbA1c e a colonização por *Candida* sp. em indivíduos diabéticos.

Material e Métodos

Tipo de estudo

É um estudo exploratório e descritivo, com metodologia quantitativa e transversal na medida em que se baseia num único momento de observação.

Local de estudo

A recolha de amostras e informação sobre as mesmas foi efetuada na Clínica Dentária Universitária do ISCSEM e no Laboratório de análises clínicas Lumilabo. Todo o procedimento laboratorial foi efetuado no laboratório de Microbiologia do ISCSEM.

Amostra estudada

Foram estudadas amostras da mucosa oral de indivíduos diabéticos não portadores de prótese e de indivíduos não diabéticos não portadores de prótese. Na Clínica Dentária Universitária do ISCSEM foi possível ter acesso aos processos dos doentes, que foram selecionados de forma a obedecerem aos critérios de inclusão. No laboratório de Análises Clínicas Lumilabo, não houve pré-seleção inicial, pelo que os doentes foram interrogados no momento para verificar se obedeciam ou não aos critérios de inclusão. A amostra total incluiu 117 indivíduos não portadores de prótese dentária, com idades compreendidas entre os 18 e os 80 anos de idade de ambos os géneros, dos quais, 66 eram diabéticos (grupo de estudo) e 51 não eram diabéticos (grupo controlo). Relativamente aos critérios de inclusão, todos os indivíduos não deveriam ser portadores de prótese dentária e para o grupo de estudo todos seriam diabéticos. Como critérios de exclusão considerou-se: ser portador de prótese dentária e terapêutica antifúngica.

Procedimento utilizado na recolha de informação para amostra

Todos os participantes foram abordados verbalmente e posteriormente informados oralmente e por escrito (Anexo I), através do consentimento informado (Anexo II) que foi lido e assinado pelo próprio, sobre o estudo que decorria. Após a aceitação por parte do indivíduo, foi efetuado um inquérito (Anexo III) verbalmente. A colheita foi feita de acordo com o protocolo idealizado para este estudo (Anexo IV) e posteriormente identificada. Após o processo de recolha, as amostras foram inoculadas em meios específicos no Laboratório de Microbiologia do ISCSEM.

Considerações éticas

Foi solicitado à Direção Clínica do ISCSEM e Direção Clínica do Lumilabo uma autorização por escrito para que fosse possível a recolha das amostras na Clínica Dentária Universitária do ISCSEM e no Laboratório de análises clínicas Lumilabo. O projeto foi submetido à Comissão Científica e de Ética do ISCSEM como projeto de investigação e foi dada continuidade na dissertação de Mestrado (Anexo V).

Materiais utilizados na recolha da amostra

1. Material de Recolha:

Zaragatoa Estéril com meio de transporte

2. Material de proteção:

Luvas

Máscaras

3. Material de Inoculação:

Placas de Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Placas de Oxoid Brilliance Candida Agar

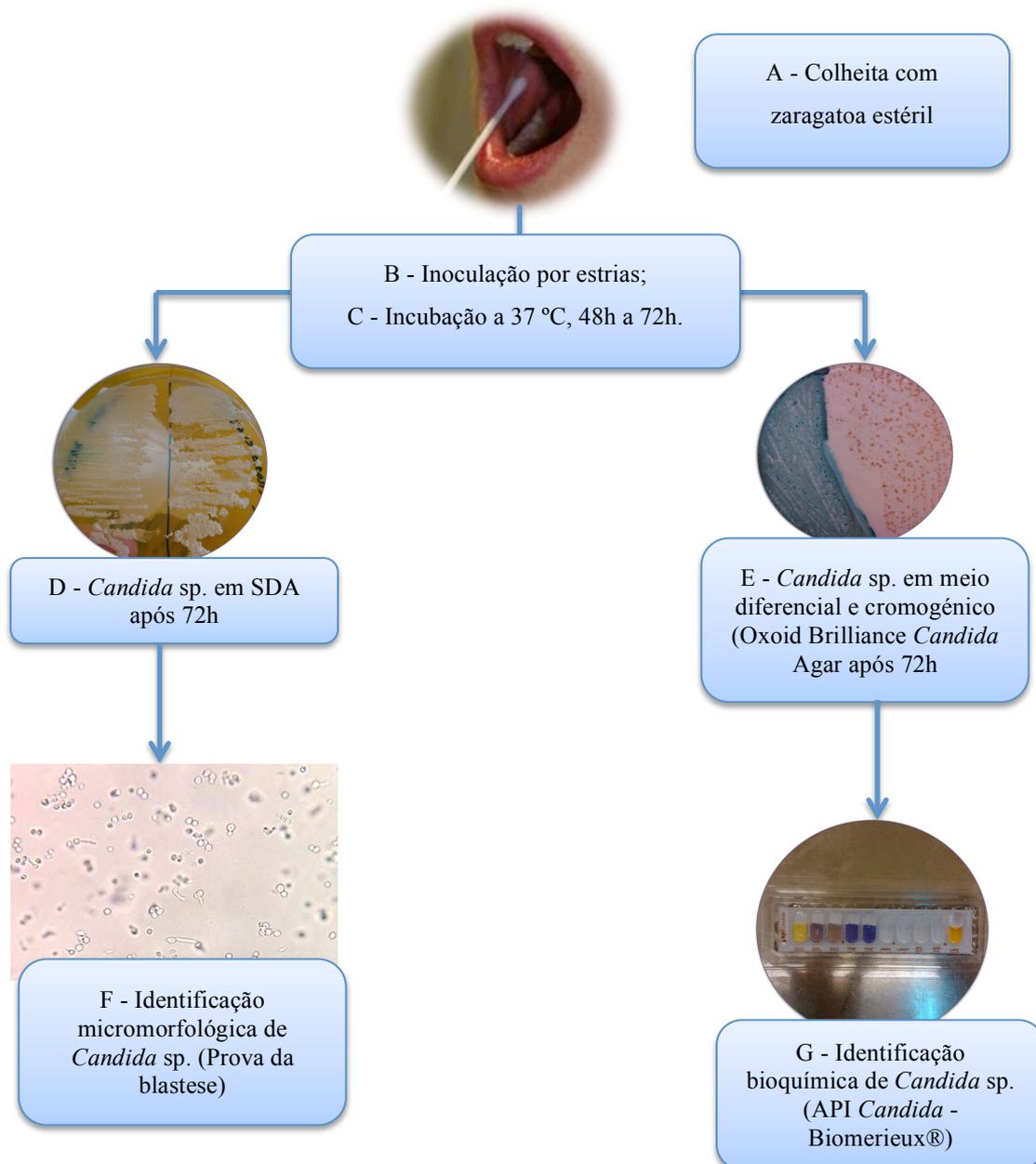
Protocolo Laboratorial

O protocolo laboratorial foi dividido em duas partes: a primeira consistiu na identificação fenotípica dos isolados fúngicos; a segunda, no estudo fenotípico dos fatores de virulência (proteínases e fosfolipases) das diferentes espécies de *Candida* isoladas.

1ª parte: Identificação fenotípica dos isolados fúngicos

No laboratório de microbiologia do ISCSEM, as amostras foram inoculadas por estrias (Figura 6– B) com a própria zaragatoa de colheita (Figura 6 – A) em meio de SDA (Figura 6 - D) e em meio Oxoid Brilliance *Candida* Agar (Figura 6- E).

Figura 6 - Protocolo Laboratorial: A – Colheita com zaragatoa estéril em meio de transporte (Stuart); B – Inoculação por estrias; C – Incubação a 37 °C durante 48/72 horas; D –Resultado de *Candida* sp. em SDA após 72h; E- Exame cultural de *Candida* sp. em meio de cultura cromogénico (Brilliance *Candida* agar); F – Identificação micromorfológica de *Candida* sp. (Prova da blastese) – ampliação 400X; G – Identificação bioquímica de *Candida* sp. (API *Candida* (BioMérieux®))



As placas dos meios de cultura selecionados foram inoculadas dentro da câmara de fluxo laminar horizontal para diminuir o risco de contaminações. Seguidamente, foram incubadas na estufa a uma temperatura de 37 °C durante 48 a 72 horas (Figura 6 – C). Após incubação, foram analisadas as amostras positivas e identificadas algumas

características macroscópicas como aspeto, morfologia, cor e consistência das colónias que posteriormente foram conservadas a -70 °C.

Algumas amostras foram repicadas para meio SDA, de modo a garantir que estavam em fase exponencial de crescimento para uma correta identificação de espécie.

Com o meio diferencial e cromogénico foi possível identificar a maioria das espécies, assim como, detetar a presença de culturas mistas. Porém, foi necessário recorrer a testes fenotípicos para algumas amostras para garantir sucesso na identificação das mesmas. Com essa finalidade foram usadas galerias API *Candida* (BioMérieux®) (Figura 6 - G) e analisadas de acordo com os critérios do fabricante.

A prova da blastese (Figura 6 - F) foi efetuada com vista à diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* de outras espécies, pois estas são as únicas a produzir tubo germinativo no prazo de 2 horas. A distinção entre estas duas espécies só é possível com o auxílio de testes genotípicos que não foram realizados, devido aos custos acrescidos.

2ª parte: Estudo dos fatores de virulência: proteinases e fosfolipases

Após identificação da espécie, foi analisado em laboratório se estas espécies tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares. Assim, realizou-se o estudo dos fatores de virulência com base na capacidade de expressar enzimas extracelulares: proteinases e fosfolipases.

Para determinação da produção de proteinases em laboratório recorreu-se a meios específicos e protocolo laboratorial específico, como descrito a seguir:

Meios de cultura para determinação das proteinases

Meio Yeast Peptone Dextrose (YPD), preparado em 100 ml:

- 2% glucose (dextrose)
- 1% extracto de levedura
- 2% peptona

O meio YPD anteriormente descrito é um meio nutritivo com a finalidade de obter leveduras na fase exponencial de crescimento para posterior inoculação no meio Yeast Carbon Base, Albumina Bovina Fração V (YCB-BSA).

Meio YCB-BSA, preparado em 1000 ml:

- 1) Preparar solução stock de agar a 2%
 - 18 g de agar em 900 ml de água destilada
- 2) Autoclavar a 121°C durante 15 minutos

- 3) Preparar a solução, em 100 ml de água destilada
 - 11,7g Yeast Carbon Base (YCB)
 - 2,0g Albumina bovina (BSA)
 - 1,0g Extrato de levedura
 - Acertar o pH para 5,0 e esterilizar por filtração
- 4) Adicionar a solução preparada em 2) à solução 1) a 50°C
- 5) Distribuir em placas

Solução Amido black – solução de revelação de resultados

- 0,5% amido black
- 49,5% ác. Acético glacial
- 50% água destilada

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

- 1- Inocular duas colónias de levedura em 5ml de caldo YPD durante 12h a 37°C sob agitação;
- 2- Centrifugar 1500rpm/20min
- 3- Lavar o sedimento com tampão PBS durante 30min
- 4- Centrifugar, descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento celular em água destilada estéril
- 5- Aferir a concentração do caldo para McFarland=2,0
- 6- Aplicar os discos no meio de cultura (mdc) YCB_BSA
- 7- Aplicar 10µl de inóculo em cada disco de papel;
- 8- Incubar 7 dias/28°C

Notas:

- Nunca colocar mais de 4 discos por placa
- Efetuar os ensaios em duplicado
- Proceder ao mesmo protocolo experimental para o controlo negativo (NaCl) e controlo positivo (estirpes ATCC)

- 9- Leitura dos resultados

Observar diariamente as zonas de lise à volta do disco

- 10- Revelação dos resultados

Corar com solução de amidoblack

- 11- Medição dos diâmetros das zonas não coradas (atividade proteásica)

- 12- Cálculo do Pz

$Pz = \text{Diâmetro do disco} / \text{diâmetro da zona não corada}$

Adaptado de (Deepa et al., 2015; Ishida et al., 2013; Rûchel, Tegeler, & Trost, 1982)

A atividade das proteinases é avaliada, *in vitro*, em meio de cultura contendo albumina sérica bovina como única fonte de azoto, observando-se uma zona transparente à volta das colónias, resultante da degradação da albumina pelas proteinases secretadas pelo isolado.

Para determinação da produção de fosfolipases em laboratório recorreu-se a meios específicos e protocolo laboratorial específico, como descrito a seguir:

Meio de cultura para determinação das fosfolipases

Meio fosfolipases, para 184 mL

- 1) Base:
 - 13g Sabouraud + Dextrose agar
 - 11,7g cloreto de sódio
 - 0,111g cloreto de cálcio
 - 184 mL de H₂O destilada
- 2) Autoclavar a 121°C durante 15 minutos
- 3) Emulsão de ovo, para 20 ml
 - 20 mL gema de ovo
- 4) Juntar emulsão de ovo ao meio Base
- 5) Distribuir em placas

PROCOLO EXPERIMENTAL

- 1- Inocular duas colónias de levedura em 5ml de caldo YPD durante 12h a 37°C sob agitação;
- 2- Centrifugar 1500rpm/20min
- 3- Lavar o sedimento com tampão PBS durante 30min
- 4- Centrifugar, descartar o sobrenadante e resuspende o sedimento celular em água destilada estéril
- 5- Aferir a concentração do caldo para McFarland=2,0
- 6- Aplicar 10µl de inóculo em quatro locais diferentes da placa;
- 7- Incubar 4 dias/37°C

Notas:

- Nunca colocar mais de 4 pontos de inoculação por placa
- Efetuar os ensaios em duplicado
- Proceder ao mesmo protocolo experimental para o controlo negativo (NaCl) e controlo positivo (estirpes ATCC)

- 8- Leitura dos resultados

Observar diariamente as zonas de precipitação à volta do disco

- 9- Medição dos diâmetros dos halos de precipitação (atividade fosfatásica)
- 10- Cálculo do Pz

$$Pz = \frac{\text{Diâmetro da colónia}}{\text{diâmetro da colónia} + \text{zona de precipitação}}$$

Adaptado de (Deepa et al., 2015; Ishida et al., 2013; Rùchel et al., 1982)

A gema de ovo contém grandes quantidades de fosfolípidos e quando os isolados produtores de fosfolipases são inoculados neste meio produzem uma zona de precipitação branca, bem definida à volta da colónia. Esta zona branca é devida à formação de um complexo de cálcio com os ácidos gordos libertados após a ação das fosfolipases nos fosfolípidos da gema de ovo.

Operacionalização das variáveis

Para análise dos resultados, foram selecionadas as seguintes variáveis:

- Género;

- Idade;
- Grupo diabético e não diabético;
- Tipo de diabetes;
- Combinação Terapêutica;
- Higiene diária;
- Presença de *Candida* sp.
- Expressão de enzimas extracelulares: proteinases;
- Expressão de enzimas extracelulares: fosfolipases;
- HbA1c vs Colonização.

Análise de dados

O tratamento estatístico foi efetuado com o programa IBM® SPSS® Statistics Version 21 para Mac, visto ter suporte para a análise e interpretação dos dados recolhidos.

Procedeu-se à análise de distribuição de frequências e respetivos valores percentuais dos dados anteriormente recolhidos, assim como tratamento estatístico para observar valores de significância para determinadas variáveis de estudo.

Resultados e Discussão

O principal objetivo do presente estudo foi observar a prevalência, grau de colonização e distribuição das diferentes espécies do gênero *Candida* sp. em indivíduos diabéticos não portadores de prótese e avaliar os fatores de virulência que favorecem o desenvolvimento do processo infeccioso. Existem diversos estudos sobre a colonização de *Candida* sp. em indivíduos diabéticos que consideram a DM como um fator crucial na colonização e prevalência de espécie do gênero *Candida* (Fatahinia et al., 2015; Martinez et al., 2013; Sanitá et al., 2014; Talabani et al., 2013; Volpato et al., 2013; Williams & Lewis, 2011).

A análise de dados obtidos através dos inquéritos aplicados foi efetuada no programa de estatística IBM® SPSS® Statistics Version 21, para Mac.

Para que decorresse o estudo, inicialmente dividiu-se a amostra em indivíduos diabéticos e indivíduos não diabéticos, ambos não portadores de prótese. Considerou-se como grupo de estudo, os indivíduos diabéticos e como grupo controle, os indivíduos não diabéticos. A amostra incluiu 117 indivíduos, em que 56,4% (N=66) pertenciam ao grupo diabético e 43,6% (N=51) ao grupo não diabético (Gráfico 1).

Através da Tabela 2, verifica-se que no grupo “Diabético”, o gênero Masculino prevalece com 65,2% (N=43) e no grupo “Não diabético” (grupo controle) o gênero Masculino apresenta-se semelhante ao gênero Feminino com 51% (N=26). Estes resultados sugerem que no gênero masculino é mais prevalente a alteração metabólica denominada de diabetes, o que está em concordância com os resultados obtidos por Paula Bogalho (Bogalho, 2010) sobre a prevalência, diagnóstico e abordagem de DM2, por Maria Santos *et al.* (Santos, Freitas, & Pinto, 2014) que apresenta o gênero masculino como o que incorpora maior número de diabéticos e pela Associação Americana de diabetes (American Diabetes Association, 2014). Por outro lado, Goldenberg *et al.* (Goldenberg, Schenkman, & Franco, 2003) e Talabani *et al.* (Talabani et al., 2013) apresentam resultados não concordantes com os obtidos, em que o gênero feminino é o gênero com mais indivíduos diabéticos.

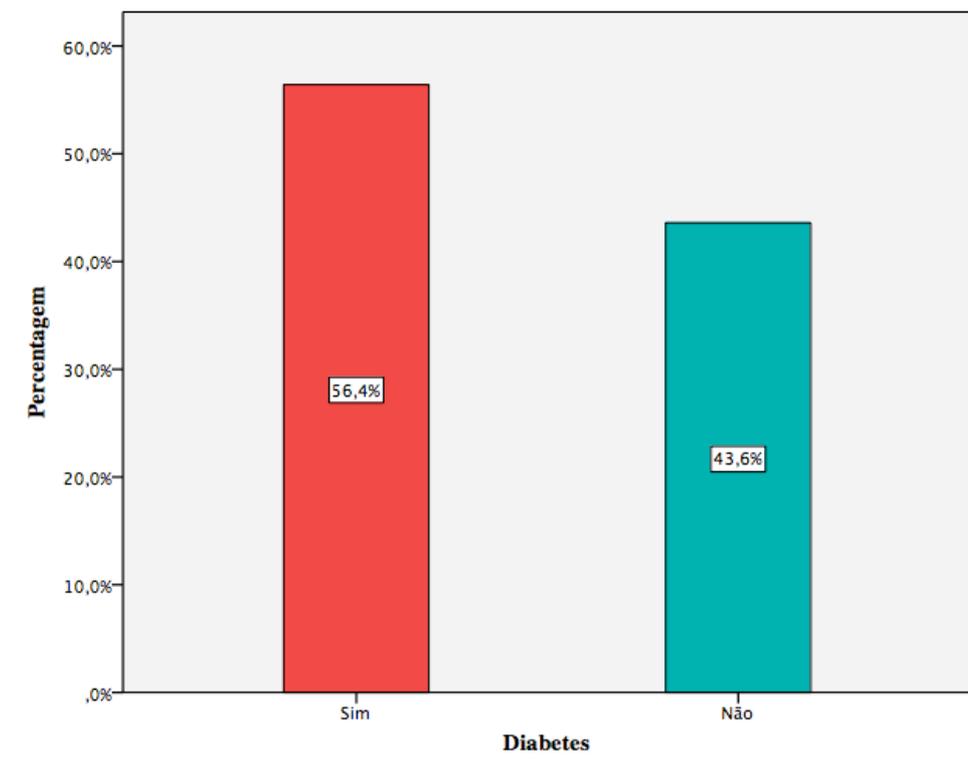


Gráfico 1 - Representação gráfica de percentagens da variável Diabético vs Não Diabético

Tabela 2 - Frequência absoluta e valor percentual referente ao género

Grupo	Género	Frequência (N)	Percentagem (%)
Diabético	Masculino	43	65,2
	Feminino	23	34,8
	Total	66	100
Não diabético	Masculino	26	51
	Feminino	25	49
	Total	51	100

O fator idade é também considerado como um fator de pré-disposição para colonização e infecção por fungos na cavidade oral segundo Rossi, Raju e Williams (De Rossi et al., 2011; Raju & Rajappa, 2011; Williams & Lewis, 2011).

Foram analisadas as idades de ambos os grupos, pelo que foi possível observar uma idade média para o grupo “Diabético” de 64,2 anos de idade com um desvio padrão de 8,26 e um intervalo de confiança para a média a 95% a variar entre os limites 62,1 e 66,2. A idade mínima registada foi de 37 anos e a máxima de 80 anos de idade (Tabela 3).

No grupo controlo, a média de idades é de 36,1 anos de idade, com um desvio padrão de 16,48 e um intervalo de confiança para a média a 95% a variar entre os limites 31,7 e

40,5 (Tabela 3).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a diabetes tem maior prevalência em adultos e idosos, tal como Paulete Goldenberg *et al.* (Goldenberg *et al.*, 2003) e Paula Bogalho (Bogalho, 2010) referem nos seus estudos, em que a DM é mais prevalente em faixa etárias mais avançadas (faixa etária dos 60 aos 79 anos de idade).

Tabela 3 - Média, desvio padrão e intervalo de confiança para ambos os grupos

Grupo	Média (anos de idade)	Desvio padrão	Intervalo de confiança (95%)
Diabético	64,2	8,26	62,1-66,2
Não diabético	36,1	16,48	31,7-40,5

Quanto à variável “Tipo de diabetes”, pela Tabela 4 verifica-se que dentro do grupo de diabéticos (N=66) tem-se 4,5% (N=3) de indivíduos com diabetes tipo 1 ou insulino-dependente, 87,9% (N=58) de indivíduos diabéticos tipo 2 ou insulino-independente e 7,6% (N=5) de indivíduos que não sabe ou não respondeu.

Há uma grande diferença na prevalência de DM1 e DM2, o que poderá ser explicado pelo facto de DM1 ser uma doença mais rara em que a produção de insulina pelo pâncreas não é suficiente ou a qualidade não é razoável e também pelo facto da DM2 estar associada à obesidade (American diabetes Association, 2005; Barbosa, 2013; Saúde, 2012). Os resultados obtidos corroboram com estudos de Bogalho (Bogalho, 2010) e Maria Santos *et al.* (Santos *et al.*, 2014).

Tabela 4 – Frequências e respetivas percentagens do tipo de diabetes

Tipo de diabetes	Frequência (N)	Percentagem (%)
1 insulino-dependente	3	4,5
2 insulino-independente	58	87,9
Não sabe/não responde	5	7,6

No grupo diabético, criaram-se subcategorias no que respeita à medicação que era administrada para o controlo da hiperglicemia. Essas categorias são: (i) **insulina**, para indivíduos que façam apenas insulina IM; (ii) **monoterapia**, para indivíduos que apenas façam a administração de um ADO; (iii) **terapêutica dupla**, para indivíduos que

administrem dois ADO ou indivíduos que façam um ADO e insulina intramuscular (IM); (iv) **terapêutica tripla**, para indivíduos que façam em associação três ADO.

Assim, quanto à variável “Combinação terapêutica”, verificou-se que 4,5% (N=3) dos indivíduos apenas faziam insulina e eram portadores de DM1, 56,1% (N=37) controlavam a doença com monoterapia, 19,7% (N=13) fazia terapêutica dupla com administração de dois ADO, 1,5% (N=1) fazia terapêutica dupla com associação de um ADO e insulina IM e 4,5% (N=3) fazia terapêutica tripla; 13,6% (N=9) do grupo diabético não sabia qual a medicação que administrava para o controlo da diabetes (Gráfico 2). De acordo com os resultados, verificou-se que a monoterapia era a terapêutica mais usada, em que a Met era o fármaco de eleição, tal como demonstrado no estudo de Pinto *et al.* (Pinto et al., 2011)

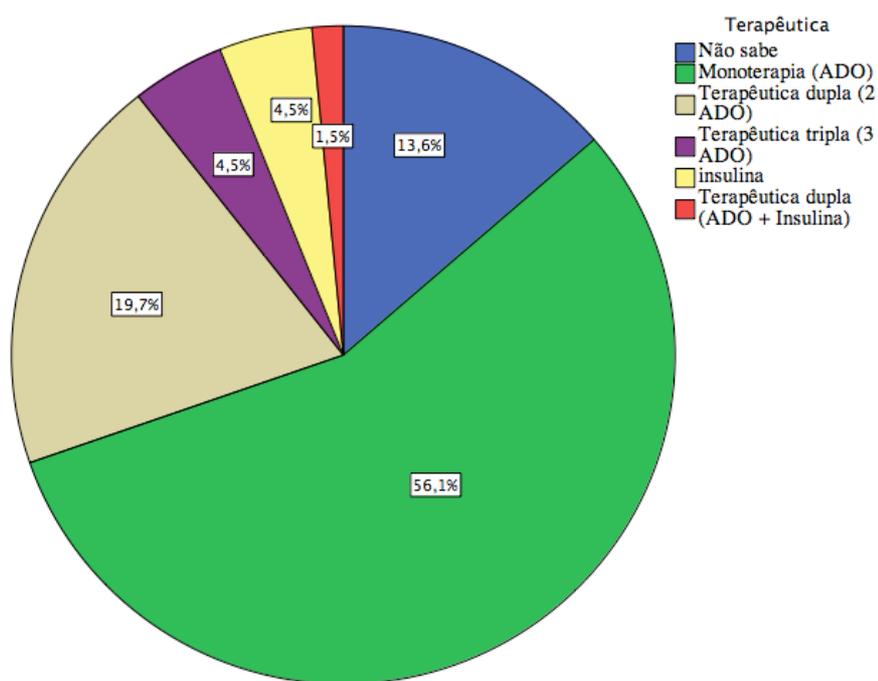


Gráfico 2 - Combinação terapêutica no grupo “diabético”

A saúde oral é um bem essencial que deve ser preservado, e hoje em dia cada vez mais a falta desta, se qualifica como um grave problema de saúde pública, sendo bastante importante a educação e promoção para a saúde oral. Assim, considera-se que a higiene oral diária é uma atividade fulcral em toda a população mas com preocupação acrescida em indivíduos com alterações metabólicas que são mais susceptíveis a infeções da

cavidade oral. A falta desta pode conduzir à criação de biofilme oral que por sua vez leva à colonização de outras bactérias e fungos, principalmente de espécies de *Candida*, responsáveis por infeções a nível da cavidade oral, as candidoses (C. Pereira, Veiga, Amaral, & Pereira, 2013; Rodrigues, 2008).

No presente estudo, relativamente à variável “higiene diária”, verificou-se que no grupo de estudo, 15,2% (N=10) não efetua a sua higiene diariamente, 22,7% (N=15) apenas o fazia uma vez por dia, 37,9% (N=25) praticava a ação 2 vezes por dia, 19,7% (N=13) higienizava a cavidade oral 3 vezes ao dia e 4,5% (N=3) fazia-o 4 vezes ao dia (Gráfico 3); no grupo controlo, 5,9% (N=3) não fazia a higiene da cavidade oral diariamente, 15,7% (N=8) apenas o fazia uma vez por dia, 56,9% (N=29) fazia-o 2 vezes ao dia, 17,6% (N=9) efetua a higiene oral 3 vezes por dia e 3,9% (N=2) fazia-o 4 ou mais vezes ao dia (Gráfico 4).

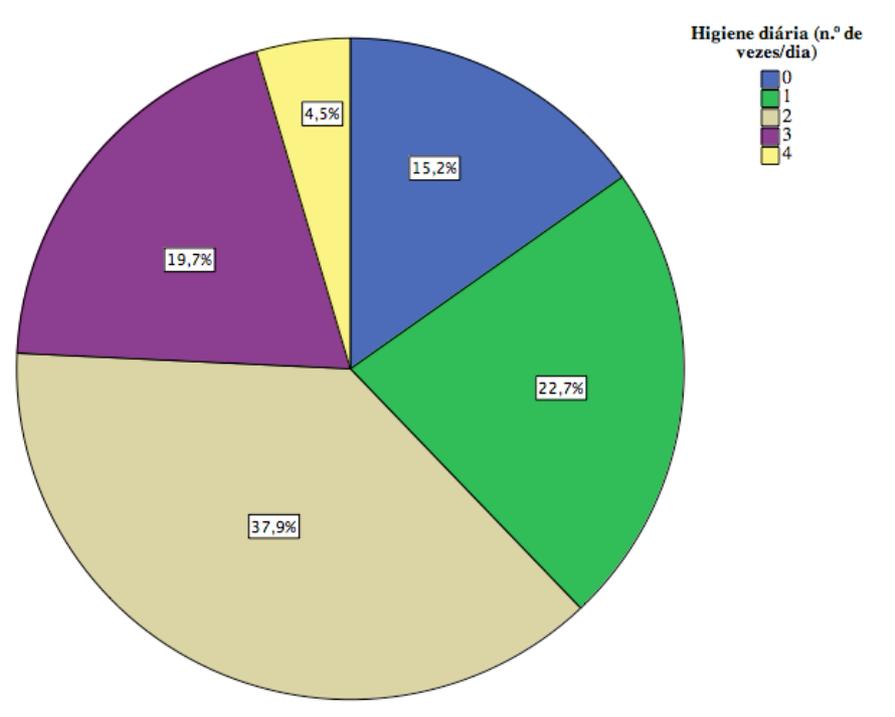


Gráfico 3 - Higiene oral diária no grupo "diabéticos"

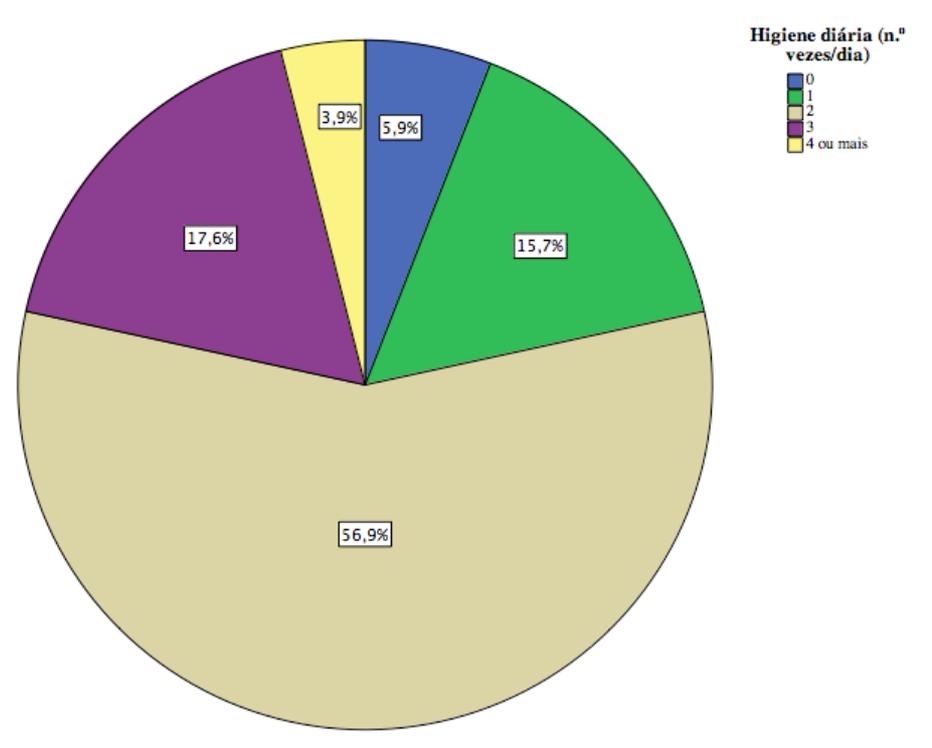


Gráfico 4 - Higiene oral diária no grupo "não diabéticos"

É notável que a grande maioria da população estudada, efetuava a higiene diária duas vezes ao dia. No entanto, também é preocupante a quantidade de indivíduos que não realizava esta tarefa diariamente. Segundo a DGS (Direção Geral da Saúde (DGS), 2005), deve-se escovar os dentes duas ou mais vezes por dia, em que a mais importante será à noite antes de ir dormir.

Quanto à colonização na cavidade oral por leveduras do género *Candida* foi possível observar que 43,9% (N=29) dos indivíduos colonizados eram diabéticos e apenas 17,6% (N=9) do grupo controlo se encontrava colonizado (Gráfico 5). Relativamente ao observado, pelo teste do qui-quadrado há diferença significativa entre ser diabético e estar colonizado quando comparado com o grupo controlo ($\rho=0,003$). Estudos recentes confirmam o resultado obtido no estudo presente (Fatahinia et al., 2015) (Martinez et al., 2013) (Sanità et al., 2014) (Volpato et al., 2013).

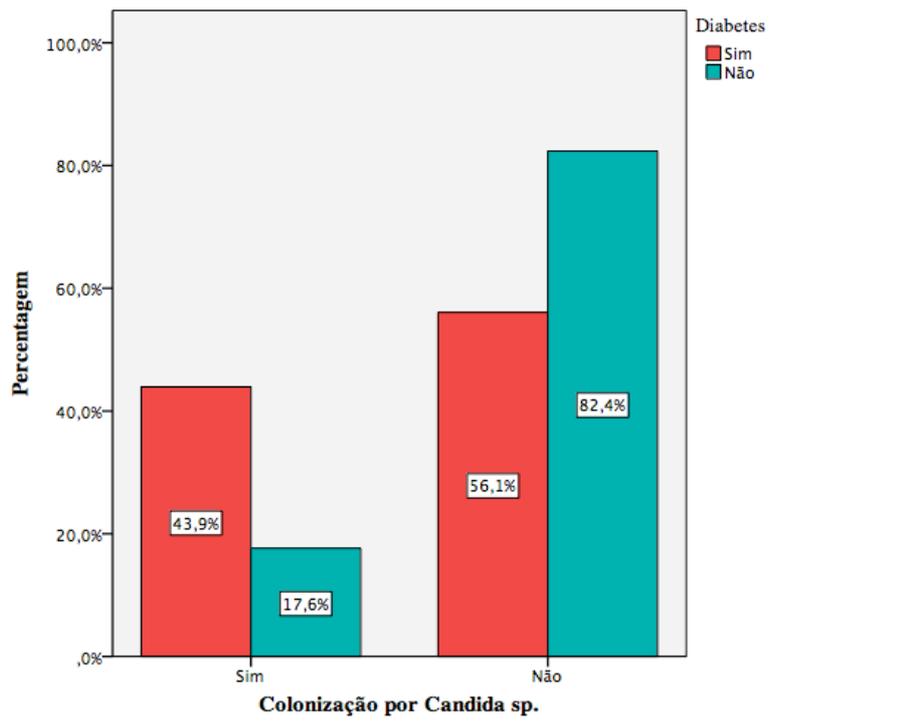


Gráfico 5 - Colonização por *Candida* sp. em ambos os grupos

Para a identificação das diferentes espécies recorreu-se a métodos fenotípicos rápidos, como inoculação em meio de Sabouraud e meio diferencial cromogénico e prova da blastese. Apenas nas amostras de difícil identificação por estes métodos foram efetuados outros testes fenotípicos como o teste de assimilação de hidratos de carbono, azoto e açúcares (API *Candida*).

De entre as diferentes espécies que colonizam a cavidade oral dos indivíduos, verificou-se que a espécie *C. albicans* está presente em 33,3% (N=22) dos indivíduos diabéticos colonizados, quando comparado com o grupo controlo que tem 15,7% (N=8); *C. tropicalis* apenas está presente no grupo diabético com 3% (N=2); culturas mistas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, estão presentes no grupo diabético e no grupo controlo, em 4,5% (N=3) e 2% (N=1), respetivamente; *C. krusei* apenas está presente no grupo de estudo em 3% (N=2) (Gráfico 6).

Volpato *et al.* (Volpato *et al.*, 2013) afirmaram em estudos recentes que *C. albicans* é a espécie mais prevalente na cavidade oral, resultado concordante com o presente estudo, seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guillermondi* quer em indivíduos diabéticos como não diabéticos. Menezes (Menezes & Augusto, 2007) afirmou que *C. albicans* era a espécie mais prevalente na cavidade oral, principalmente de indivíduos diabéticos, no

entanto a percentagem no seu estudo de *C. albicans* (80%) é superior à encontrada no presente estudo em diabéticos (33,3%).

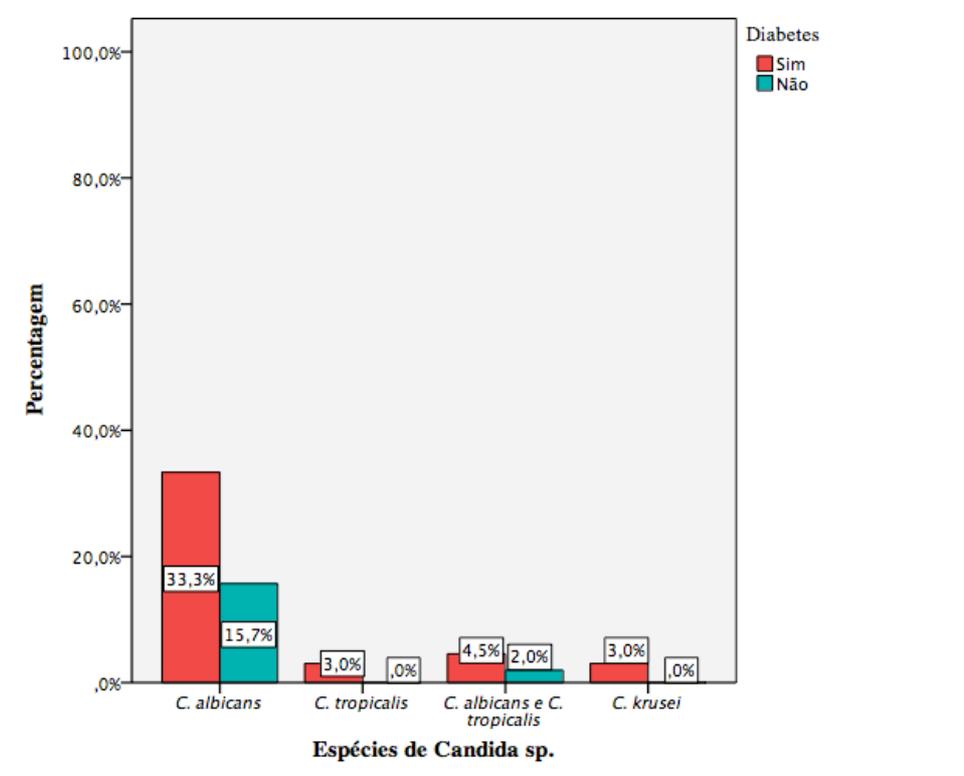


Gráfico 6 – Presença de diferentes espécies em ambos os grupos

A capacidade das leveduras expressarem enzimas extracelulares, proteinases e fosfolipases é recorrentemente usado para avaliar a virulência das diferentes espécies de *Candida*. Para além destes existem outros testes que não foram avaliados no presente estudo, mas que são fundamentais para afirmar com certeza se as leveduras presentes são apenas comensais ou patogénicas (Akçağlar et al., 2011).

Em relação ao estudo da expressão de enzimas extracelulares: proteinases (Figura 7) verificou-se que dos 38 isolados, 63,2% (N=24) não apresentou produção de proteinases, 26,3% (N=10) apresentou uma produção positiva (+) e 10,5% (N=4) apresentou produção positiva forte (++), de acordo com o cálculo de Pz (Error! Reference source not found.). Sanaa Ashor *et al.* (Ashour, Kheiralla, Maklad, Ameen, & Zaki, 2015) confirmou no seu estudo que espécies de *Candida* eram produtora de SAPs, não existindo produção de proteinases em 100% dos isolados, o que mostra que nem todas as estirpes são produtoras de fatores de virulência, como demonstrado no presente estudo.

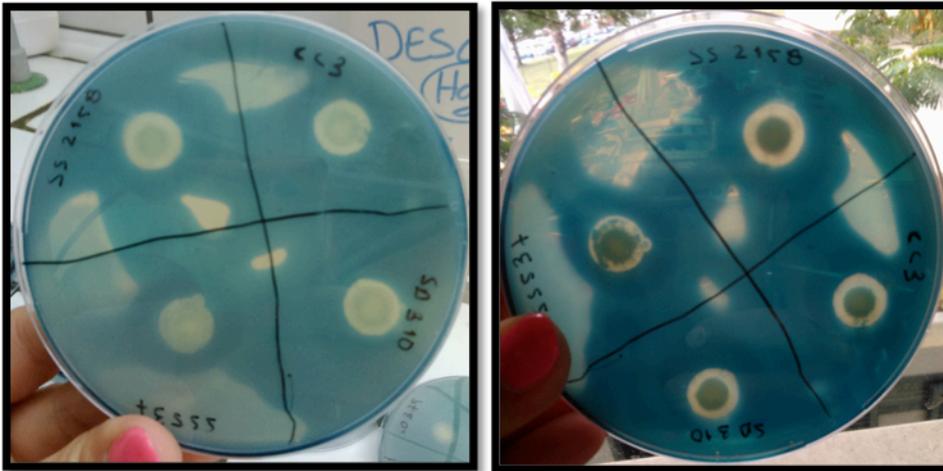


Figura 7 - Resultado da expressão de enzimas extracelulares: proteinases em meio YCB-BSA coradas com a solução de amidoblack para revelação.

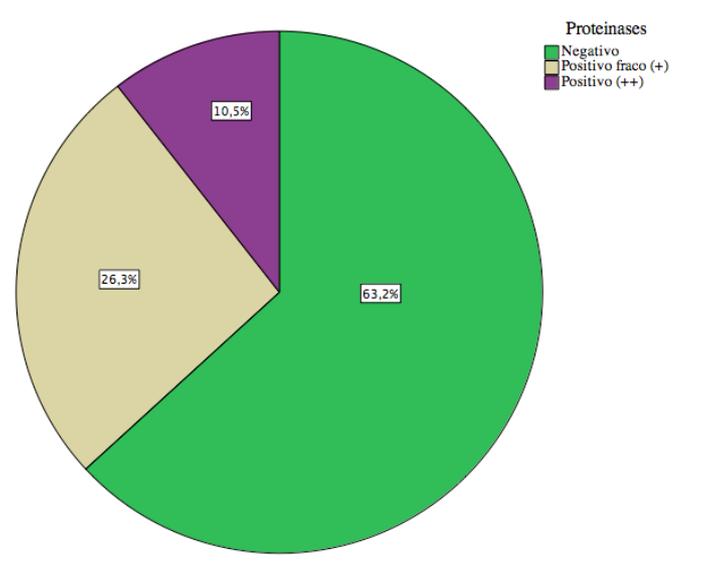


Gráfico 7 – Expressão de enzimas extracelulares: proteinases

Dos 14 isolados de *Candida* sp., que apresentaram positividade para a expressão de enzimas verificou-se que 28,9% (N=11) eram de *C. albicans* e 7,9% (N=3) de culturas mistas de *C. albicans* e *C. tropicalis* (Gráfico 8). Segundo Kantarciog̃lu (Kantarciog̃lu & Yu̇cel, 2002) *C. albicans* apresentou atividade proteiásica em 95% das suas amostras, percentagem bastante superior em relação ao presente estudo (36,8%, N=14). Segundo Kelly Rorig *et al.* (Rorig, Colacite, & Abegg, 2009), *C. albicans* não foi a espécie que apresentou maior atividade de produção de proteinases, tendo sido *C.*

tropicalis a espécie com maior atividade, o que se opõe ao presente estudo em que *C. albicans* foi a espécie que apresentou maior atividade.

Pela Tabela 5 é possível observar as frequências e percentagens de produção de proteinases consoante a espécie e o grupo diabético/não diabético. Verificou-se que no grupo diabético, 21,1% (N=8) eram de *C. albicans*, 7,9% (N=3) eram de *C. albicans* e *C. tropicalis* (cultura mista) e no grupo controlo, verificou-se que 7,9% (N=3) eram de *C. albicans* (Gráfico 9). Segundo Everardo Menezes (Menezes & Augusto, 2007) no estudo sobre a frequência de fatores de virulência em diabéticos, 86,6% produziram proteinases em que 12 isolados pertenciam a *C. albicans* e apenas 1 a *C. tropicalis*, tal como aconteceu neste estudo.

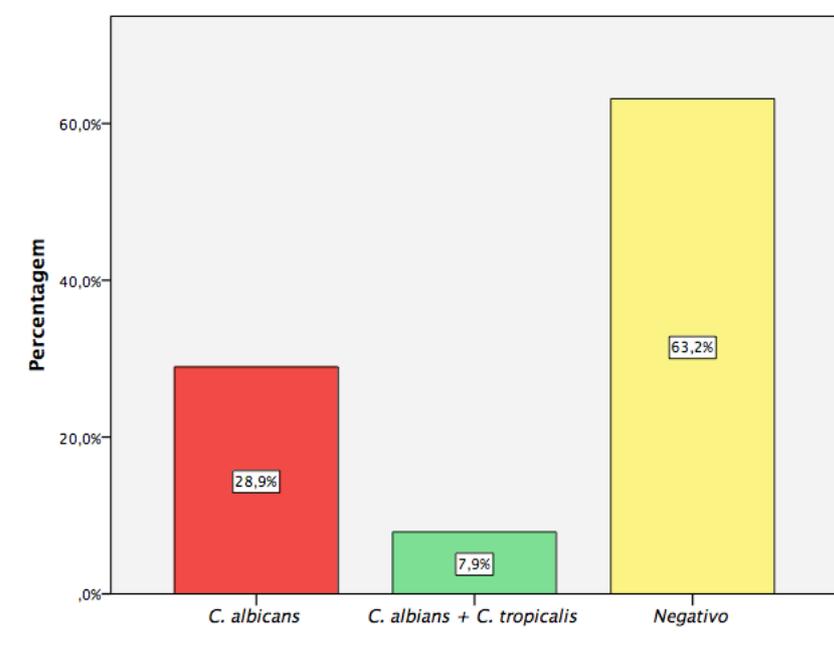


Gráfico 8 - Expressão de proteinases por espécie

Tabela 5 - Frequências absolutas e respetivas percentagens de produção de proteinases por espécie vs grupo diabético/não diabético.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans + C. tropicalis</i>		Negativo	
	Frequências (N)	Percentagem (%)	Frequências (N)	Percentagem (%)	Frequências (N)	Percentagem (%)
Diabéticos	8	21,1	3	7,9	18	47,4
Não diabéticos	3	7,9	0	0	5	13,2

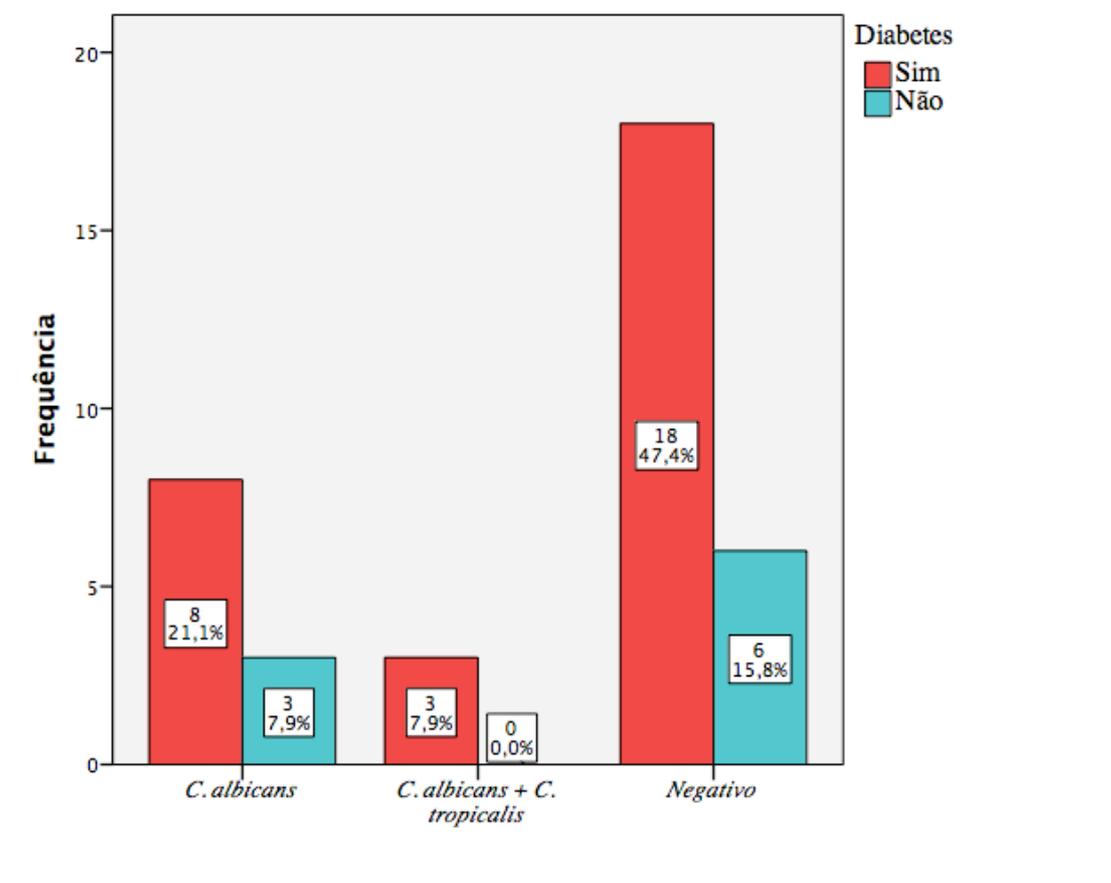


Gráfico 9 -Produção de proteinases por espécie vs grupo diabético/não diabético

No estudo de produção de fosfolipases (Figura 8) 12 estirpes (31,6%) não expressaram fosfolipases e 26 (68,4%) produziram essas enzimas, em que 10,5% (N=4) é positivo fraco (+), 36,8% (N=14) é positivo (+++) e 21,1% (N=8) apresenta um positivo muito forte (++++), resultados de acordo com a o cálculo do Pz (Gráfico 10); positivo (++) com Pz entre 0,8 e 0,89 não há nenhuma amostra. Segundo Kantarciog˘lu (Kantarciog˘lu & Yu˘cel, 2002) cerca de 62,1% dos isolados produziram fosfolipases tal como no presente estudo. Jaqueline Silva *et al.* (Silva, Ferreira, & Candido, 2007) mostraram que algumas das espécies de *Candida* produzem fosfolipases.

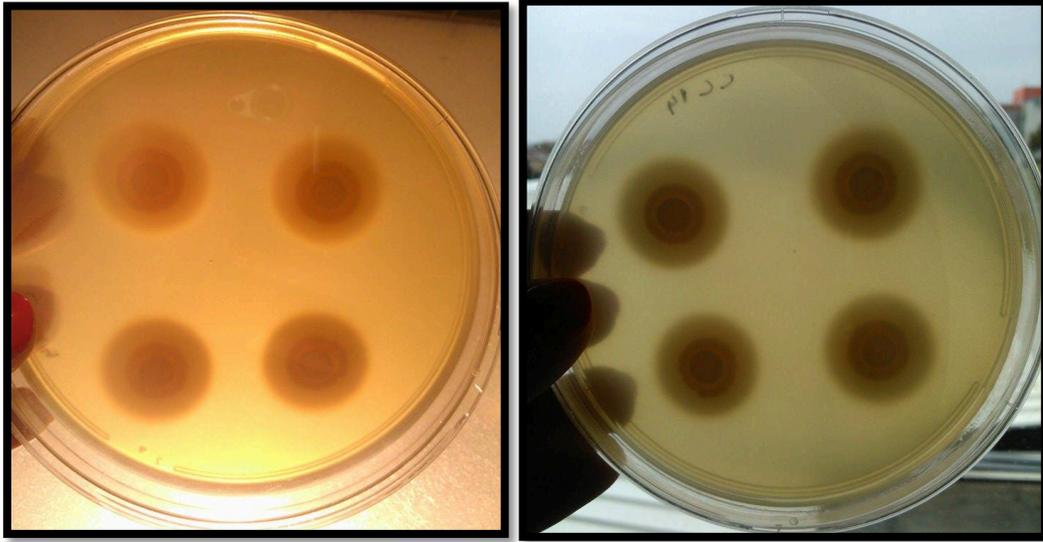


Figura 8 - Resultado da expressão de enzimas extracelulares: fosfolipases em meio fosfolipase

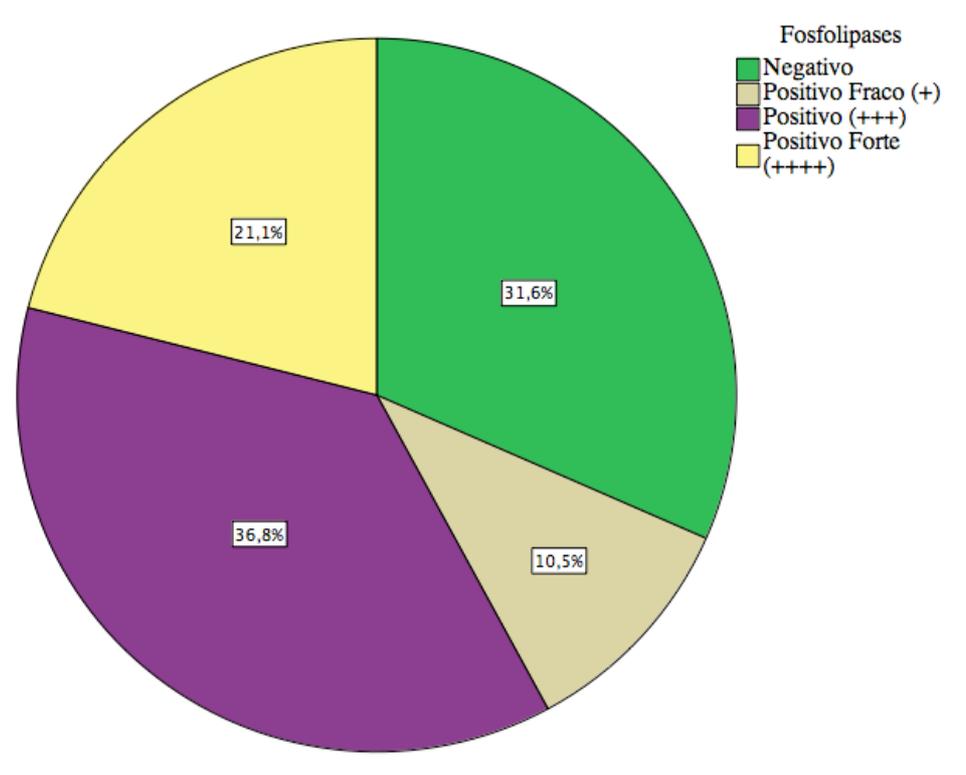


Gráfico 10 - Expressão de enzimas extracelulares: fosfolipases

Das 26 estirpes positivas, verificou-se que 57,9% (N=22) eram produzidas por *C. albicans*, 7,9% (N=3) eram produzidas por culturas mistas, 2,6% (N=1) eram produzidas por *C. tropicalis* (Gráfico 11). Rörig *et al.* (Rörig *et al.*, 2009) apresenta resultados não concordantes com o presente estudo no que refere à espécie com maior

atividade enzimática, apontando para *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* como a espécie com maior atividade.

Pela tabela de frequências e percentagens (Tabela 6), verifica-se que: no grupo diabético, 42,1% (N=16) eram correspondentes a *C. albicans*, 5,3% (N=2) eram de cultura mista e 2,6% (N=1) eram de *C. tropicalis*; no grupo não diabético, 15,8% (N=6) eram de *C. albicans*, 2,6% (N=1) era cultura mista e não existiu nenhuma de *C. tropicalis* (Gráfico 12). Menezes *et al.* (Menezes & Augusto, 2007) verificou no seu estudo em diabéticos que 80% dos isolados eram produtores de fosfolipases, sendo 100% pertencentes à espécie *C. albicans*.

Também Hernández-solís *et al.* (Hernández-solís & Rueda-gordillo, 2015) demonstraram que nos grupos imunocomprometidos, há maior número de produção de enzimas extracelulares.

Alves *et al.* (T. Alves, Neto, Santos, Maria, & Lemes, 2014) demonstraram no seu estudo que as espécies que têm maior capacidade para produzir enzimas extracelulares são *C. glabrata* e *Candida* do complexo “*psilosis*”, resultados que diferem do presente estudo.

A presença destes fatores de virulência na cavidade oral de indivíduos diabéticos sugere um estudo desses fatores mais pormenorizado, uma vez que a candidose pode ser considerado um foco para disseminação de infeção.

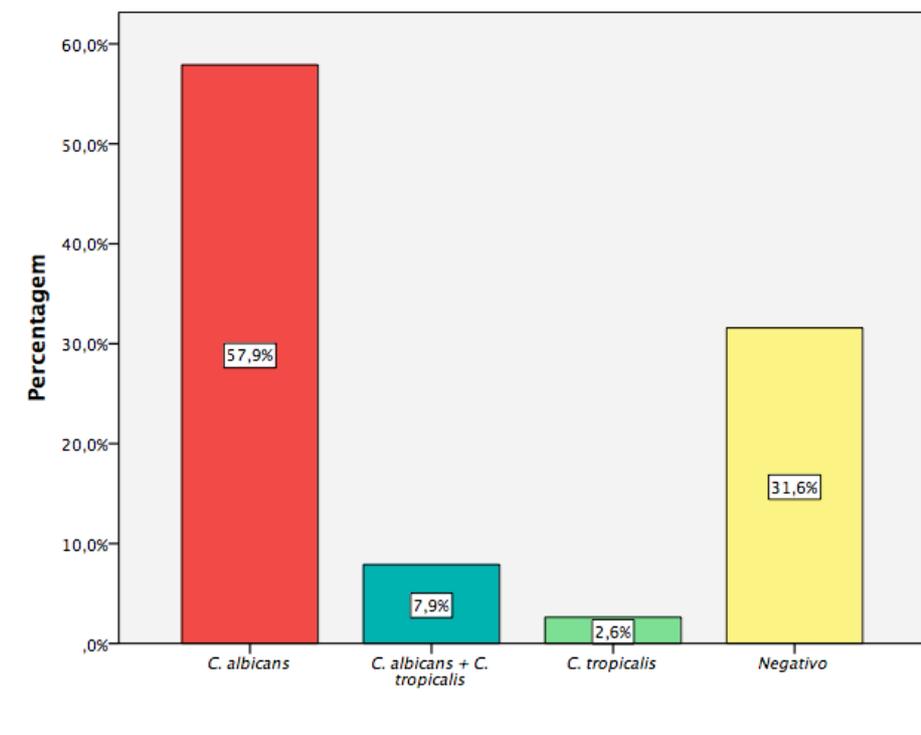


Gráfico 11 - Expressão de fosfolipases por espécie

Tabela 6 - Frequências absolutas e respectivas percentagens de produção de fosfolipases por espécie vs grupo diabético/não diabético

	<i>C. albicans</i>		<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i>		<i>C. tropicalis</i>		Negativo	
	Frequências (N)	Percentagem (%)	Frequências (N)	Percentagem (%)	Frequências	Percentagem (%)	Frequências (N)	Percentagem (%)
Diabéticos	16	42,1	2	5,3	1	2,6	10	26,3
Não diabéticos	6	15,8	1	2,6	0	0	2	5,3

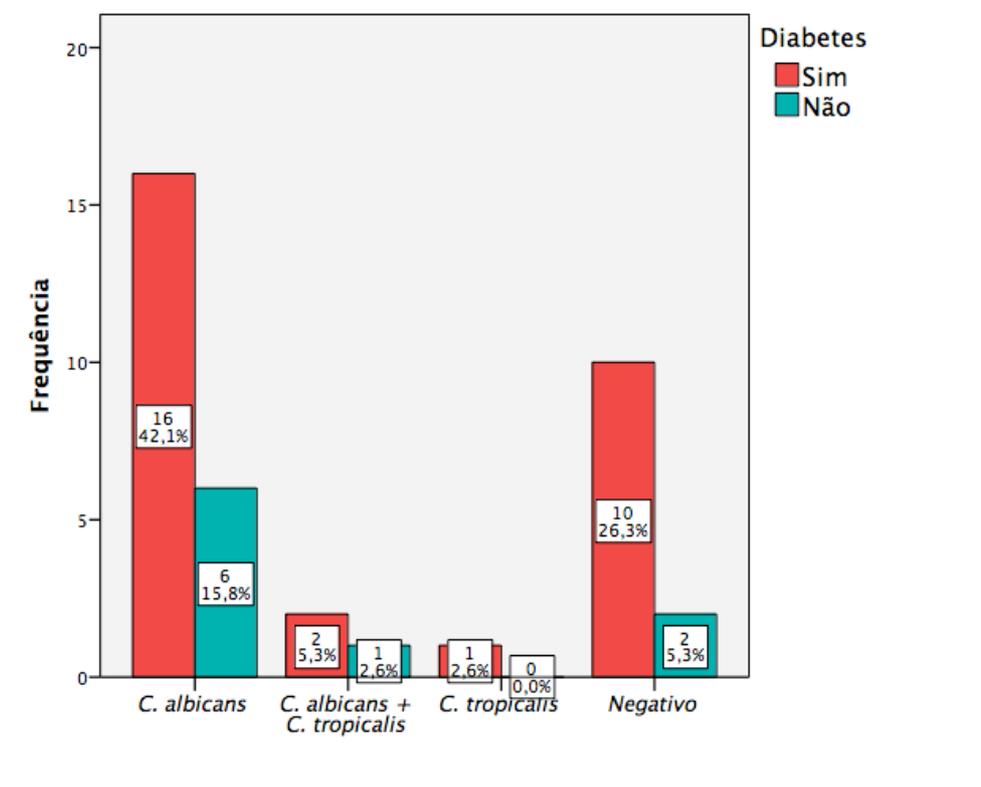


Gráfico 12 - Produção de fosfolipases por espécie vs grupo diabético/não diabético

Por fim foi avaliada a variante HbA1c. Verificou-se que 60,6% (N=40) apresentava a HbA1c superior a 6,5%, 25,8% (N=17) apresentava a HbA1c controlada e para 13,6% (N=9) não foi possível determinar este parâmetro bioquímico (Gráfico 13).

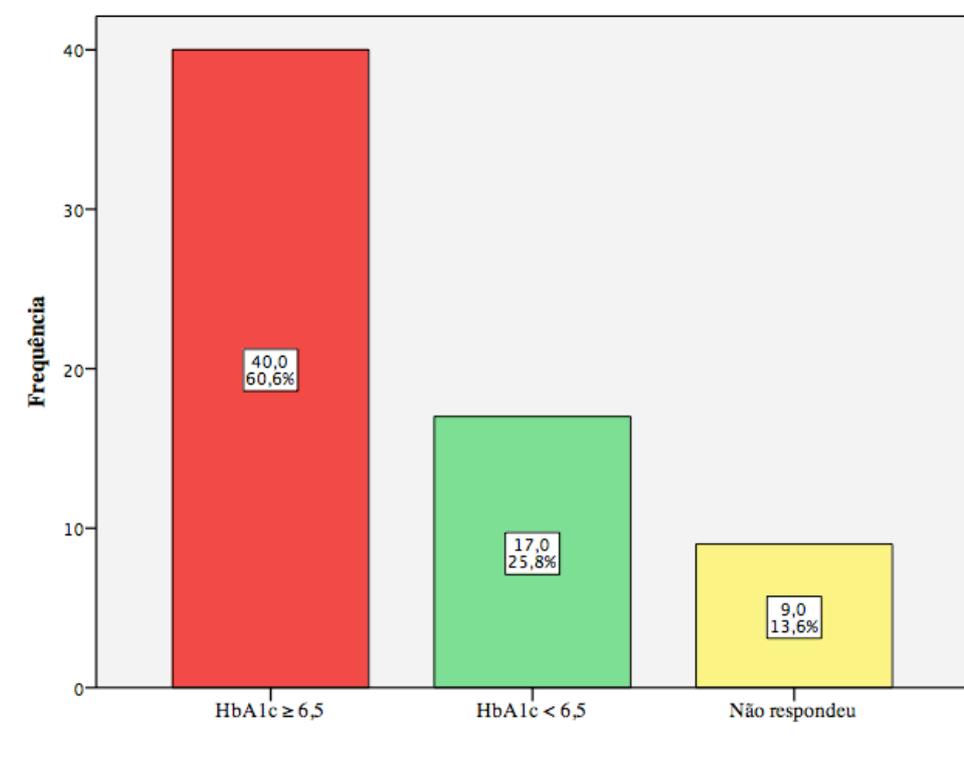


Gráfico 13 - Controle de HbA1c em indivíduos diabéticos

Pela variável “Colonização por *Candida* vs HbA1c”, verificou-se que 28 dos indivíduos diabéticos era colonizado por *Candida*, em que 67,9% (N=19) apresentava valores de HbA1c superiores a 6,5%, ou seja apresentavam a doença descontrolada e 32,1% (N=9) apresentavam valores de HbA1c controlada (< 6,5%) (Gráfico 14).

Após realização do teste do qui-quadrado verificou-se que não havia significado estatístico entre ter a diabetes descontrolada e estar colonizado por leveduras do género *Candida*, no entanto prevê-se um risco acrescido para a colonização. Dos 57 indivíduos em que foi possível determinar a HbA1c, 21 (72,4%) não apresentava colonização mas tinha valores de HbA1c superiores a 6,5%. Este resultado pode encontrar-se inflacionado pelo facto de ser uma amostra pequena. Segundo Manfredi *et al.* (Manfredi, McCullough, Al-Karaawi, Hurel, & Porter, 2002) não há diferença significativa na HbA1c descontrolada e a colonização por *Candida*, tal como sugere o presente estudo.

No entanto, Shenoy *et al.* (Shenoy et al., 2014) defende que manifestações de infecção na cavidade oral, como a candidose poderão estar dependentes do controlo de HbA1c em diabéticos.

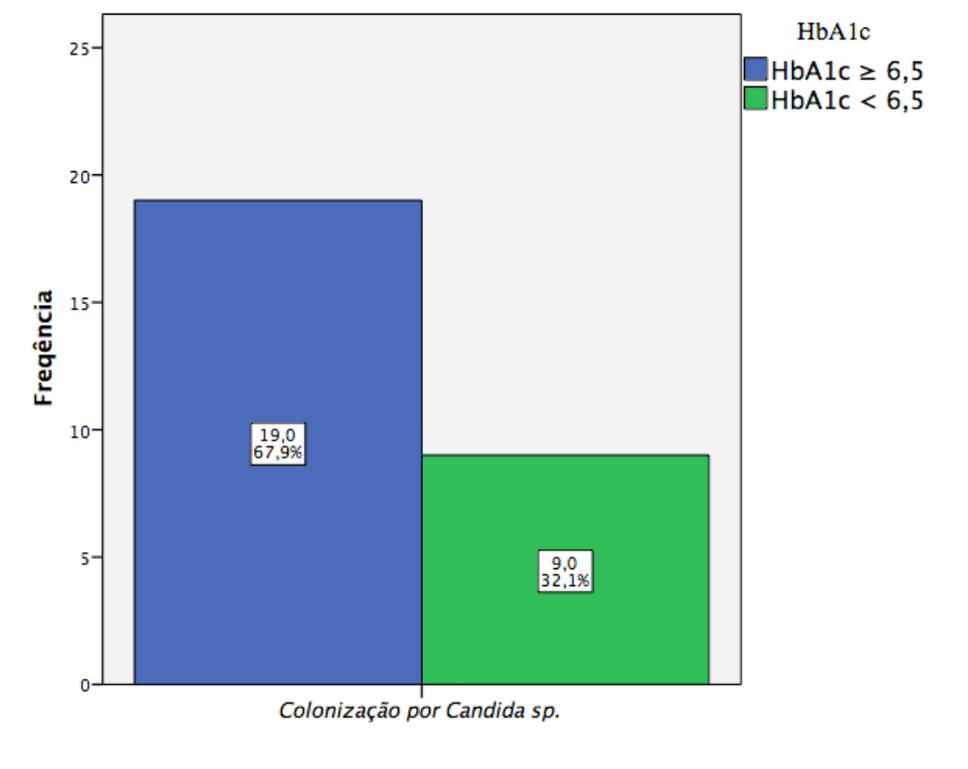


Gráfico 14 - Presença de *Candida* sp. em indivíduos diabéticos

A espécie mais prevalente no grupo em que a HbA1c é superior a 6,5% é *C. albicans* (Gráfico 15) visto que 14 indivíduos estavam colonizado por esta espécie.

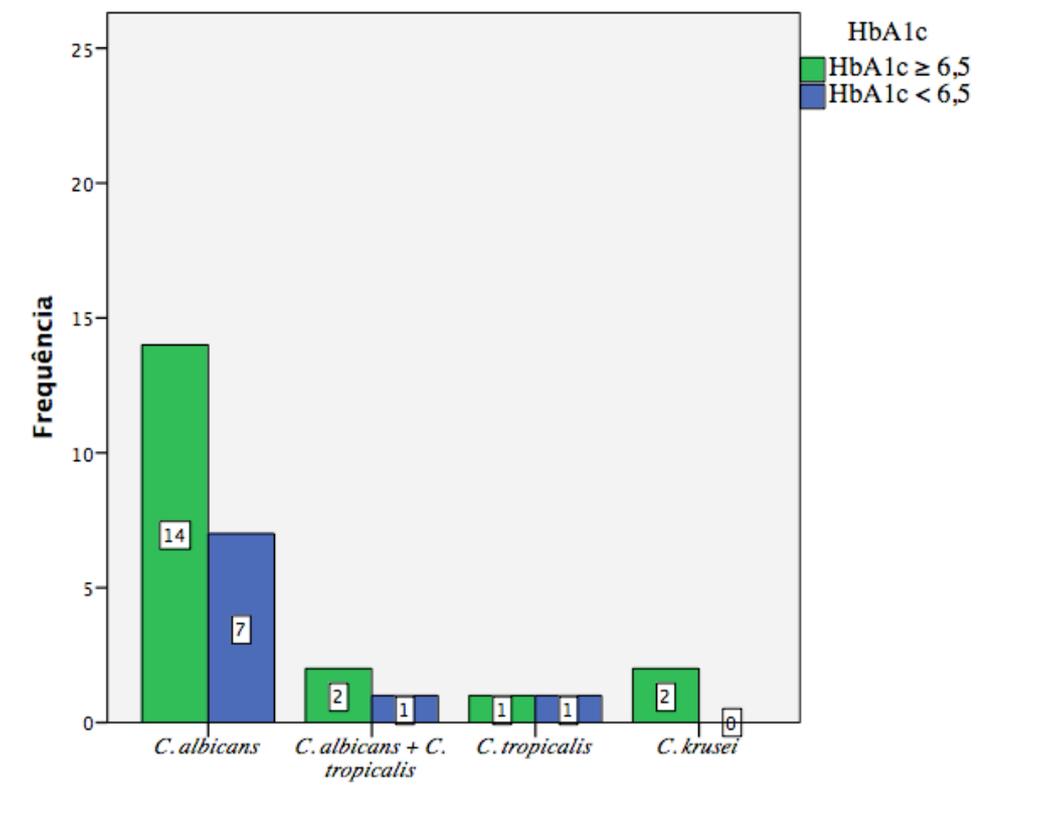


Gráfico 15 - Presença de diferentes espécies no grupo diabético de acordo com valores HbA1c ≥ 6,5% ou < 6,5%

Conclusões

Candida sp. é um fungo ubiqüitário que faz parte da flora comensal do Homem. Está presente em cerca de 40% a 60% dos indivíduos saudáveis (Shenoy et al., 2014). Quando perante sistemas imunitários debilitados, pode evoluir de comensal a patogénico (Boparai et al., 2014; François et al., 2013).

A infeção por *Candida* sp. depende de diversos fatores de virulência, tais como: alterações fenotípicas; capacidade de adesão e invasão por adesinas; capacidade de expressar enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases e formação de biofilme (Deepa et al., 2015; Hernández-solís & Rueda-gordillo, 2015). Para além destes, existem fatores predisponentes do Hospedeiro como: pH e temperatura da cavidade oral; sistema imunitário debilitado; xerostomia; distúrbios endócrinos; doenças sistémicas; antibioterapia prolongada (Hernández-solís & Rueda-gordillo, 2015; Pereira-Cenci et al., 2008; Raju & Rajappa, 2011).

A colonização por *Candida* foi demonstrada, com maior incidência em indivíduos diabéticos quando comparados com indivíduos não diabéticos, 43,9% e 17,6%, respetivamente. Assim, afirma-se que ser diabético e estar colonizado por *Candida* é um fator importante a ter em conta, visto existir diferença estatística.

No que respeita às diferentes espécies, verificou-se uma maior colonização por *C. albicans*, em particular no grupo diabético (33,3%), tal como em estudos recentes.

Relativamente à capacidade de expressar enzimas extracelulares, como proteinases e fosfolipases, conclui-se que leveduras do género *Candida* albergam essa capacidade, e é *C. albicans* a espécie com maior capacidade de as expressar. Indivíduos diabéticos, apresentam o sistema imunitário comprometido e assim são mais susceptíveis à infeção por este fungo. O género *Candida*, mais concretamente a espécie *C. albicans* expressa mais enzimas extracelulares quando perante um sistema imunitário debilitado.

A HbA1c poderá ser um fator importante para a colonização por *Candida*, pois quando esta se encontra descontrolada, poderá deixar os indivíduos mais susceptíveis a infeções causadas por este género a nível da cavidade oral, como candidose. No presente estudo não se verificou uma diferença significativa para a colonização por *Candida*, estando HbA1c controlada ou não. No entanto, conclui-se que há um risco acrescido para a colonização por *Candida* se a HbA1c estiver descontrolada.

É necessário que haja continuidade nos estudos de virulência do género *Candida*, uma vez que a expressão de enzimas extracelulares não é por si só suficiente para se poder

afirmar que a espécie é virulenta ou não. Assim, como também é importante o estudo da formação de biofilme, aspeto fulcral na colonização e infeção por leveduras do género *Candida*.

Referencias bibliográficas

- Akçağlar, S., Ener, B., & Töre, O. (2011). Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains : a comparison of spectrophotometry and plate methods, 35, 559–567. doi:10.3906/biy-1002-39
- Al-Fattani, M. a., & Douglas, L. J. (2006). Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 999–1008. doi:10.1099/jmm.0.46569-0
- Alves, D. L. N. (2009). *Candida spp. e Prótese Dentária Removível: Interações de Relevância Clínica – Revisão Bibliográfica*. (Tese de Mestrado)
- Alves, T., Neto, P., Santos, M., Maria, R., & Lemes, L. (2014). Caracterização fenotípica e perfil de virulência de leveduras do gênero *Candida* obtidas em aulas práticas, 333–343.
- American diabetes Association. (2005). Diagnosis and classification. *World Health*, 28(Suppl 1). doi:10.2337/diacare.27.2007.S5
- American Diabetes Association. (2014). National Diabetes Statistics Report , 2014 Estimates of Diabetes and Its Burden in the Epidemiologic estimation methods. *National Diabetes Statistics Report*.
- Ashour, S. M., Kheiralla, Z. M., Maklad, S. S., Ameen, M. R., & Zaki, S. S. (2015). Relationship between virulence factors of *Candida* species with candiduria and myeloperoxidase concentrations. *Int. J. Curr. Microbiol. ...*, 4(1), 108–123. Disponível em [http://www.ijemas.com/vol-4-1/Sanaa M. Ashour, et al.pdf](http://www.ijemas.com/vol-4-1/Sanaa%20M.%20Ashour,%20et%20al.pdf)
- Avila, M., Ojcius, D. M., & Yilmaz, O. (2009). The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA and Cell Biology*, 28(8), 405–411. doi:10.1089/dna.2009.0874
- Barbedo, L. S., & Sgarbi, D. B. (2010). Candidíase. *J Bras Doenças Sex Transm*, 22(1), 22–38.
- Barbosa, K. G. N. (2013). The complex relationship between diabetes mellitus and periodontal disease. *ClipeOdonto*, 5(1), 65–71.
- Barroso, H., Taveira, N., & Meliço-Silvestre, A. (2014). *Microbiologia Médica*.
- Bogalho, P. (2010). Prevalência, diagnóstico e abordagem da Diabetes tipo 2.
- Boparai, N., Amasi, U., Patil, R., & Harakuni, S. (2014). To assess candidal colonization and species diversity in the oral cavity of diabetic and nondiabetic denture wearers and correlation with the presence of *Candida* on finger tips of the patients: An in vivo study. *Indian Journal of Health Sciences*, 7(1), 45. doi:10.4103/2349-5006.135041

- Brilliance, O. (2008). Brilliance Oxoid Candida agar.
- Campbell, C. K., Davey, K. G., Holmes, A. D., Szekely, A., & Warnock, D. W. (1999). Comparison of the API Candida system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), 821–3. Disponível em <http://jcm.asm.org/content/37/3/821.abstract>
- Carlos, G. L., Anakaren, G., Nemesio, E., Israel, G. G., & Patricia, G. (2013). Incidence of *Candida albicans* in diabetic patients with a dental prosthesis in Northeast Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 7(41), 4844–4847. doi:10.5897/AJMR2013.2515
- Cho, T., Nagao, J.-I., Imayoshi, R., & Tanaka, Y. (2014, January). Importance of Diversity in the Oral Microbiota including *Candida* Species Revealed by High-Throughput Technologies. *International Journal of Dentistry*, 2014. doi:10.1155/2014/454391
- De Rossi, T., Lozovoy, M. A. B., Silva, V. Da, Fernandes, E. V., Geraldino, T. H., Costa, I. C., ... Felipe, I. (2011). Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Ciências Biológicas E Da Saúde*, 32(1), 15–28. doi:10.5433/1679-0367.2011v32n1p15
- Deepa, A. K., Jeevitha, T., & Michael, A. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 7(March), 28–32. doi:10.5897/JMA2015.0337
- Deepa, A. K., Sumathi, M., Krishna, B., Uma, B., Seemi, F. B., & Luqman, A. K. (2014). Species Diversity, Antifungal Susceptibility, and Virulence Attributes of *Candida* Colonising the Oral Cavities of Adult Diabetic Patients, 2014.
- Dewhirst, F. E., Chen, T., Izard, J., Paster, B. J., Tanner, A. C. R., Yu, W. H., ... Wade, W. G. (2010). The human oral microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5002–5017. doi:10.1128/JB.00542-10
- Direção Geral da Saúde (DGS). (2005). Saúde Oral das Pessoas Idosas.
- Direção Geral da Saúde (DGS). (2014). Factos e Números.
- Fatahinia, M., Poormohamadi, F., & Mahmoudabadi, A. Z. (2015). Comparative Study of Esterase and Hemolytic Activities in Clinically Important *Candida* Species, Isolated From Oral Cavity of Diabetic and Non-diabetic Individuals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), 3–6. doi:10.5812/jjm.20893
- Filoche, S., Wong, L., & Sissons, C. H. (2010). Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), 8–18. doi:10.1177/0022034509351812
- François, L. M., Duncan, W., & Bernhard, H. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. doi:10.4161/viru.22913

- Garcia, E. de la R., Zapata, M. M., Sanchez-Vargas, L.-O., & Padilla, A. M. (2013). Oral colonisation and infection by *Candida* sp. in diabetic and non-diabetic patients with chronic kidney disease on dialysis, *33*(6), 1–11.
- George, F. H. M. (2013). Francisco Henrique Moura George. *Norma Da Direção Geral Da Saúde*, 9. Disponível em <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i018596.pdf>
- George, F. H. M. (2015). Abordagem terapêutica farmacológica na Diabetes Mellitus tipo 2 no adulto, 1–28.
- Giolo, M. P., & Svidzinski, T. I. E. (2010). Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, *46*(3), 225–234. doi:10.1590/S1676-24442010000300009
- Goldenberg, P., Schenkman, S., & Franco, L. J. (2003). Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, *6*(1), 18–28. doi:10.1590/S1415-790X2003000100004
- Gow, N. a. R., Veerdonk, F. L. van de, Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(2), 112–122. doi:10.1038/nrmicro2711
- Hammad, M. M., Darwazeh, A. M. G., & Idrees, M. M. (2013). The effect of glycemic control on *Candida* colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *116*(3), 321–326. doi:10.1016/j.oooo.2013.05.013
- Hernández-solís, S. E., & Rueda-gordillo, F. (2015). Actividad de la proteinasa en cepas de *Candida albicans* aisladas de la cavidad oral de pacientes inmunodeprimidos , con candidiasis oral y sujetos sanos, *31*(2), 137–140.
- Ishida, K., Ueda-Yamaguchi, M., Yamada-Ogatta, S. F., Ueda-Naklamura, T., Svidzinski, T. I. E., & Nakamura, C. V. (2013). Characterization of *Candida* spp. isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. *Acta Scientiarum. Health Science*, *35*(1), 1–8. doi:10.4025/actascihealthsci.v35i1.13557
- Javed, F., Tenenbaum, H. C., Nogueira-Filho, G., Nooh, N., Taiyeb Ali, T. B., Samaranyake, L. P., & Al-Hezaimi, K. (2014). Oral *Candida* carriage and species prevalence amongst habitual gutka-chewers and non-chewers. *International Wound Journal*, *11*(1), 79–84. doi:10.1111/j.1742-481X.2012.01070.x
- JCO, S., FP, G., NS, P., AM, F.-A., & MJS, M.-G. (2013). In vitro Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Isolates from Patients with Chronic Periodontitis and Diabetes. *Clinical Microbiology: Open Access*, *02*(01), 2–5. doi:10.4172/2327-5073.1000103

- Kantarcioğlu, A. S., & Yuçel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*, *45*, 160–165.
- Khaled, H. A.-E., Mawieh, A. H., & Suleiman, A. S. (2006). Prevalence of oral candida infections in diabetic patients. *Bahrain Medical Bulletin*, *28*(1), 12–17.
- Lopes, R. J. N. (2014). *Interactoma da cavidade oral em diabetes*. (Tese de Mestrado)
- Manfredi, M., McCullough, M. J., Al-Karaawi, Z. M., Hurel, S. J., & Porter, S. R. (2002). The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology*, *17*(3), 181–185. doi:10.1034/j.1399-302X.2002.170308.x
- Martinez, R. F. F., Hernández-pérez, F., Miguel, G. F., Jaimes-aveldañez, A., & Arenas, R. (2013). Oral *Candida* spp carriers: its prevalence in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *An Bras Dermatologia*, *88*(2), 222–225.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). Hsp21 Potentiates Antifungal Drug Tolerance in *Candida albicans*. *PLoS ONE*, *8*(3), 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0060417
- Melo, I. A., & Guerra, R. C. (2014). CANDIDÍASE ORAL : UM ENFOQUE SOBRE A ESTOMATITE POR PRÓTESE, 389–414.
- Menezes, E. A., & Augusto, K. L. (2007). Frequência e atividade enzimática de *Candida* spp . na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE. *J Bras Patol Med L*, *43*(4), 241–244.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. a. (2011). *Microbiologia Médica*.
- Netto, A. P., Andriolo, A., Fraige Filho, F., Tambascia, M., Gomes, M. D. B., Melo, M., ... Cavalcanti, S. (2009). Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, *45*(1), 31–48. doi:10.1590/S1676-24442009000100007
- Pardi, G., & Cardozo, E. I. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 1–15.
- Pathak, A. K., Sharma, S., & Shrivastva, P. (2012). Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate, *20*(1), 70–75.
- Pereira, A. P. V. (2010). *Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira, E.P.E.* (Tese de Mestrado)

- Pereira, C., Veiga, N., Amaral, O., & Pereira, J. (2013). Comportamentos de saúde oral em adolescentes portugueses. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 31(2), 158–165. doi:10.1016/j.rpsp.2013.03.002
- Pereira-Cenci, T., Del Bel Cury, A. A., Crielaard, W., & Ten Cate, J. M. (2008). Development of Candida-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, 16(2), 86–94. doi:10.1590/S1678-77572008000200002
- Pfaller, M. a., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133–163. doi:10.1128/CMR.00029-06
- Pinto, D., Heleno, B., Gallego, R., Santos, I., Santiago, L. M., & Maria, V. (2011). Norma terapêutica da diabetes mellitus tipo 2: Metformina - uma perspectiva crítica. *Acta Medica Portuguesa*, 24(2), 331–338.
- Premkumar, J., Ramani, P., Chandrasekar, T., Natesan, A., & Premkumar, P. (2014). Detection of species diversity in oral candida colonization and anti-fungal susceptibility among non-oral habit adult diabetic patients. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 5(1), 148–154. doi:10.4103/0976-9668.127315
- Raju, S. B., & Rajappa, S. (2011). Isolation and Identification of Candida from the Oral Cavity. *ISRN Dentistry*, 1–7. doi:10.5402/2011/487921
- Ribeiro, P. M., Koga Ito, C. Y., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2009). Isolamento de Candida spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar Candida. *Braz Dent Sci*, 12(4).
- Rodrigues, C. M. N. B. (2008). *COMPORTAMENTOS, HÁBITOS E CONHECIMENTOS DE SAÚDE ORAL DAS CRIANÇAS: Percepção dos Pais/Encarregados de Educação*. (Tese de Mestrado)
- Rörig, K. C. O., Colacite, J., & Abegg, M. A. (2009). Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero Candida. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), 225–227. doi:10.1590/S0037-86822009000200029
- Rüchel, Tegeler, R., & Trost, M. (1982). A comparison of secretory proteinases from different strains of Candida albicans. *Sabouraudia*, 20(3), 233–44.
- Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., Busciolano, M., Milillo, L., ... Serpico, R. (2011). Candida-associated denture stomatitis. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 16(2), 39–43. doi:10.4317/medoral.16.e139
- Sánchez-Vargas, L. O., Estrada-Barraza, D., Pozos-Guillen, A. J., & Rivas-Caceres, R. (2013). Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species. *Archives of Oral Biology*, 58(10), 1318–1326. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.06.006

- Sanitá, P. V., Zago, C. E., de Oliveira Mima, E. G., Pavarina, A. C., Jorge, J. H., Machado, A. L., & Vergani, C. E. (2014). In vitro evaluation of the enzymatic activity profile of non-albicans *Candida* spp. isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *118*(1), 84–91. doi:10.1016/j.oooo.2014.03.020
- Santos, M. S. dos, Freitas, M. N., & Pinto, F. de O. (2014). O DIABETES MELLITUS TIPO 1 E TIPO 2 E SUA EVOLUÇÃO NO MUNICÍPIO DE QUISSAMÃ-RJ. *Revista Científica Interdisciplinar*, *1*(1), 2254–2264.
- Saúde, D.-G. Da. (2012). Portal da Saúde. *Direção-Geral Da Saúde*. Disponível em <http://www.portaldasauade.pt/portal/conteudos/enciclopedia+da+saude/ministeriosaude/doencas/doencas+do+aparelho+circulatorio/avc.htm?WBCMODE=Presentatio nUngh:~pn>
- Seabra, C. L. (2011). *Estudo de factores de virulência de culturas mistas de Candida albicans e Candida parapsilosis após adesão a uma superfície abiótica*. (Tese de Mestrado)
- Shenoy, M. P., Puranik, R. S., Vanaki, S. S., Puranik, S. R., Shetty, P., & Shenoy, R. (2014). A comparative study of oral candidal species carriage in patients with type1 and type2 diabetes mellitus. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*, *18*(Suppl 1), S60–S65. doi:10.4103/0973-029X.141361
- Silva, J. O., Ferreira, J. C., & Candido, R. C. (2007). Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *40*(3), 354–355.
- Spolidorio, D. M. P., Boriollo, M. F. G., Estrela, C., & Spolidorio, L. C. (2009). Diferentes métodos fenotípicos para isolamento e identificação de espécies de *Candida*, *18*(45).
- Suárez, B. L., Inés, Á. M., Matilde, de B., & Andrés, C. (2013). *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia, *44*(1), 26–30.
- Sumita, N. M., & Andriolo, A. (2008). Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. *Jornal Brasileiro de Patologia E Medicina Laboratorial*, *44*(3), 169–174. doi:10.1590/S1676-24442008000300003
- Talabani, A. N., Kim, C. L., Ong, A., Kiat, H., & Ismail, A. R. (2013). The prevalence of *Candida* spp . in the saliva of controlled and uncontrolled diabetes mellitus type II patients. *J Bagh College Dentistry*, *25*(4).
- Volpato, F. C., Pires, J. R., Martinez, I. do R. da C., Orrico, S. R. P., Costa, marciano P. da;, Spolidório, D. M. P., & Gonçalves, A. (2013). Prevalence of *Candida* spp . during radiographic examination in Diabetes mellitus patients. *Revista de*

- Odontologia Da UNESP*, 42(1), 13–19.
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 137–43. doi:10.1016/j.phrs.2012.11.006
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3(30), 1–11. doi:10.3402/jom.v3i0.5771
- Yamashita, K., Ohara, M., Kojima, T., Nishimura, R., Ogawa, T., Hino, T., ... Sugiyama, M. (2013). Prevalence of drug-resistant opportunistic microorganisms in oral cavity after treatment for oral cancer. *Journal of Oral Science*, 55(2), 145–155. doi:10.2334/josnusd.55.145
- Zarco, M. F., Vess, T. J., & Ginsburg, G. S. (2012). The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Diseases*, 18(2), 109–120. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x

Anexos

Anexos I



TEXTO INFORMATIVO PARA O DOENTE

A estudante Vânia Sofia Saraiva Neves, aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, está a desenvolver um estudo de investigação no âmbito da Tese de Mestrado do MCF, sob a orientação da Doutora Maria Guilhermina Martins Moutinho e da Mestre Teresa Nascimento, cujo título é “Estudo da flora fúngica oral em indivíduos diabéticos não portadores de prótese”.

O presente estudo visa investigar a presença e prevalência de *Candida* spp; estudar genotipicamente os factores de virulência associados às espécies de *Candida* isoladas; avaliar a relação entre o biofilme leveduriforme oral e o desenvolvimento de estomatite protética; desenvolver um protocolo de higienização e seguidamente avaliar as alterações fenotípicas e genotípicas obtidas sobre a flora leveduriforme.

Para a realização do presente estudo, serão observados indivíduos diabéticos sem implantes e indivíduos saudáveis sem implantes. Será realizada, aos participantes, uma observação clínica intra-oral que terá por objectivo a avaliação das condições da cavidade oral.

Venho assim solicitar a vossa colaboração para o presente estudo.

Sem outro assunto, de momento,
Grata pela atenção disponibilizada,

Atentamente,

Vânia Sofia Saraiva Neves

Anexo II



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, 23 de Março de 2015

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito da Tese de Mestrado do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, sob a orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Maria Guilhermina Martins Moutinho e da Mestre Teresa Nascimento, solicita-se autorização para a participação no “Estudo da flora fúngica oral em indivíduos diabéticos não portadores de prótese” da população constituída por pacientes da Clínica Dentária Universitária Egas Moniz com o objetivo de investigar em indivíduos diabéticos e em indivíduos saudáveis, a presença e prevalência de *Candida* spp; Estudar genotipicamente os factores de virulência associados às espécies de *Candida* isoladas; Avaliar a relação entre o biofilme leveduriforme oral e o desenvolvimento de estomatite protética; Desenvolver um protocolo de higienização e seguidamente avaliar as alterações fenotípicas e genotípicas obtidas sobre a flora leveduriforme.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, 23 de Março de 2015

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito da Tese de Mestrado do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, sob a orientação do(a) Professor(a) Doutor(a) Maria Guilhermina Martins Moutinho e da Mestre Teresa Nascimento, solicita-se autorização para a participação no “Estudo da flora fúngica oral em indivíduos diabéticos não portadores de prótese” da população constituída por pacientes do laboratório **Lumilabo** com o objetivo de investigar em indivíduos diabéticos e em indivíduos saudáveis, a presença e prevalência de *Candida* spp; Estudar genotipicamente os factores de virulência associados às espécies de *Candida* isoladas; Avaliar a relação entre o biofilme leveduriforme oral e o desenvolvimento de estomatite protética; Desenvolver um protocolo de higienização e seguidamente avaliar as alterações fenotípicas e genotípicas obtidas sobre a flora leveduriforme.

A participação neste estudo é voluntária. A sua não participação não lhe trará qualquer prejuízo.

A informação recolhida destina-se unicamente a tratamento estatístico e/ou publicação e será tratada pelo(s) orientador(es) e/ou pelos seus mandatados. A sua recolha é anónima e confidencial.

(Riscar o que não interessa)

ACEITO/NÃO ACEITO participar neste estudo, confirmando que fui esclarecido sobre as condições do mesmo e que não tenho dúvidas.

(Assinatura do participante ou, no caso de menores, do pai/mãe ou tutor legal)

Anexo III



Colheita n.º : _____
Data da Colheita: ___ / ___ / ___
Local: _____

QUESTIONÁRIO

"Estudo da flora fúngica em indivíduos diabéticos não portadores de prótese"

Idade: _____ SEXO: M F Nacionalidade: _____

Tem dentes para tratar? Sim Não Quantos? _____

Usa próteses removíveis ou fixas? Sim Não

Diagnóstico Protético:

Classe I: Classe II: Classe III: Classe IV: Total:

Tipo De Prótese/Data De Colocação: ___/___/___

ACRÍLICA: CRCO: TOTAL:

Adaptação Da Prótese: Sim: Não:

Sinais Clínicos De Lesões Mucosas:

Rubor: Sangramento: Eritema: Epulides: Escaras:

Patologias Associadas

Diabetes Sim: Não: Tipo: _____

Insulino-Dependente: Sim Não

Anti-Diabéticos Oraais: Sim Não Se sim, Qual: _____

Xerostomia: Doença Auto Imune: Queilite:

Tabaco : Sim Não , Quantos Por Dia: _____

Álcool: Sim Não

Terapêutica (Cortico/Anticoliné/Antidepre/Antibio):

_____ Final: _____

Higiene Escovagem N° Vezes Dia: _____ Fio Dentário:

Elixir: Outros Meios: Refere Sangramento:

Rubrica Do Clínico: _____

Anexo IV

*“Estudo da flora fúngica oral em indivíduos diabéticos **não portadores**
de prótese”*

PROTOCOLO DE COLHEITA

1. Preparação do doente

Não deve estar sujeito a terapêutica antibiótica e antimicótica nas 3 semanas precedentes.

2. Execução da colheita

2.1. Indivíduos protésicos:

Mucosa associada ao implante: Rolar uma zaragatoa no rebordo do implante.

2.2. Indivíduos não protésicos:

Mucosa oral: Rolar uma zaragatoa na face interna da bochecha.

Identificar, datar e colocar a zaragatoa no meio de transporte (meio de Amies).

A amostra deverá ser processada nas 48h seguintes.

Rubrica do Clínico: _____

Anexo V



4

Ex.ma Senhora
Vânia Sofia Saraiva Neves

Monte de Caparica, 1 de dezembro de 2014

Ex.ma Senhora,

Venho comunicar-lhe que o Pedido de Parecer que submeteu à apreciação da Comissão de Ética da Egas Moniz, com o tema denominado "Estudo da flora fúngica oral em indivíduos diabéticos não portadores de prótese", foi aprovado por unanimidade.

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz

Profª. Doutora Maria Fernanda de Mesquita