



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

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CANDIDA E BIOFILMES ORAIS: IMPACTO E TERAPÊUTICA

Trabalho submetido por
Soraia Pimenta de Jesus
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

novembro de 2016



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

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CANDIDA E BIOFILMES ORAIS: IMPACTO E TERAPÊUTICA

Trabalho submetido por
Soraia Pimenta de Jesus
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Mestre Teresa Nascimento

novembro de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, a TI.

A ti, que te roubaram de mim para seres, finalmente e eternamente, feliz.

A ti, que sempre me deste força para ultrapassar todos os obstáculos.

A ti, que sempre acreditaste em mim.

A ti, que estarás deveras orgulhosa deste meu feito.

A ti, a quem devo parte do que sou hoje e do que consegui alcançar.

A ti, que me obrigaste a aprender a viver sem ti.

A ti, Madrinha.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”

Antoine de Sant-Exupéry

AGRADECIMENTOS

Obrigada, antes de mais, à Mestre Teresa Nascimento. Por ter sido incansável e sempre disponível.

Obrigada, ao meu avô. Por me ensinar que as coisas nem sempre correm bem, que não é preciso chorar desesperadamente, porque amanhã é um novo dia e afinal, o que importa, é ter saúde!

Obrigada, aos meus pais! Que se esforçaram durante estes anos e abdicaram de realizar os seus sonhos, para realizarem o meu...Sem eles, nada disto seria possível. Ao meu pai, por ter acreditado sempre que este dia chegar, e que eu ia conseguir. À minha mãe por ser, eternamente, o melhor colo.

Obrigada, à Sara. Por ter sido, a melhor colega desde o primeiro dia da faculdade, mas também a melhor amiga. Obrigada por todas as discussões sobre trabalhos, por todas as horas de desespero, em que achávamos que não íamos conseguir, mas por acreditar sempre, como eu, que se tivéssemos juntas...ia correr bem. E correu. Juntas começámos, juntas acabámos, juntas continuaremos e, um dia, juntas, ainda vamos ter um castelo!

Obrigada, ao Tiago. Por todo o amor, companheirismo, carinho, dedicação e amizade. Por nunca me deixar baixar os braços, por me fazer acreditar que nada é impossível, por me dar força, por me acalmar em todas as horas, por aturar o meu mau feitio e pela incrível paciência de santo!

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão”.

Jean de la Bruyere

RESUMO

O microbioma humano é bastante complexo e diversificado sendo que a cada zona anatômica corresponde um habitat específico, constituído por uma diversidade de microrganismos. O microbioma oral é maioritariamente constituído por espécies bacterianas, porém os fungos também fazem parte da sua constituição. Estes microrganismos organizam-se preferencialmente na forma de biofilmes, conseguem viver em comunidade e, em conjunto com fatores intrínsecos ao ambiente oral, promovem a sua homeostasia, contribuindo assim para a manutenção de um estado saudável.

O género *Candida* coloniza a cavidade oral da maioria da população, contudo, em indivíduos com o sistema imunitário comprometido consegue expressar a sua patogenicidade, devido ao seu carácter oportunista. Para tal, são relevantes os fatores de virulência que possui, tais como: adesão, dimorfismo, produção de enzimas hidrolíticas, variabilidade fenotípica e formação do biofilme.

Tem sido atribuída especial atenção à capacidade da levedura em formar um biofilme, uma vez que *Candida* forma um biofilme heterogéneo, resistente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como aos fármacos antifúngicos, e é responsável por várias infeções orais e sistémicas. A candidose oral é a infeção fúngica mais frequente resultante do biofilme de *Candida* na cavidade oral. Porém, o impacto do biofilme oral revela-se também em infeções orais como a cárie, periodontite, endodontite, podendo ainda estar associado ao carcinoma oral.

Com o aumento de hospedeiros com fatores predisponentes, as resistências às terapêuticas antifúngicas convencionais têm aumentado, como tal torna-se imprescindível tentar solucionar esta problemática, recorrendo a terapêuticas alternativas como são exemplo os probióticos, produtos naturais e a terapêutica fotodinâmica.

Palavras-chave: microbioma oral, *Candida*, biofilme oral, infeções orais, terapêutica antifúngica, terapêuticas alternativas.

ABSTRACT

The human microbiome is rather complex and diverse, being that each body region corresponds to a specific habitat, formed by a multitude of microorganisms. The oral microbiome is mostly constituted of bacterial species; however fungi are also part of their constitution. These microorganisms organize themselves in the form of biofilms, can live in community, and set with intrinsic factors to the oral environment, promote their homeostasis, contributing to the maintenance of a healthy state.

Candida colonizes the oral cavity of the majority population, however, in individuals with compromised immune system can express its pathogenicity, because of their opportunistic character. For this, it possesses virulent relevant factors, such as: adhesion, dimorphism, hydrolytic enzymes production, phenotypic variability and biofilm formation.

It has been assigned special attention to the yeast capacity in form biofilm, once *Candida* forms one heterogeneous biofilm, resistant to the host defense mechanisms, as well as to antifungal drugs, and is responsible for several oral and systemic infections. Oral candidiasis is the most frequent fungal infection, resulting from *Candida* biofilms in the oral cavity. However, the biofilm impact also reveals itself in forms of oral infections, such as caries, periodontitis, endodontic infection, and also associated with oral carcinoma.

The increase of hosts with predisposing factors, resistance to antifungal conventional therapies have also increased, therefore it is indispensable to solve this problematic, using alternative therapies, as for example probiotics, natural products and photodynamic therapy.

Keywords: oral microbiome, *Candida*, oral biofilm, oral infections, antifungal therapie, alternative therapies

ÍNDICE GERAL

Resumo	1
Abstract	2
Índice geral	3
Índice de figuras	5
Índice de tabelas	6
Lista de abreviaturas	7
1 Introdução	9
2 Microbioma humano oral	13
2.1 Desenvolvimento da microflora residente	13
2.2 Diversidade de espécies	14
2.3 Importância do Microbioma Oral	16
3 Género <i>Candida</i>	19
3.1 Taxonomia e Biologia.....	19
3.2 Epidemiologia	21
3.3 Fatores de virulência	23
3.3.1 Adesão	24
3.3.2 Dimorfismo.....	25
3.3.3 Produção de enzimas	26
3.3.4 Variabilidade fenotípica	28
3.3.5 Biofilme	28
4 Biofilme Oral	29
4.1 Formação do biofilme	29
4.1.1 Morfologia e arquitetura	30
4.1.2 Regulação do biofilme: fenómeno <i>Quórum Sensing</i>	32
4.2 Fatores do hospedeiro que afetam a formação do biofilme	33

4.3	Impacto do Biofilme Oral	34
4.3.1	Candidose Oral	34
4.3.2	Cárie	36
4.3.3	Periodontite.....	37
4.3.4	Endodontite.....	38
4.3.5	Estomatite	38
4.3.6	Infeção Orofaríngea e Respiratória.....	39
4.3.7	Carcinoma Oral.....	40
4.4	Mecanismos de defesa do hospedeiro.....	41
5	Terapêutica	43
5.1	Terapêutica Antifúngica	43
5.1.1	Terapêutica na Candidose oral	44
5.1.2	Mecanismos de resistência	47
5.2	Terapêuticas Alternativas	51
5.2.1	Probióticos.....	51
5.2.2	Produtos Naturais	51
5.2.3	Terapêutica Fotodinâmica	54
6	Conclusão	57
7	Bibliografia.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Processo de aquisição da microflora residente	13
Figura 2 Distribuição de microrganismos na cavidade oral segundo HOMD.....	15
Figura 3 Morfologias de <i>C. albicans</i>	20
Figura 4 Estrutura celular de <i>C. albicans</i>	21
Figura 5 Distribuição de espécies <i>albicans</i> e não- <i>albicans</i> de acordo com diferentes locais.....	22
Figura 6 Distribuição de espécies não- <i>albicans</i> de acordo com diferentes locais.	22
Figura 7 Fatores de virulência do género <i>Candida</i>	23
Figura 8 Formação do biofilme por <i>C. albicans</i>	30
Figura 9 Influência de moléculas QS na morfologia de <i>Candida</i>	33
Figura 10 Lesões de candidose oral.	36
Figura 11 Biofilme misto por <i>S. aureus</i> e <i>C. albicans</i>	38
Figura 12 Formação de biofilmes mistos por <i>C. albicans</i> , <i>Streptococcus gordinii</i> e <i>Streptococcus oralis</i>	39
Figura 13 Alvos terapêuticos de agentes antifúngicos.	43
Figura 14 Mecanismos de resistência do biofilme formado por <i>C. albicans</i>	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Classificação do género <i>Candida</i>	19
Tabela 2 Morfologia de espécies potencialmente patogénicas do género <i>Candida</i>	26
Tabela 3 Características do biofilme de <i>Candida</i>	31
Tabela 4 Fatores de predisposição do hospedeiro no desenvolvimento do biofilme oral por <i>Candida</i>	34
Tabela 5 Fármacos antifúngicos e respetivas características.....	45
Tabela 6 Ação de produtos naturais sobre diferentes fases do desenvolvimento do biofilme por <i>Candida</i>	52

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC** – *ATP-binding cassette*
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- ALS**- *agglutinin-like sequence*
- APCs** - Células apresentadores de antígenios (*Antigen-presenting cells*)
- ARN** – Ácido ribonucleico
- CMI** – Concentração mínima inibitória
- CLRs**- Recetores de lectina tipo C
- CO**- Candidose Oral
- DPOC** – Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica
- EUCAST** - Comissão Europeia sobre Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (*European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)
- ECM** – Matrix extracelular (*Extracellular matrix*)
- FDA** – *Food and Drug Administration*
- FS** – Fotossensibilizador
- GPI** – Glicosilfosfatidilinositol
- HMP** – Projeto do microbioma humano (*Human Microbiome Project*)
- HOMD** - *Human Oral Microbiome Database*
- Hw1p**- *hyphal wall protein*
- MFS** – *Major Facilitator Superfamily*
- NLR**- Recetores do tipo nucleótido
- NOD**- Domínio de oligomerização de nucleótido
- NT**- *Natural Killer*
- PA** – Película adquirida
- PAMPs** – Padrões moleculares associados a antígenios (*Pathogen Associated Molecular Patterns*)
- PRRs** – Recetores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors*)
- QS** – *Quorum Sensing*
- Saps** - aspartil proteinase secretórias (*Secreted aspartyl proteinase*)
- TFD** – Terapêutica Fotodinâmica
- TRLs** – Recetores *Toll-Like*
- VIH/SIDA** – Vírus da imunodeficiência Humana

1 INTRODUÇÃO

O termo microbioma foi criado por Joshua Lederberg, que definiu o microbioma como o conjunto de microrganismos comensais e patogénicos que vivem em comunidade com as células do hospedeiro. Assim, o nome atribuído ao conjunto de microrganismos integrados na cavidade oral tem-se alterado ao longo do tempo, podendo ser designado por microflora oral, microbiota oral ou, mais recentemente, microbioma oral (Dewhirst et al., 2010; Hanson & Weinstock, 2016).

Os microrganismos presentes no microbioma oral existem maioritariamente sob a forma de biofilmes, formando um ecossistema complexo e equilibrado. De facto, ao longo dos últimos anos, tem sido descrito que o biofilme é considerado a principal forma de crescimento dos microrganismos, tendo em conta que a cavidade oral proporciona o ambiente ideal para o seu desenvolvimento (Fanning & Mitchell, 2012; Gulati & Nobile, 2016; Scannapieco, 2013; S. Singh, Sharma, & Shreehari, 2015; Zarco, Vess, & Ginsburg, 2012).

O termo biofilme foi proposto, em 1978, por Costerton e colegas, contudo foi Antonie van Leuvenhoek, no início do século VII, que observou, pela primeira vez, a formação de um biofilme nos seus próprios dentes (S. Singh et al., 2015; Vasudevan, 2014).

Atualmente, o biofilme é definido como o conjunto de microrganismos sésseis, organizados tridimensionalmente e incorporados numa matriz extracelular polimérica. Os biofilmes podem formar-se em qualquer superfície sólida, como é o caso do biofilme por *Candida*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, ou numa interface, como são exemplo os formados por *Bacillus* e *Mycobacterium*. As superfícies podem distinguir-se em abióticas ou bióticas, sendo que os ambientes aquáticos, plantas e tecidos mamíferos representam as superfícies bióticas, e os dispositivos protéticos, cateteres e biomateriais, representam as superfícies abióticas. Para além disto, um biofilme pode conter simultaneamente na sua constituição: bactérias, vírus, fungos e protozoários (Gulati & Nobile, 2016; Nobile & Johnson, 2015; Reddy, 2011; D. W. Williams, Kuriyama, Silva, Malic, & Lewis, 2011).

O microbioma humano é maioritariamente constituído por 10^{14} células bacterianas, número significativo e que excede em 10 vezes o número de células humanas, cerca de 10^{13} . Na cavidade oral, para além das bactérias, também fazem parte da microflora

residente outros microrganismos tais como: vírus, protozoários e fungos (Hanson & Weinstock, 2016; Scannapieco, 2013; P. C. Silva, 2014; Wade, 2013; Zarco et al., 2012).

Relativamente aos fungos o género *Candida* é o mais relevante. *Candida* sp. são comensais da cavidade oral mas na presença de desequilíbrios do ecossistema oral, podem provocar infeções orais e, eventualmente, sistémicas. Assim, a capacidade de alternar entre o comensalismo e a patogenicidade deve-se à expressão de fatores de virulência, bem como a alterações no sistema imunitário do hospedeiro, sendo por isso considerados microrganismos oportunistas (Bujdáková, 2016; Geraldino et al., 2012; Zarco et al., 2012).

Nas últimas décadas, as infeções fúngicas têm aumentado de forma significativa sendo maioritariamente provocadas por *Candida*, nomeadamente, *Candida albicans* (*C. albicans*) (Richardson & Moyes, 2015).

A patogenicidade associada a esta levedura foi descoberta em 1839, por Langenbeck, através da observação e isolamento desta, a partir da cavidade oral de indivíduos com candidose oral (CO). Hoje em dia, *C. albicans* é considerada o fungo patogénico oportunista com maior relevância clínica para o Homem. Não obstante, as espécies não-*albicans* como são exemplo: *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), *Candida krusei* (*C. krusei*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*) e *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*), têm sido igualmente descritas como espécies potencialmente patogénicas (Bujdáková, 2016; Giolo & Svidzinski, 2010; Whibley & Gaffen, 2015).

A formação de biofilmes por *Candida* é considerada um dos seus atributos de virulência e, através de tecnologias avançadas, concluiu-se que *Candida* forma biofilmes heterógenos. Estudos recentes afirmam que 80% das infeções microbianas têm origem em biofilmes patogénicos, considerando que *C. albicans* é o microrganismo mais isolado de biofilmes mistos, constituídos por bactérias e fungos (Gulati & Nobile, 2016; Harriott & Noverr, 2011; Mukherjee & Chandra, 2015; O'Donnell et al., 2015; Sardi, Scorzoni, Bernardi, Fusco-Almeida, & Giannini, 2013).

Os biofilmes orais desempenham um papel crucial em diversas patologias orais, sendo a candidose, a cárie, a endodontite, e a periodontite infeções frequentes (Flemmig & Beikler, 2011; O'Donnell et al., 2015).

Posto isto, as infeções que resultam da formação de biofilmes orais por *Candida* constituem um desafio clínico, devido à resistência manifestada face à terapêutica convencional antifúngica, bem como aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim a

erradicação do biofilme é difícil de alcançar e, como tal, são indispensáveis novas abordagens terapêuticas (Gulati & Nobile, 2016; Harriott & Noverr, 2011; Nett, 2014).

O principal objetivo desta monografia é entender de que forma *Candida*, principalmente *C. albicans*, por ser a espécie mais prevalente e patogénica, consegue formar um biofilme na cavidade oral, e qual o seu impacto clínico. Por fim, compreender quais as terapêuticas disponíveis na erradicação do mesmo bem como, possíveis terapêuticas alternativas.

2 MICROBIOMA HUMANO ORAL

2.1 Desenvolvimento da microflora residente

O processo de formação da microflora oral residente surge durante e após o parto, no entanto, sofre variações ao longo do tempo de acordo com fatores como idade, habitat e nutrição do indivíduo (P. C. Silva, 2014).

Inicialmente a cavidade oral do feto é estéril, sendo constituída apenas por tecido mole e secreções salivares. Contudo, através do contacto com a microflora do útero e da vagina, no caso de ser um parto normal, ou através da microflora da pele, caso o parto seja por cesariana (sucessão alogénica), os microrganismos são adquiridos por transmissão vertical. O meio ambiente constitui igualmente um modo de transmissão de microrganismos (sucessão autogénica) (B. P. Krom, Kidwai, & Cate, 2014; P. Marsh & Martin, 2005b; Parfrey & Knight, 2012; P. C. Silva, 2014).

Os primeiros microrganismos a colonizarem a boca são as espécies pioneiras, que sofrem processos de sucessão alogénica e autogénica, até atingirem uma comunidade clímax, ou seja até alcançarem o equilíbrio do microbioma. Assim, a figura 1 esquematiza o processo de formação da microflora oral residente (P. Marsh & Martin, 2005b; Ureña, Rodríguez, Cabanillas, & Alonso, 2002).



Figura 1 Processo de aquisição da microflora residente. (Adaptado de, P. Marsh & Martin, 2005b).

Não obstante, a erupção dos dentes é considerada um marco importante na sua formação, pois é a partir daqui que surge a colonização de tecidos duros, ou seja, o início da formação do biofilme oral (sucessão autogénica), resultando assim num aumento da

diversidade da microflora oral (Parfrey & Knight, 2012; Urenã, García, & López-Dóriga, 2002).

A cavidade oral é um sistema complexo e do qual fazem parte diversas estruturas, sendo formada por dentes, sulco gengival, gengiva, língua, bochecha, lábio, palato duro e mole, e pelos respectivos anexos como o esôfago, amígdalas, faringe, ouvido médio, traqueia, pulmões e seios nasais. Por outro lado, segundo alguns autores, como Pavel Godoroja e Olga Dulghieru, o biofilme oral é classificado de acordo com as estruturas da cavidade da oral onde se desenvolve, isto é, biofilme supragengival quando se forma no esmalte, ou subgengival quando se forma na linha abaixo da gengiva e no interior do sulco ou da bolsa periodontal (Dewhirst et al., 2010; Ion & Chetruș, 2013; Kolenbrander, Palmer, Periasamy, & Jakubovics, 2010).

2.2 Diversidade de espécies

Atualmente existe um projeto, criado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, projeto do microbioma humano (HMP), que tem como objetivo caracterizar a abundância, diversidade e funcionalidade dos genes de microrganismos residentes no corpo humano. Os microrganismos distribuem-se por várias partes do corpo, nomeadamente pela pele, nariz, boca, trato geniturinário e intestinal, assim a cada região anatômica corresponde um habitat, com um microbioma característico e de variação interindividual (Belizário & Napolitano, 2015; Parfrey & Knight, 2012; P. C. Silva, 2014).

O maior banco de dados de microrganismos na cavidade oral é o *Human Oral Microbiome Database* (HOMD), que possui sequências de ácido ribonucleico (ARN) ribossomal 16S dos genes dos diferentes microrganismos, permitindo um estudo aprofundado do impacto destes tanto na saúde como na doença oral (figura 2) (Costalonga & Herzberg, 2014; Dewhirst et al., 2010).

A flora residente do sulco gengival é constituída principalmente por microrganismos anaeróbios, em grande parte por *Peptostreptococcus*. Por sua vez, a língua possui maioritariamente espécies do grupo *Streptococcus viridans* mas também outros géneros como *Staphylococcus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Bacterioides*, *Actinomyces*, *Treponema*, e *Candida*. Já a superfície do dente é maioritariamente constituída por *Streptococcus* sp. e *Veillonella* sp. (Costalonga & Herzberg, 2014; P. C. Silva, 2014).

Por outro lado, os lábios são constituídos, em grande parte, por um grupo de microrganismos característicos do microbioma cutâneo, *Staphylococcus epidermidis* (Ureña, Rodríguez, et al., 2002).

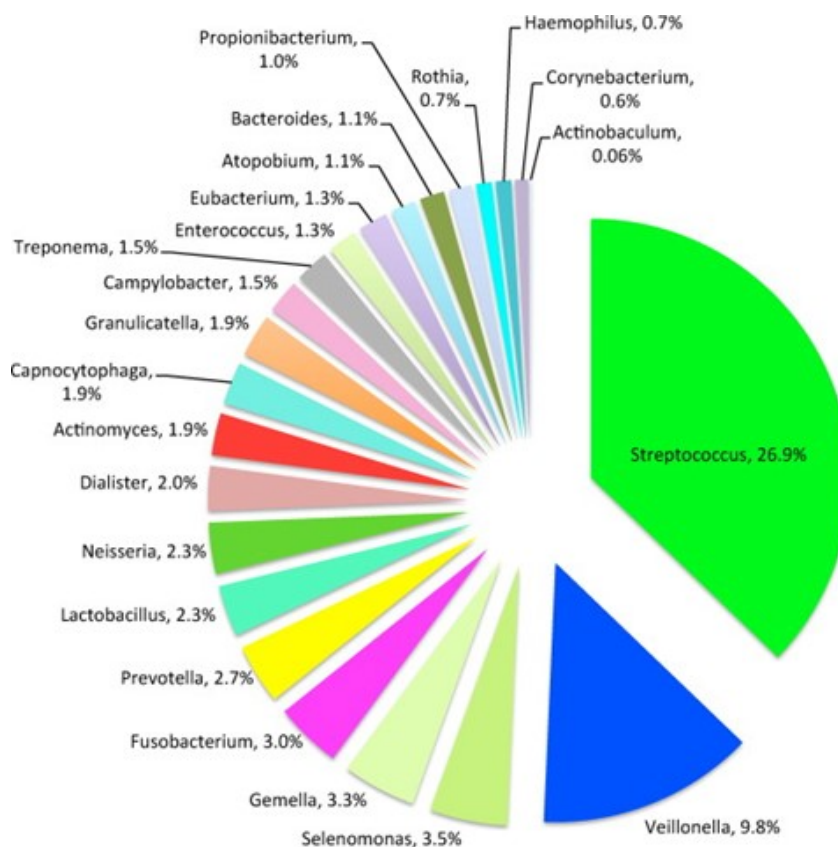


Figura 2 Distribuição de microrganismos na cavidade oral segundo HOMD. (Adaptado de, Costalonga & Herzberg, 2014).

Apesar da figura 2 ilustrar apenas uma população bacteriana, os fungos, ainda que representem uma população menor, também estão inseridos na constituição da microflora oral. Assim, num estudo realizado em indivíduos saudáveis, os géneros predominantes foram: *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus* e *Saccharomycetales* (P. D. Marsh, Moter, & Devine, 2011; Wade, 2013).

A grande maioria dos estudos foca a sua atenção nas bactérias, como microrganismos que equilibram ou desequilibram o ambiente oral, contudo, relativamente aos fungos, apenas existe uma abordagem sobre a sua ação peyorativa sobre o hospedeiro. Como tal, e com o intuito de compreender melhor a ecologia oral, na saúde e na doença, deveriam

existir mais estudos sobre todas as espécies incluídas neste microbioma. Um estudo, realizado por Ghannoum e colegas, veio impulsionar este facto, afirmando que existem cerca de 100 espécies de fungos na cavidade oral de indivíduos saudáveis, como tal é imprescindível entender o seu impacto neste sentido (B. P. Krom et al., 2014).

2.3 Importância do Microbioma Oral

Os microrganismos integrados na cavidade oral são capazes de viver concomitantemente e de forma harmoniosa com o hospedeiro, estabelecendo relações de benefício mútuo e impedindo patógenos exógenos de colonizarem a cavidade oral. Contudo, esta relação aparentemente estável pode ser desequilibrada, provocando patologias orais mas também sistémicas, dada a capacidade, dos microrganismos aqui presentes, dispersarem deste meio e atingirem a corrente sanguínea. Este facto é apoiado por estudos, em que microrganismos orais foram isolados de doentes com patologias sistémicas. Em suma, a microbiota oral comensal possui características que lhe confere funções de proteção, porém na presença de diversas alterações pode tornar-se patogénica (Avila, Ojcius, & Yilmaz, 2009; P. Marsh & Martin, 2005a; Wade, 2013).

A carência de práticas regulares de higienização, alterações no sistema imunitário, idade avançada e a genética do indivíduo, são fatores que podem destabilizar o equilíbrio do microbioma (Filoche, Wong, & Sissons, 2010).

De facto, a boca é considerado um local anatómico dinâmico devido ao contacto permanente com o meio exterior e, como tal, possui fatores que regulam a composição, o desenvolvimento, a quantidade, a coexistência e a distribuição dos microrganismos em cada habitat oral. Dentro destes fatores destacam-se: os fatores físico-químicos, como a humidade, pH, temperatura e potencial de oxirredução; fatores de adesão e co-agregação; fatores nutricionais, no qual se destaca a saliva, e fatores intrínsecos ao hospedeiro (Avila et al., 2009; Ureña, Mondelo, Cubillos, & Estévez, 2002; Zarco et al., 2012).

Por outro lado, as características intrínsecas às superfícies orais, duras e moles, como a hidrofobicidade, rugosidade e as proteínas adsorvidas, promovem tanto o crescimento como a formação de biofilmes orais por *Candida*. Para além disto, o ambiente húmido e quente, bem como a existência de nutrientes como glucose, facilitam a colonização de microrganismos, como é exemplo *Candida* (Seabra, 2011).

As interações físicas e químicas entre microrganismos, como fungos e bactérias, são mecanismos bastante complexos, e desempenham um papel relevante na manutenção da saúde oral mas também no estado de doença, assim os microrganismos podem exercer uma influência positiva ou negativa uns sobre os outros (B. P. Krom et al., 2014).

3 GÊNERO *CANDIDA*

3.1 Taxonomia e Biologia

Os métodos moleculares, nomeadamente, o estudo da sequência de genes que codifica tanto para o ARN ribossômico 18S como para os domínios D1 e D2 do ARN ribossômico 26S, permitiram alcançar uma classificação para os fungos. Assim estes microrganismos pertencem ao reino *Fungi*, no qual se incluem filós com relevância clínica tais como: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota*. Não obstante, é neste último que se encontram os fungos considerados mais patogénicos para o ser Humano, tais como: *Aspergillus*, *Candida* e *Pneumocystis*. O género *Candida* é classificado de acordo com a tabela 1 (Bruckner & Deak, 2014; Gonçalves, 2014).

Tabela 1 Classificação do género *Candida*. (Adaptado de, López-Martínez, 2010).

Reino	Fungi
Divisão	Eumycota
Subdivisão	Deuteromycotina
Filo	Ascomycetes
Classe	Blastomycetes
Ordem	Cryptococcales
Família	Cryptococcaceae
Género	<i>Candida</i>

Candida é um microrganismo eucariota, reproduz-se assexuadamente e sexuadamente, contudo a primeira constitui a forma de reprodução com maior relevância pois permite a dispersão do fungo. Assim, através da conidiogénese tálica forma clamidósporos, esporos de resistência, e através da conidiogénese blástica, forma de reprodução por gemulação, forma blastoconídios/blastósporos (Freitas, 2010).

O género *Candida* possui células de tamanho variável entre 3-5 μm e, durante o seu crescimento pode apresentar essencialmente duas morfologias, leveduriforme e filamentosa, com características individuais que as diferencia umas das outras. As células leveduriformes são unicelulares e possuem uma forma oval, por sua vez as células filamentosas/multicelulares, hifas e pseudo-hifas, apresentam-se em forma de elipse e com conexões nas suas extremidades (pseudo-hifas) ou uniformes em toda a sua largura, sem conexões, e com septos (hifas verdadeiras) (figura 3) (Freitas, 2010; Gonçalves, 2014; López-Martínez, 2010; Thompson, Carlisle, & Kadosh, 2011).

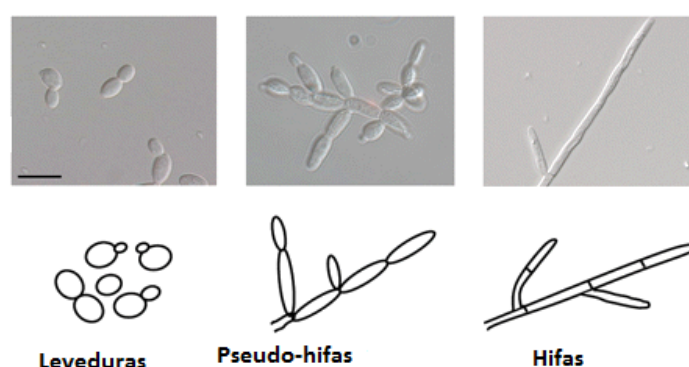


Figura 3 Morfologias de *C. albicans*. Imagens da levedura obtidas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). (Adaptado de, Thompson et al., 2011).

Estruturalmente a parede celular apresenta-se como uma estrutura rígida, constituída por quitina, mananos e glucanos que se distribuem em diferentes camadas, precisamente por cerca de 80%-90% de polissacáridos de glicose com ligações β -1,6 e β -1,3, por 6-25% de proteínas, moléculas de N-acetil-D-glicosamina ligadas à quitina por ligações β -1,4, e por polímeros de manose ligados de forma covalente às manoproteínas (figura 4). A parede constitui uma estrutura celular essencial na interação microrganismo-hospedeiro, pois apresenta compostos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de infeções fúngicas e, como tal, é também um dos alvos preferenciais da ação terapêutica dos antifúngicos (Emeterio, Lara, & Andrés, 2002; Gonçalves, 2014; Santana, Ribeiro, Menezes, & Naves, 2013).

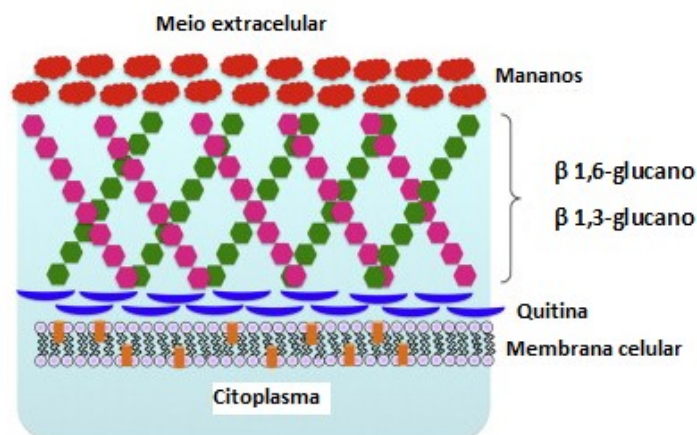


Figura 4 Estrutura celular de *C. albicans*. (Adaptado de, Kiyoura & Tamai, 2015).

3.2 Epidemiologia

A levedura do gênero *Candida* está presente na microflora oral de 45%-65% dos bebês e em 30%-55% dos adultos, sendo que atualmente sabe-se que a maioria da população possui este microrganismo na boca (Millsop & Fazel, 2016). Assim, de acordo com o estudo efetuado por Ng et al. (2015) em indivíduos saudáveis, figura 5, concluiu-se que a percentagem de *C. albicans* isolada da cavidade oral é maior que espécies não-*albicans*, sendo que, conforme a figura 6, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram as espécies mais frequentes comparativamente a *C. dubliniensis* e *C. rugosa*.

Apesar da diversidade de espécies ser semelhante entre indivíduos saudáveis e com patologias orais, estudos afirmam que esta é menor aquando de uma infecção. Assim, segundo estudos recentes, a espécie *C. albicans* é a mais prevalente em infecções orais, seguindo-se *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. kefyr* igualmente como espécies frequentes (B. P. Krom et al., 2014; López-Martínez, 2010; Millsop & Fazel, 2016).

Estudos realizados em doentes com CO evidenciam a prevalência de *C. albicans*, contudo *C. glabrata* e *C. tropicalis* também foram frequentemente isoladas nestes indivíduos. Por outro lado, em infecções como estomatite protética, têm-se observado a presença simultânea de *C. albicans* e *C. glabrata*, contudo, importa referir, que *C. glabrata* é frequentemente isolada nestas patologias, pois a população deste estudo é sobretudo idosa (Muadcheingka & Tantivitayakul, 2015).

Em doentes diabéticos e com periodontite e em indivíduos VIH/SIDA com CO, tem sido descrita a presença de *C. albicans* e associação desta com *C. dubliniensis* (Maddi & Scannapieco, 2013; Sardi et al., 2013).

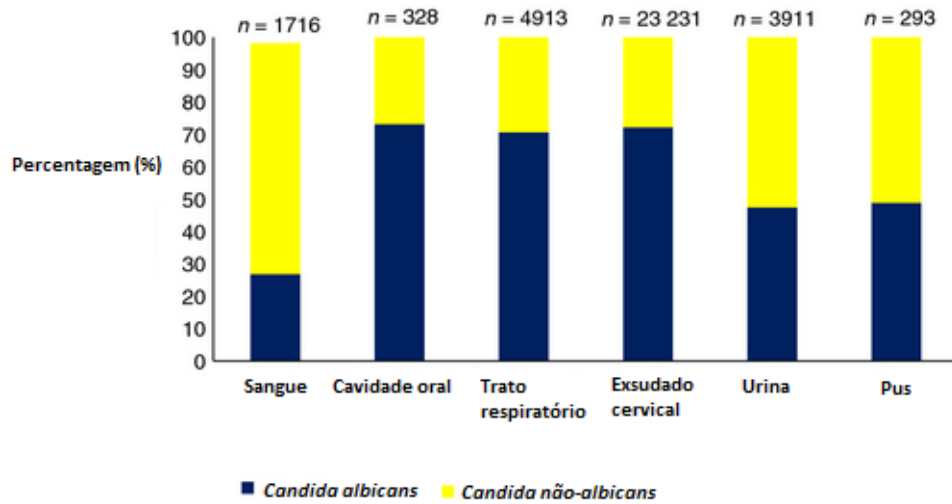


Figura 5 Distribuição de espécies *albicans* e não-*albicans* de acordo com diferentes locais. (Adaptado de, Ng et al., 2015).

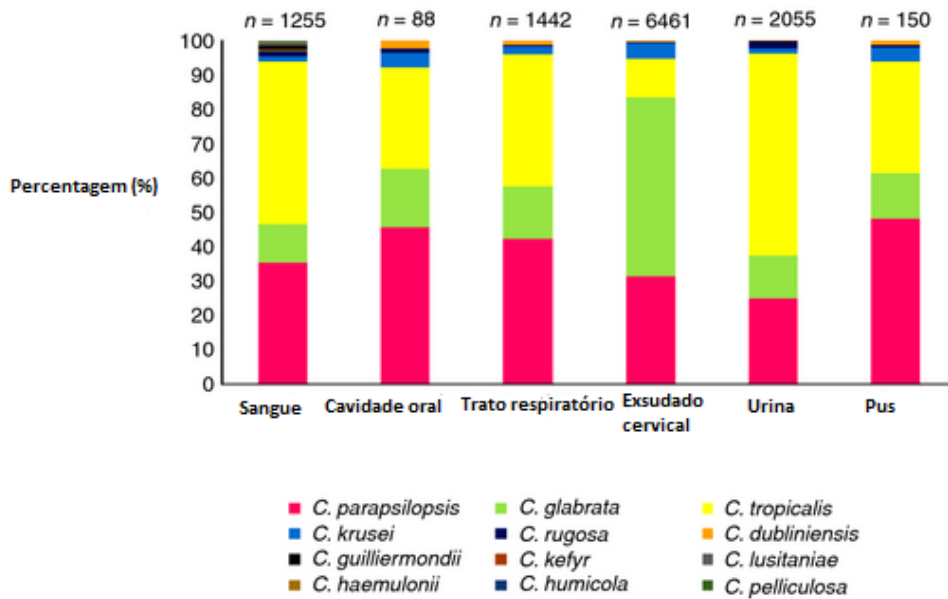


Figura 6 Distribuição de espécies não-*albicans* de acordo com diferentes locais. (Adaptado de, Ng et al., 2015).

No contexto de infecções sistêmicas, *C. albicans*, a nível Mundial, é a principal causa de candidose invasiva, contudo, a frequência de infecções por espécies não-*albicans*, nomeadamente, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, tem vindo a aumentar na América do Norte, e em alguns países Europeus como Portugal. Curiosamente, no Chile, esta tendência está invertida e são as espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* as mais prevalentes (Guinea, 2014; Mendes, 2012; Sardi et al., 2013).

3.3 Fatores de virulência

Candida para se tornar patogénica precisa de mecanismos estratégicos que lhe permita colonizar, sobreviver, multiplicar-se e invadir as células do hospedeiro. Para isto, expressa fatores de virulência, que através de vários processos supera os mecanismos de defesa do hospedeiro (Brunke, Mogavero, Kasper, & Hube, 2016; Santana et al., 2013).

Os principais fatores de virulência do género *Candida* são a adesão, dimorfismo, produção de enzimas, variabilidade fenotípica e a formação do biofilme (figura 7). *C. albicans* será a espécie sobre a qual incidirá a abordagem aos diferentes fatores (Mayer, Wilson, & Hube, 2013; Santana et al., 2013).

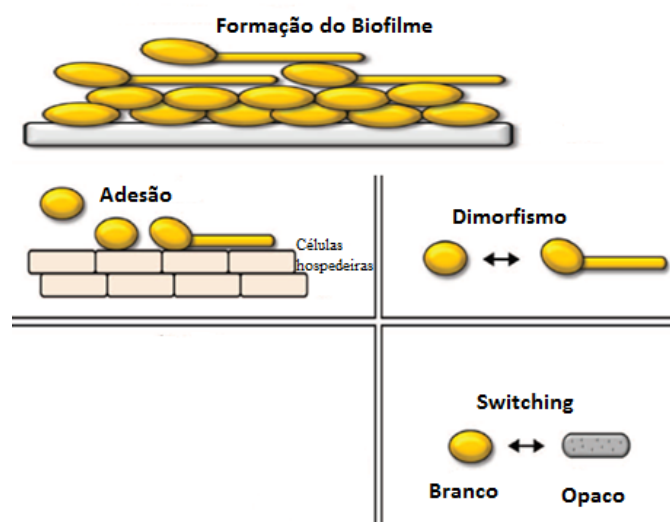


Figura 7 Fatores de virulência do género *Candida*. (Adaptado de, Mayer et al., 2013).

3.3.1 Adesão

O primeiro passo tanto para a colonização como para o estabelecimento de uma infecção, provocada pelo género *Candida*, é a adesão destes microrganismos às células epiteliais, endoteliais e fagocíticas do hospedeiro, bem como a microrganismos patogénicos e a dispositivos médicos. Desta forma, a adesão promove a sobrevivência da levedura no organismo humano, a formação de biofilmes e, conseqüentemente infeções polimicrobianas (Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik, & Kozik, 2009; Santana et al., 2013).

O processo de adesão envolve a existência de interações específicas, através de adesinas e de recetores da membrana citoplasmática, mas também de interações não específicas, como hidrofóbicas e electrostáticas da superfície celular. Estas adesinas são proteínas especializadas, existem na parede celular das células e conseguem fixar-se a diferentes superfícies que, por sua vez, possuem recetores que as reconhecem como são exemplo: fibrina, fibronectina e laminina (Geraldino et al., 2012; Santana et al., 2013; Sardi et al., 2013).

Existem fatores que favorecem o processo de adesão como a formação do tubo germinativo, carboidratos, pH, temperatura e a produção de fosfolipases e proteases. Para além disto, alguns compostos da parede celular fúngica como a quitina, as manoproteínas e os glucanos, também intervêm na interação levedura-hospedeiro (Geraldino et al., 2012; Santana et al., 2013).

As adesinas mais conhecidas e mais estudadas pertencem a uma família de 8 genes, designada *agglutinin-like sequence (ALS)* e que codificam oito proteínas, Als1-Als7 e Als9. No entanto, a expressão destas varia de acordo com a espécie de *Candida*, sendo que *C. albicans* possui como principais adesinas Als1, Als3, Als5 e Als1 e Als5 estão envolvidas na adesão a células epiteliais orais, mas também com a morfologia da levedura, enquanto Als1-4 estão presentes nos tubos germinativos e nas hifas, Als5-7 e Als9 localizam-se nos blastósporos (Henriques, Azeredo, & Oliveira, 2006; Karkowska-Kuleta et al., 2009; Mayer et al., 2013; Modrezewka & Kurnatowski, 2015).

Como supracitado, a adesão de *Candida*, precisamente *C. albicans*, a superfícies bióticas ou abióticas contribui para a formação do biofilme, sendo que *hyphal wall protein (Hw1p)*, glicoproteína expressa na superfície das hifas e estruturalmente semelhante a Als, foi a primeira adesina conhecida neste sentido. Contudo, Als1 e Als3 também têm sido descritas como adesinas importantes tanto na formação como na patogenicidade

associada ao biofilme por *C. albicans*. Estudos evidenciam ainda que estas adesinas são capazes de aderir ao epitélio oral, e que indivíduos com candidose oral expressam os genes que codificam estas adesinas (Liu & Filler, 2011; Martin, Wächtler, Schaller, Wilson, & Hube, 2011; Modrezewka & Kurnatowski, 2015; D. W. Williams et al., 2011).

3.3.2 Dimorfismo

O dimorfismo é definido como um fator de virulência pelo facto de *Candida*, enquanto levedura, exibir uma forma comensal, ao invés da morfologia filamentosa, em que se torna invasiva e patogénica (Jacobsen et al., 2012; Kabir, Hussain, & Ahmad, 2012; Santana et al., 2013).

Contudo, não são apenas as hifas que se encontram em órgãos infetados, uma ou outra morfologia pode estar presente aquando de uma infeção, exemplo disto é a ausência de hifas em órgãos como o rim e baço, quando ocorre uma infeção invasiva por *Candida*, contrariamente ao que acontece quando o órgão em questão é o fígado, em que a forma predominante são as hifas. Como tal, ainda que a forma leveduriforme não esteja diretamente associada à infeção, pode estar presente no decorrer da mesma pois promove a disseminação (Jacobsen et al., 2012; Mayer et al., 2013).

A patogenicidade relativa à forma micelial da levedura surge como resposta a diversos estímulos ambientais como por exemplo: temperaturas elevadas, pH próximo da neutralidade ou superior, presença CO₂ nomeadamente numa percentagem de 5.5, presença de elementos como o carbono, nitrogénio e aminoácidos que existem como fontes nutricionais e presença de soro e de N-acetil-glicosamina (Geraldino et al., 2012; Karkowska-Kuleta et al., 2009; Mayer et al., 2013).

Nem todas as espécies deste género têm a capacidade de alterar a sua morfologia, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e algumas estirpes de *C. tropicalis* conseguem exibir a forma de hifas verdadeiras, outras como *C. parapsilosis* e *C. krusei* exibem a formação de pseudo-hifas e, *C. glabrata* apenas evidencia a forma de blastósporos (tabela 2) (Whibley & Gaffen, 2015).

Para além disto, o dimorfismo constitui um fator essencial no desenvolvimento do biofilme por *C. albicans*, uma vez que a forma filamentosa é uma condição necessária na adesão a superfícies. As hifas desempenham então um papel crucial e central tanto na integridade da estrutura do biofilme, como na arquitetura das suas camadas (O'Donnell et al., 2015; Ramage, Saville, Thomas, & Lopez-Ribot, 2005).

Tabela 2 Morfologia de espécies potencialmente patogênicas do género *Candida* (Adaptado de, Thompson et al., 2011).

Espécies	Morfologia
<i>C. glabrata</i>	Levedura
<i>C. lusitaniae</i>	Levedura; Pseudo-hifa
<i>C. guilliermondii</i>	Levedura; Pseudo-hifa
<i>C. parapsilosis</i>	Levedura; Pseudo-hifa
<i>C. krusei</i>	Levedura; Pseudo-hifa
<i>C. tropicalis</i>	Levedura; Pseudo-hifas e Hifa
<i>C. dubliniensis</i>	Levedura; Pseudo-hifas e Hifa
<i>C. albicans</i>	Levedura; Pseudo-hifas e Hifa

3.3.3 Produção de enzimas

A produção de enzimas constitui um fator determinante na virulência do género *Candida* uma vez que aumenta a sua patogenicidade. *Candida* é capaz de secretar enzimas hidrolíticas para o meio extracelular e destruir as células hospedeiras. Destacam-se como principais enzimas as proteases, fosfolipases, lípases e hemolisinas, contudo apenas serão abordadas as proteases pois são as mais estudadas (Noumi et al., 2010; Sanitá et al., 2014; Santana et al., 2013; S. Silva et al., 2012).

O mecanismo pelo qual estas enzimas degradam as células hospedeiras é distinto, apesar de todas serem enzimas hidrolíticas. As proteases são responsáveis pela quebra das ligações peptídicas das proteínas celulares, enquanto as fosfolipases, presentes nas extremidades das hifas da levedura, hidrolisam os fosfolípidos da membrana celular do hospedeiro e alteram as características das superfícies celulares, uma vez que a hifa passa a estar em contacto com o citoplasma da célula hospedeira. Por sua vez, as lípases conseguem hidrolisar os triacilgliceróis e as hemolisinas degradam a hemoglobina, de

modo a utilizarem o ferro em prol da sua sobrevivência bem como da persistência nos tecidos do hospedeiro (Sanità et al., 2014; Santana et al., 2013; Sardi et al., 2013; S. Silva et al., 2012).

C. albicans secreta um conjunto de isoenzimas, aspartil proteinase secretórias (Sap), que são codificadas por uma família de 10 genes, *SAP*, que está definida de *SAP1* a *SAP10* e organizada em 6 grupos: *SAP1-3*, *SAP4-6*, *SAP7,SAP8*, *SAP9* e *SAP10* (Miranda, Vianna, Rodrigues, Rosa, & Corrêa, 2015; Sardi et al., 2013; N. C. Silva, Nery, & Dias, 2014).

As Saps foram descritas pela primeira vez em 1965 e, inicialmente, eram designadas como proteases ácidas de *Candida*, uma vez que estavam presentes predominantemente neste gênero e a sua ação dependia do pH. Funcionalmente, participação na adesão, invasão e na degradação de proteínas das células hospedeiras, que estão presentes no local da infecção tais como: albumina, hemoglobina, queratinócitos e imunoglobulina secretora A (IgA), bem como na diminuição da resposta do sistema imunitário do hospedeiro (Miranda et al., 2015; Modrzewska, Kurnatowski, & Khalid, 2016; Sardi et al., 2013; N. C. Silva et al., 2014; Yang, 2003).

Não obstante, destas funções mais gerais, cada gene responsável por codificar determinar proteína possui uma função específica. Ao passo que *SAP6* tem influência no processo de adesão e provoca alterações no sistema imunitário, *SAP9* e *SAP10*, funcionalmente, em vez de atuarem contra o hospedeiro, exercem a sua ação em benefício da levedura, ou seja, mantem a parede celular desta íntegra. Por outro lado, enquanto as *SAP1-3* estão presentes na fase leveduriforme do fungo, já as *SAP4-6* predominam na fase filamentosa (Miranda et al., 2015; Sardi et al., 2013).

O pH é um dos fatores que influencia a ação das proteases, uma vez que o meio ácido favorece a produção destas por *Candida*, aumentando assim a sua patogenicidade e, conseqüentemente infecções orais. Assim, diferentes Saps possuem atividade num determinado intervalo de pH, precisamente entre 2-7. A título de exemplo, *SAP1-3* possui como pH ideal o intervalo 3-5, contrariamente *SAP4-6* que possui atividade máxima entre 5-6. Deste modo, a capacidade de *Candida* ter atividade proteolítica em diferentes gamas de pH, faz com que se adapte a diversas condições ambientais (Miranda et al., 2015; Modrzewska et al., 2016; D. W. Williams et al., 2011).

A localização dos genes que codificam Saps também é diferente, por exemplo, se nos referirmos a *C. albicans*, a maioria dos genes localizam-se no citoplasma e na parede celular, contudo existem exceções, particularmente *SAP8* que se localiza no meio

extracelular e *SAP9* e *SAP10* que se encontram ligadas, quer a membrana quer à parede celular, através da glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Modrzewska et al., 2016).

Além disto, há também variações na quantidade de genes expressos entre diferentes espécies de *Candida*, pois as espécies com menor poder patogénico têm uma menor quantidade de genes *SAP*. Desta forma, estudos evidenciam que *C. albicans* produz níveis mais elevados de *SAPs* comparativamente às espécies não-*albicans* (N. C. Silva et al., 2014; D. W. Williams et al., 2011).

Assim, há uma maior produção de Saps em indivíduos com CO comparativamente a indivíduos saudáveis e, conforme estudos realizados, *SAP2*, *SAP4* e *SAP6* são expressos predominantemente em indivíduos com CO e em indivíduos assintomáticos, contudo *SAP1* e *SAP3* foram expressos exclusivamente em doentes com CO (Li et al., 2014; D. W. Williams et al., 2011).

3.3.4 Variabilidade fenotípica

O fenómeno de variabilidade fenotípica é também designado por *switching*. Este conceito foi definido pela primeira vez em 1985, como o processo pelo qual as colónias do género *Candida* alteram reversivelmente a sua morfologia, isto é a transição de colónias brancas para opacas (Soll, 2014).

Ainda que este fenómeno tenha sido descrito, inicialmente, na espécie *albicans*, estudos referem que outras espécies partilham desta capacidade tais como: *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (Lastauskienė, Čepulytė, Girkontaitė, & Zinkevičienė, 2015; Moralez, França, Furlaneto-Maia, Quesada, & Furlaneto, 2014).

3.3.5 Biofilme

A virulência associada ao biofilme está diretamente relacionada com fatores intrínsecos, nomeadamente, a variabilidade fenotípica que existe entre células planctónicas, e as mesmas organizadas em biofilme, pelo que esta é a forma na qual os microrganismos preferem viver, uma vez que captam os nutrientes necessários ao seu crescimento, com maior aptidão, possuem um crescimento mais organizado, e têm maior capacidade em resistir tanto a fármacos como à ação do sistema imunitário do hospedeiro (Gulati & Nobile, 2016; Nobile & Johnson, 2015; Santana et al., 2013; S. Singh et al., 2015).

4 BIOFILME ORAL

4.1 Formação do biofilme

O desenvolvimento do biofilme funciona como um ciclo e requer a existência de fases fundamentais como: inicial, intermédia, maturação e dispersão (Douglas, 2003; Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee, & Tribedi, 2016; López-Martínez, 2010; Ramage, Martínez, & López-Ribot, 2006; Taraszkievicz, Fila, Grinholc, & Nakonieczna, 2013).

A **fase inicial** caracteriza-se pela aquisição da película adquirida (PA) (figura 8.a), que se forma pela adsorção de moléculas como: glicoproteínas, fosfoproteínas, estaterinas, α -amilase, mucina, glucosiltransferases, proteínas ricas em prolina, imunoglobulinas secretoras A (IgA), lípidos e alguns compostos do fluido gengival, à superfície a colonizar, como é exemplo o esmalte dos dentes e/ou próteses dentárias. Posteriormente, por auxílio do fluxo salivar, os microrganismos são transportados passivamente para a PA (Douglas, 2003; P. D. Marsh & Nyvad, 2005; P. Marsh & Martin, 2005d; Ramage et al., 2006; Urenã et al., 2002).

Na **fase intermédia** (figura 8.b), ocorre a colonização primária através de um conjunto de interações físico-químicas de curta distância (adesão reversível) ou de interações estereoquímicas de longa distância (adesão irreversível), que permitem a adesão das espécies pioneiras à superfície revestida por saliva. Esta fase pode demorar entre 2-11h e as células microbianas encontram-se sobre a forma planctónica, dispostas numa monocamada celular. Dentro das espécies pioneiras destacam-se os *Streptococcus* como *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*, mas também outros géneros como *Actinomyces*, *Neisseria* e *Haemophilus* (P. D. Marsh et al., 2011; P. D. Marsh & Nyvad, 2005; P. Marsh & Martin, 2005d; Seabra, 2011; Thuy, Devine, & Marsh, 2013).

Posteriormente, as espécies pioneiras têm a capacidade de alterar o ambiente em que estão inseridas e assim fornecer as condições necessárias para que microrganismos com condições nutricionais diferentes consigam crescer. Assim, ocorre a colonização secundária (figura 8.c), dura cerca de 12h-20h e é caracterizada pela co-agregação, isto é adesão de microrganismos secundários, como *Candida*, aos microrganismos pioneiros. A **fase de maturação** (figura 8.d) desenvolve-se entre 18h-24h e caracteriza-se pela proliferação celular bem como pela formação de microcolónias, resultando deste modo num aumento da diversidade do biofilme (Seabra, 2011; Thuy et al., 2013).

Por fim, após a fase de maturação estar consolidada ocorre a **dispersão** das células a partir do biofilme, que por sua vez, podem colonizar outras superfícies (Gupta et al., 2016; Martinez & Fries, 2010; Seabra, 2011; Taraszkiwicz et al., 2013; Thuy et al., 2013).

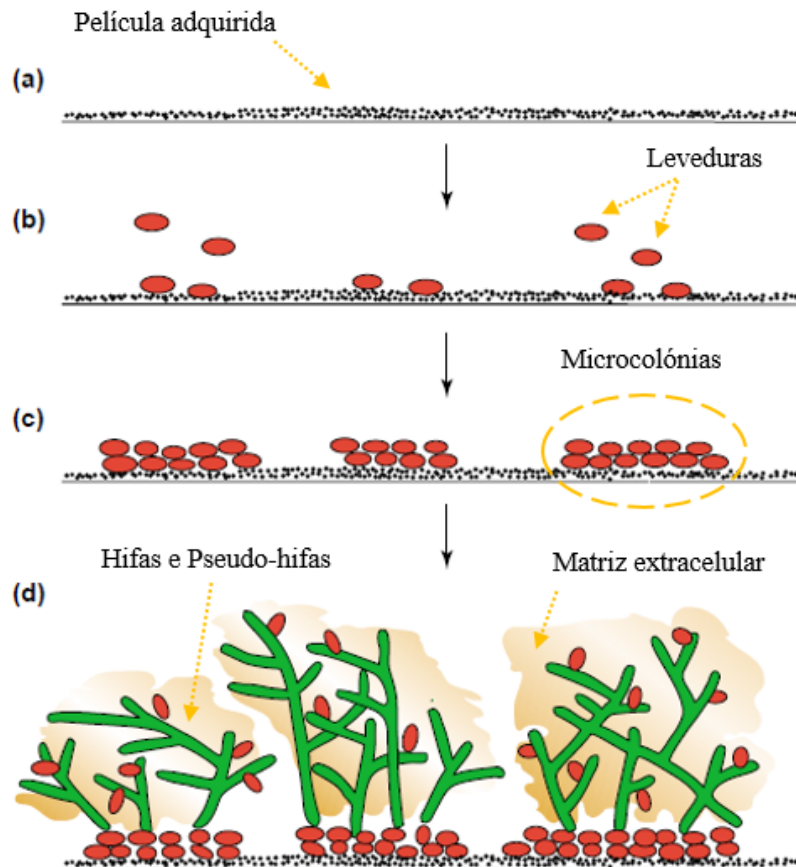


Figura 8 Formação do biofilme por *C. albicans*. (Adaptado de, Douglas, 2003).

4.1.1 Morfologia e arquitetura

A formação da matriz extracelular (ECM) resulta do próprio metabolismo dos microrganismos que alberga, e a sua relevância deve-se ao facto de formar uma barreira de proteção face à ação do sistema imunológico do hospedeiro, nomeadamente, à ação da fagocitose pelos neutrófilos e macrófagos, à atividade de alguns fármacos, favorecer a coesão das células o interior do biofilme e fornece os nutrientes necessários a estas. De um modo geral, a ECM é maioritariamente constituído por água (97%), nomeadamente

por canais de água que permitem a troca de nutrientes, mas também por células microbianas (2%-5%), polissacarídeos (1%-2%), ácido desoxirribonucleico (ADN) ou ARN (<1%-2%) e por iões na forma ligada ou livre. Não obstante podem existir variações de compostos entre diferentes espécies de *Candida* (tabela 3) (P. Marsh & Martin, 2005d; Martinez & Fries, 2010; Vasudevan, 2014; Zarnowski et al., 2014).

Para além disto, um biofilme maduro pode conter diversas morfologias de acordo com a espécie de *Candida*. Enquanto *C. glabrata* não exhibe a forma filamentosa, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são capazes de exibir tanto a forma leveduriforme como hifas verdadeiras, sendo que *C. albicans* pode ainda a apresentar pseudo-hifas. Por outro lado, a nível de arquitetura, *C. albicans* forma um biofilme constituído por duas camadas, já *C. parapsilosis* apresenta um biofilme mais fino e menos estruturado que o anterior e, por sua vez, *C. glabrata* forma um biofilme mais compacto que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (tabela 3) (Fanning & Mitchell, 2012; López-Martínez, 2010; Nobile & Johnson, 2015; S. Silva et al., 2011).

Tabela 3 Características do biofilme de *Candida*. (Desai, Mitchell, & Andes, 2014; S. Silva et al., 2011).

Microrganismo	Características do biofilme		
	Componentes da matriz	Morfologia	Arquitetura das camadas
<i>C. albicans</i>	Glucose; ADN; hexosamina; proteínas, fósforo e ácido urónico	Leveduras; hifas e pseudo-hifas	Dois camadas: fina (leveduras) densa (hifas)
<i>C. glabrata</i>	+ Carbohidratos e proteínas que <i>C. parapsilosis</i>	Apenas leveduras	Mais compacto que <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	+ Carbohidratos e – proteínas que <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i>	Leveduras; hifas	Menos estruturado e mais que que <i>C. albicans</i>
<i>C. tropicalis</i>	Hexosamina (+); fósforo; (-) proteínas; hidratos de carbono e + ácido urónico que <i>C. albicans</i>	Leveduras; hifas	-

4.1.2 Regulação do biofilme: fenómeno *Quórum Sensing*

O fenómeno *Quórum Sensing* (QS) consiste no mecanismo de comunicação celular entre microrganismos e depende da densidade celular. As moléculas de QS são segregadas pelos próprios microrganismos, como resultado do seu metabolismo, sendo detetadas por recetores específicos. A produção e acumulação destas moléculas ocorre ao longo do desenvolvimento do biofilme, até ser alcançada uma densidade celular elevada, limite crítico. Neste ponto, os genes que regulam as moléculas de QS, podem ser expressos ou reprimidos e assim, possuem uma ação benéfica, sendo utilizada em prol dos microrganismos, ou uma ação pejorativa sobre outros, devido à sua toxicidade. Para além disto, o QS pode influenciar a velocidade de crescimento das células em biofilme, bem como a capacidade dos microrganismos dispersarem a partir do mesmo (Barriuso, 2015; Han, Cannon, & Villas-Bôas, 2011; Bastiaan P. Krom, Levy, Meijler, & Jabra-Rizk, 2016; S. Singh et al., 2015; D. W. Williams et al., 2011; Wongsuk, Pumeesat, & Luplertlop, 2016).

O QS foi descrito, pela primeira vez, em células eucariotas, nomeadamente em células de *C. albicans*, onde o farnesol foi a molécula de QS identificada numa cultura de células de densidade elevada. Contudo, posteriormente, outras moléculas de QS fúngicas foram identificadas como o tirosol, feniletanol e triptofol. Atualmente, *C. albicans* continua a ser o microrganismo utilizado em estudos sobre QS (Barriuso, 2015; Martinez & Fries, 2010; Wongsuk et al., 2016).

C. albicans possui como principais moléculas o farnesol e o tirosol, contudo o triptofol, ácido fenilético, ácido farnesoico e dodecanol também têm sido identificados (figura 9). O farnesol está envolvido na inibição da forma filamentosa e, conseqüentemente inibe a formação do biofilme. Assim, biofilmes formados por *Candida* e que produzem farnesol exibem frequentemente morfologias de levedura ou pseudo-hifa. Por outro lado, a acumulação destas moléculas também pode promover a dispersão das células leveduriformes a partir do biofilme. Em oposição, o tirosol está envolvido na formação do tubo germinativo e de hifas em fases específicas do biofilme, nomeadamente, fase inicial e intermédia (Barriuso, 2015; Finkel & Mitchell, 2011; Han et al., 2011; Bastiaan P. Krom et al., 2016; D. W. Williams et al., 2011).

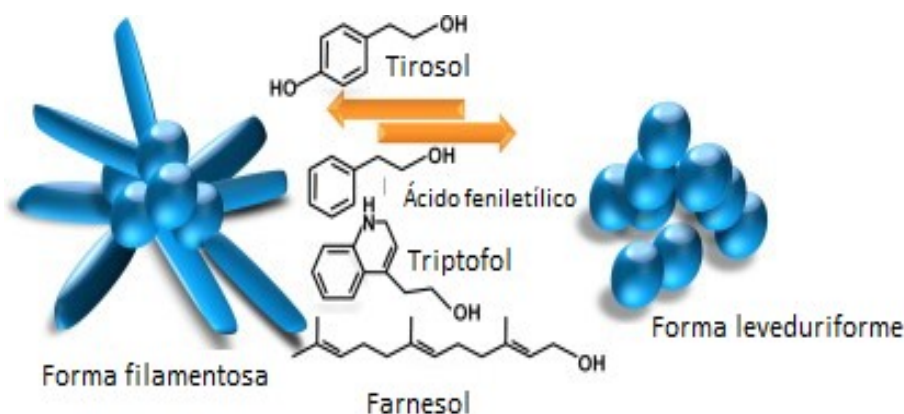


Figura 9 Influência de moléculas QS na morfologia de *Candida*. (Adaptado de, Han et al., 2011).

Em suma, este mecanismo, além de regular a formação do biofilme, desempenha funções importantes participando na alteração da morfologia da levedura, indução da apoptose celular destas. O QS intervém ainda no sistema imunitário do hospedeiro e pode modificar os efeitos terapêuticos de fármacos antifúngicos (Barriuso, 2015; Wongsuk et al., 2016).

4.2 Fatores do hospedeiro que afetam a formação do biofilme

Candida é uma levedura de carácter oportunista, como tal o desenvolvimento e a gravidade das infeções que provoca, são determinados pelos fatores predisponentes do hospedeiro locais e sistémicos (Kauffman, 2016; Millsop & Fazel, 2016; A. Singh, Verma, Murari, & Agrawal, 2014).

Os fatores locais, como os utilizadores de próteses e a terapêutica corticoide inalada, têm a capacidade de alterar a flora normal por aumento da colonização de microrganismos. Por sua vez, os fatores sistémicos estão relacionados com a imunossupressão do hospedeiro, como é exemplo: VIH/SIDA, diabetes, antibioterapia, corticoides sistémicos, idade avançada. Estes possuem maior relevância que os anteriores por terem capacidade de atingir órgãos de forma invasiva (tabela 4) (Kauffman, 2016; Millsop & Fazel, 2016; A. Singh et al., 2014).

Tabela 4 Fatores de predisposição do hospedeiro no desenvolvimento do biofilme oral por *Candida*. (Adaptado de, Darwazeh & Darwazeh, 2014; P. Marsh & Martin, 2005c; Millsop & Fazel, 2016).

Fatores de predisposição do hospedeiro	
Fatores locais	Fatores sistêmicos
Prótese dentária	Infância; idade avançada; gravidez
Utilização de corticoides inalados	Desordens endócrinas (Ex. Diabetes, Hipotireoidismo, Hiperparatiroidismo)
Xerostomia	Imunossupressão (Infeção sistêmica prolongada; VIH/SIDA e doenças oncológicas)
Dieta rica em açúcar e carboidratos	Utilização de antibióticos de largo espectro
Tabaco	Défice nutricional (Ex: Hipovitaminose, Deficiência em ferro, Má-nutrição)
Higiene oral insuficiente	Radioterapia/ Quimioterapia

4.3 Impacto do Biofilme Oral

4.3.1 Candidose Oral

A CO é a infeção fúngica mais frequente que resulta do biofilme complexo de *Candida* sp., particularmente de *C. albicans* (Gursoy, Ozcakir-Tomruk, Tanalp, & Yılmaz, 2013; Millsop & Fazel, 2016; O'Donnell et al., 2015; Richard, 2013).

A CO não é uma infeção única pois possui diferentes apresentações clínicas podendo ser classificada em quatro tipos: a **candidose pseudomembranosa**, forma comum de candidose oral e que pode ser simples ou, no caso de indivíduos com imunossupressão, evoluir para o estado crónico (caso dos doentes VIH/SIDA); **candidose eritematosa aguda** que aquando da evolução para a cronicidade origina infeções secundárias como: queilite angular, queilite linear, estomatite protética, candidose atrófica aguda e crónica, eritema gengival e glossite romboide mediana; **candidose hiperplásica** crónica e a **candidose mucocutânea** onde estão incluídas a candidose orofaríngea, esofagite,

candidose mucocutânea crónica. Alguns autores também classificam a CO de acordo o tipo de lesões, brancas ou eritematosas, classificando à parte destas a candidose mucocutânea crónica, candidose crónica multifocal e queilocandidose (Kauffman, 2016; Millsop & Fazel, 2016; D. Williams & Lewis, 2011).

De facto a classificação da CO tem sido bastante discutida por não existir unanimidade nas opiniões dos diferentes autores, e por isso tem sofrido alterações. A classificação mais recente divide CO em primária, onde se inclui a candidose pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica e a secundária ou crónica como a candidose mucocutânea sistémica (Simões, Fonseca, & Figueiral, 2013).

A **candidose pseudomembranosa**, conhecida vulgarmente por aftas, é característica de doentes com terapêutica corticoide inalada ou outros fármacos que suprimam o sistema imunitário, com doenças do foro oncológico ou autoimunes, e transplantados. Os idosos e os recém-nascidos, dada a composição do seu microbioma oral, são também considerados grupos candidatos ao desenvolvimento desta infeção (figura 10) (P. Marsh & Martin, 2005c; Millsop & Fazel, 2016).

Geralmente *C. albicans* é o microrganismo implícito na candidose pseudomembranosa (P. Marsh & Martin, 2005c).

Quanto à **candidose eritematosa** esta divide-se em aguda e crónica. A fase aguda surge principalmente com o uso de antibioterapia de largo espectro, e a fase crónica com o uso de prótese dentária, higiene oral incorreta, VIH/SIDA, corticoides mas também como consequência da micose acima referida. As lesões, contrariamente à candidose pseudomembranosa, são vermelhas, a mucosa oral fica seca e brilhante, as placas situam-se no dorso da língua, e na fase aguda provocam dor devido à formação de úlceras na superfície da mucosa (P. Marsh & Martin, 2005c; Simões et al., 2013).

Quando há uma evolução do estado agudo para o crónico, as espécies que são frequentemente isoladas são: *C. albicans* e *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* (figura 10) (P. Marsh & Martin, 2005c).

No que diz respeito à candidose hiperplásica, é caracterizada por lesões brancas, em placa ou em nódulos, com formação de eritema, e localizam-se no canto da boca ou na língua (P. Marsh & Martin, 2005c; Scully, 2014; Simões et al., 2013).

A **candidose mucocutânea** abrange um grupo de infeções não só da cavidade oral mas também da pele e das unhas, e apresenta lesões pseudomembranosas. Surge maioritariamente em crianças ou na adolescência, enquanto no adulto surge associada a patologias como a miastenia gravis. Para além disto, pode também estar associada a

problemas na imunidade do hospedeiro, uma vez que estudos afirmam que indivíduos VIH/SIDA, cuja imunidade celular está comprometida, têm tendência a desenvolver micoses crônicas provocadas por *Candida* (figura 10) (P. Marsh & Martin, 2005c; Sandhu, 2014).

A candidose pseudomembranosa, hiperplásica e eritematosa crônica estão associadas à formação de biofilmes por *Candida*, sendo que a última está intimamente relacionada com próteses dentárias (Flemmig & Beikler, 2011).



Figura 10 Lesões de candidose oral. **A.** – Candidose pseudomembranosa; **B.** – Candidose hiperplásica; **C.** – Candidose mucocutânea. (Adaptado de, Millsop & Fazel, 2016).

4.3.2 Cárie

A cárie dentária resulta da formação de biofilmes polimicrobianos sobre superfícies duras, dentes, causando a destruição do esmalte e da dentina (Peters, Jabra-Rizk, O'May, Costerton, & Shirtliff, 2012).

Estudos têm indicado que há uma associação entre *C. albicans* e *S. mutans* no desenvolvimento da cárie. *C. albicans* utiliza o lactato, excretado por *S. mutans*, como fonte de carbono, permitindo o seu crescimento. Isto, por sua vez, provoca alterações nos níveis de oxigénio que favorecem o crescimento de *S. mutans*. Por sua vez, estudos *in*

vitro, afirmam que *S. mutans* melhora a sua capacidade de adesão através das células filamentosas de *C. albicans* (Metwalli, Khan, Krom, & Jabra-Rizk, 2013).

4.3.3 Periodontite

A doença periodontal é caracterizada, na forma ligeira e reversível, por uma inflamação nos tecidos periodontais, em que a gengiva se apresenta inchada e a sangrar, sendo por designada gengivite. Contudo, pode evoluir para um estado grave e irreversível, caracterizado pela perda de dentes, periodontite. Apesar de ser infecção resultante de um biofilme subgengival bacteriano, que posteriormente atinge os dentes, várias espécies de *Candida* têm sido isoladas de indivíduos portadores da patologia num estado avançado. Assim, as espécies frequentemente encontradas neste contexto são *S. aureus* e *C. albicans*, e crê-se estarem associadas com doentes diabéticos, neutropénicos, VIH/SIDA e com agranulocitose (Canabarro et al., 2013; O'Donnell et al., 2015; Shi et al., 2015).

A estrutura de interação entre *S. aureus* e *C. albicans* são as células filamentosas desta, já que *S. aureus* adere, preferencialmente, a estas células e forma microcolónias ao longo de todo o biofilme (figura 11). *Candida* e *S. aureus* formam um biofilme complexo e no qual se estabelecem relações de benefício mútuo, mas também antagónicas. Para além disto, a presença da levedura, facilita a disseminação de *S. aureus*, da superfície da mucosa oral, para a corrente sistémica (Allison et al., 2016; Freiberg et al., 2015; Harriott & Noverr, 2011; O'Donnell et al., 2015).

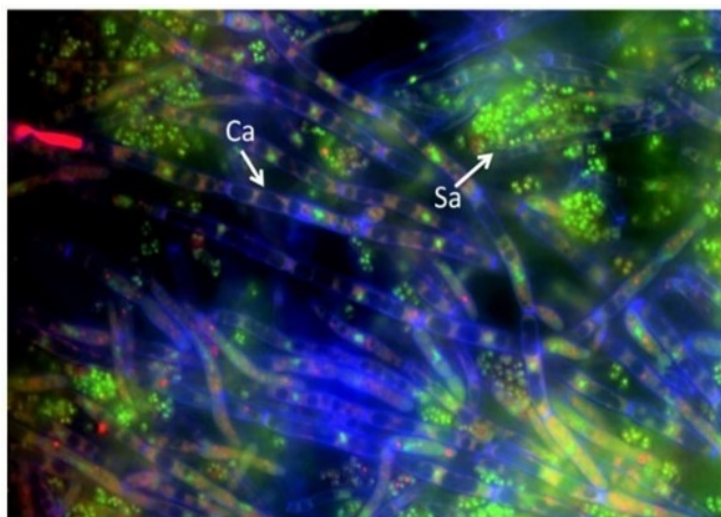


Figura 11 Biofilme misto por *S. aureus* e *C. albicans*. Imagem obtida por microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura. Foram utilizados os corantes SYTO9 (verde) para visualizar as células bacterianas e o corante FUN-1 (azul) para visualizar as células fúngicas. A azul, o corante branco de calcofluor, foi utilizado para visualizar a parede celular fúngica. **Ca**- *C. albicans*; **Sa** – *S. aureus*. (Adaptado de, Harriott & Noverr, 2011).

4.3.4 Endodontite

As infecções endodônticas têm por base uma infecção na polpa do sistema do canal radicular e resultam de traumas sobre os dentes, nomeadamente, de infecções como a cárie ou quando a periodontite atinge o ápice da raiz do dente (O'Donnell et al., 2015).

Estudos evidenciam uma relação entre *Enterococcus faecalis*, agente etiológico principal e, *C. albicans* apesar dos mecanismos inerentes à sua interação permanecerem desconhecidos (O'Donnell et al., 2015).

4.3.5 Estomatite

A estomatite corresponde a uma inflamação da mucosa oral e está diretamente relacionada com a utilização de próteses dentárias, tendo em conta que estas servem de substratos para o desenvolvimento de biofilmes polimicrobianos (O'Donnell et al., 2015).

Os microrganismos frequentemente isolados de indivíduos com estomatite protética são, para além de *C. albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *S. aureus*, *Actinomyces viscosus* e *Fusobacterium* (figura 12). Não obstante, a presença simultânea

destes microrganismos, está também associada a infecções com a cárie e periodontite (Gulati & Nobile, 2016).

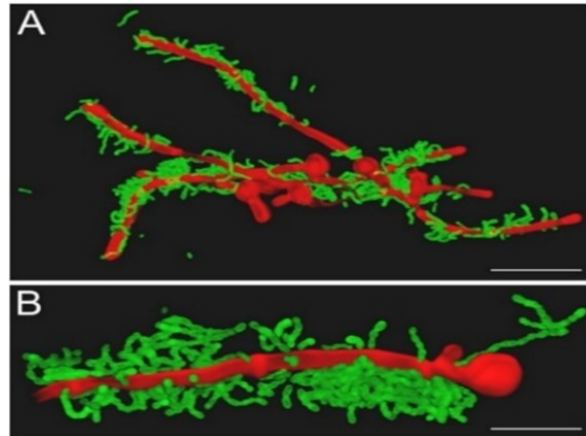


Figura 12 Formação de biofilmes mistos por *C. albicans*, *Streptococcus gordinii* e *Streptococcus oralis*. Imagens obtidas por fluorescência. A) Biofilme misto por *C. albicans* e *Streptococcus gordinii*; B) biofilme misto por *C. albicans* e *Streptococcus oralis*. *As células leveduriformes foram marcadas com branco de calcofluor (vermelho) e as células bacterianas com isotiociano de fluoresceína (FITC) (verde). (Adaptado de, Nobbs & Jenkinson, 2015).

4.3.6 Infecção Orofaríngea e Respiratória

Candida não é dado como um microrganismo que coloniza frequentemente os pulmões, todavia estudos têm evidenciado a sua presença em indivíduos com infecções pulmonares como, pneumonia e fibrose cística, em que *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) é o principal agente etiológico, mas também na doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e no carcinoma pulmonar. De facto, tem sido consistente que microrganismos patogénicos respiratórios podem colonizar a cavidade oral, e vice-versa, tendo em conta de *Candida* e *P. aeruginosa* estão envolvidos em coinfeções respiratórias. Um mecanismo provável para este facto é a aspiração de secreções orais para os pulmões, constituindo assim a principal porta de entrada de patogénicos orais (Harriott & Noverr, 2011; O'Donnell et al., 2015).

Para além disto, crê-se que *C. albicans* e *P. aeruginosa* possuem uma relação tanto sinérgica como antagónica na formação de biofilmes, e são vários os estudos sobre os mecanismos de interação envolvidos. Assim, como exemplo, é proposto que *P.*

aeruginosa adere preferencialmente às células filamentosas de *C. albicans*, sendo capaz de as matar, através da produção de enzimas, contudo é capaz de formar um biofilme sobre hifas mortas (Dhamgaye, Qu, & Peleg, 2016; Harriott & Noverr, 2011).

4.3.7 Carcinoma Oral

Candida é responsável por um espectro diversificado de infecções orais e, atualmente têm sido discutida qual a sua relação, e papel que desempenha, no desenvolvimento do carcinoma oral. Em 1969, Cawson e Williamson, afirmaram, pela primeira vez, que *Candida* tem uma intervenção significativa no carcinoma da mucosa oral, contudo, os mecanismos inerentes a esta associação permanecem em estudo até à data (Kang et al., 2016).

Crê-se que o efeito carcinogénico de *Candida*, nomeadamente, *C. albicans*, pode estar relacionado com a formação de biofilmes polimicrobianos, devido às interações que ocorrem entre os microrganismos, e que tanto a forma leveduriforme como filamentososa pode estar relacionadas com a malignidade (Kang et al., 2016).

É importante ressaltar que as infecções causadas por biofilmes polimicrobianos, não são exclusivamente provocadas só por bactérias ou só por fungos, e têm um grande impacto na morbidade e mortalidade. *C. albicans* é responsável por 27-56% das infecções nosocomiais sistémicas, bem como de outras como otite média, infecções do trato urinário, fibrose cística e patologias associadas a dispositivos médicos (Allison et al., 2016; Gulati & Nobile, 2016; Harriott & Noverr, 2011).

Posto isto, as interações entre fungo-fungo e fungo-bactéria contribuem para o desenvolvimento do biofilme misto por *Candida*, ainda que os mecanismos inerentes permanecerem desconhecidos. Apesar disto, estudos têm apresentado possíveis mecanismos de interações entre *Candida*-bactérias tais como: a capacidade das bactérias aderirem às hifas da levedura e as alterações provocadas por um dos microrganismos nomeadamente a nível de pH, oxigénio e secreção de moléculas QS, beneficia o crescimento do outro (Gulati & Nobile, 2016; Mukherjee & Chandra, 2015).

4.4 Mecanismos de defesa do hospedeiro

O sistema imunitário do hospedeiro constitui um mecanismo de defesa face aos microrganismos patogénicos. Dentro do sistema imunitário existem dois tipos de mecanismos imunológicos: a imunidade inata e a adquirida. Estes, apesar de não atuarem como mecanismos isolados, também não dependem um do outro para desenvolverem uma resposta (Costa, 2014; Parslow & Bainston, 2004).

A grande diferença entre o sistema imunitário inato e o adquirido é o fato da resistência inata já existir quando há a apresentação do patogénico ao organismo, enquanto a adquirida possui uma resposta praticamente nula no primeiro contacto com este. Isto significa que a imunidade inata desenvolve espontaneamente uma resposta de defesa, já a adquirida não só aumenta a sua resposta com a exposição a um patogénico específico, como sofre alterações ao longo do contacto com este (Parslow & Bainston, 2004).

No que diz respeito à imunidade inata, os microrganismos possuem nas suas superfícies, padrões moleculares associados a patogénicos (PAMPs) tais como: lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácidos teicoicos. Assim, os mecanismos que medeiam a resposta imunitária inata, como a fagocitose, libertação de agentes mediadores, ativação de proteínas do sistema do complemento e a síntese de proteínas, citocinas e quimocinas, são desencadeados quando ocorre um reconhecimento/interação entre os PAMPs e os recetores de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRRs). Dentro destes últimos, destacam-se os recetores pertencentes à família *Toll-like* (TLRs), que estão presentes essencialmente em células efectoras do sistema imunitário inato tais como: macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (Cruvinel et al., 2010).

Por sua vez, a imunidade adquirida possui como células principais os linfócitos, no entanto, as células apresentadores de antígenos (APCs) como são exemplo as células dendríticas, macrófagos e células B, que estão associadas a moléculas do complexo de histocompatibilidade (major histocompatibility complex – MHC), também são importantes nesta resposta porque apresentam os antígenos aos linfócitos. Enquanto moléculas MHC de classe I são apresentadas a células T CD8, que se diferenciam em células T citotóxicas e conseguem matar as células infetadas, MHC II são apresentadas a células T CD4, que diferenciam em células T_{H1} e T_{H2} (Cruvinel et al., 2010; Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2005).

Quando é estabelecida uma infeção oral por *Candida* e, tomando como exemplo ilustrativo *C. albicans*, o primeiro passo consiste na adesão da levedura aos queratinócitos

orais. Aqui, ocorre a interação entre PAMPs e PRRs que, posteriormente, estimula a produção de citocinas como IL-1 β , IL-6 e IL-23. Por sua vez, estas citocinas induzem a diferenciação de Th17 e geram IL-17 e/ou IL-22. As células do sistema imunitário inato oral, como as Natural Killer (NK), células T $\gamma\delta$ e as células linfóides, são capazes de produzir IL-17 na presença de *C. albicans*, sendo que a quantidade de IL-17 produzida é suficiente para conferir uma resposta imunitária eficaz contra a levedura. Deste modo, IL-17 é essencial no processo da defesa da mucosa oral contra *C. albicans*. Por outro lado, a ativação de células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos desempenha igualmente um papel importante na imunidade contra estas infecções. Face ao exposto, as células dendríticas, constituem o elo de ligação entre os dois sistemas, já que após desencadeada a resposta inata, são capazes de ativar as células T e, conseqüentemente, a resposta adquirida passa a ser regulada por células Th1, Th17 e células T reguladoras. Assim, tanto o sistema imunitário inato como o adquirido são mecanismos de defesas cruciais neste sentido (Cruvinel et al., 2010; Feller, Khammissa, Chandran, Altini, & Lemmer, 2014; Kullberg, Veerdonk, & Netea, 2014; Richardson & Moyes, 2015; Wüthrich, Deepe, & Klein, 2012).

A família de PRRs de *C. albicans* inclui: TLRs, recetores de lectina tipo C (CLRs), o domínio de oligomerização de nucleótidos (NOD) e recetores do tipo nucleótido (NLR), ainda que TLRs e CLRs possuam maior relevância. Os PRRs são capazes de reconhecer PAMPs em diferentes componentes da célula fúngica, por exemplo Dectin-1 (CLRs) e TLR2 reconhecem glucanos da parede celular, Dectin-2 reconhece mananos da parede celular, Dectin-3 reconhece as hifas da levedura e, por sua vez, a produção de citocinas IL-10 em resposta à presença hifas, depende de mecanismos associados a TLR2 (Feller et al., 2014; Kiyoura & Tamai, 2015; Wang, 2015).

5 TERAPÊUTICA

5.1 Terapêutica Antifúngica

Os fármacos utilizados na terapêutica de infecções provocadas por fungos designam-se por antifúngicos. São uma classe terapêutica limitada e atuam em diversas estruturas destes microrganismos (figura 13) (Pierce, Srinivasan, Uppuluri, Ramasubramanian, & López-Ribot, 2013).

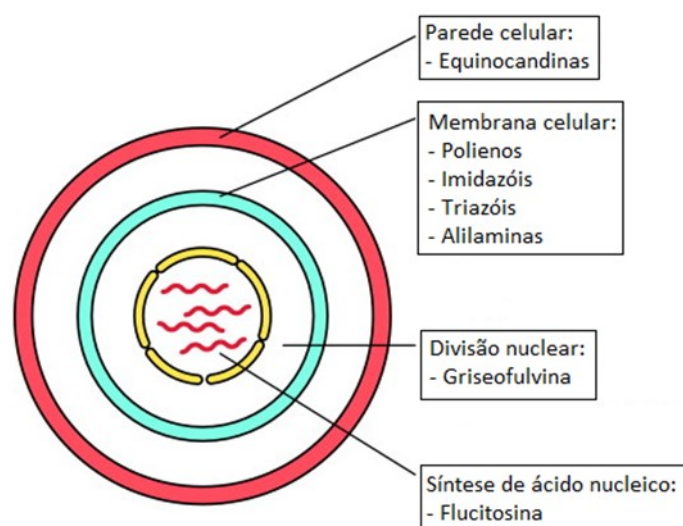


Figura 13 Alvos terapêuticos de agentes antifúngicos. (Adaptado de, Wecker, Crespo, Dunaway, Faingola, & Waths, 2010).

A instituição da terapêutica antifúngica deverá, primeiramente, ter em consideração aspetos fundamentais como: o estado do sistema imunitário do indivíduo, os fatores de predisposição associados, ponderar a eliminação ou controlo dos últimos, o tipo de CO e tamanho das lesões e a eficácia e toxicidade do composto, de modo a alcançar uma gestão adequada da terapêutica (Garcia-Cuesta, Sarrion-Perez, & Bagan, 2014; Rautemaa & Ramage, 2011).

Desta forma, a eliminação dos fatores de predisposição antecede a terapêutica antifúngica, o que nem sempre é possível devido a patologias coexistentes como diabetes e VIH/SIDA. Ainda assim, a administração de antibióticos, corticoides,

imunossupressores e a utilização de próteses dentárias são fatores que podem ser controlados (López-Martínez, 2010).

5.1.1 Terapêutica na Candidose oral

As classes de antifúngicos utilizados na terapêutica de CO são essencialmente: **polienos**, nistatina e anfotericina B, e os **azóis**, miconazol, clotrimazol, cetoconazol, itraconazol e fluconazol. Contudo em alguns casos, pode ser necessário recorrer ao voriconazol e posaconazol (triazóis), à anfotericina lipossomal B (polieno introduzido em lipossomas) ou a **equinocandinas** (Patil, Rao, Majumdar, & Anil, 2015).

Os polienos, em 1950, foram os primeiros a serem descritos. Têm a capacidade de se ligar aos esteróis da membrana celular, alterando a sua permeabilidade. Esta alteração é provocada pela formação de poros, aquando da ligação do polieno ao ergosterol. Aqui, ocorre a dispersão do conteúdo intracelular, esvaziamento do citoplasma e, por fim, a morte do microrganismo. **As moléculas azólicas** foram descritas, pela primeira vez, em 1980 e, até à data, têm sido largamente utilizadas, constituindo o maior grupo de antifúngicos em micologia médica. O seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da enzima 14- α -desmetilase (isoenzima do citocromo P450), codificada pelo ERG11, que converte o lanosterol em ergosterol. **As equinocandinas** são moléculas, recentemente descobertas e atuam na parede celular fúngica, nomeadamente num componente específico desta, 1,3- β -D-glucano. A inibição desta enzima origina a lise e morte celular da célula fúngica, uma vez que intervém na síntese de compostos essenciais a esta, como os glucanos (tabela 5) (Freitas & Frade, 2014; Pierce et al., 2013; Rang, Ritter, Flower, & Henderson, 2016).

Tabela 5 Fármacos antifúngicos e respetivas características. **O**- oral; **T**- tópica; **IV**- intravenosa; **SO**- solução oral. (Adaptado de, Freitas & Frade, 2014).

Antifúngico	Classe	Via de administração	Ação	Resistência
Cetoconazol	Imidazóis	O;T	Fungistático/fungicida	Frequente
Miconazol		T		
Clotrimazol		T		
Econazol		T		
Fluconazol	Triazóis	IV;O;SO		
Itraconazol		IV;O;SO		
Voriconazol		IV;O		
Posaconazol		SO		
Ravuconazol		IV;O		
Caspofungina	Equinocandinas	IV		
Anidulafungina		IV		
Micafungina		IV		
Anfotericina B	Polienos	IV;T	Fungicida	Rara
Anfotericina B lipossomal		IV		
Nistatina		SO;T		

A terapêutica tópica é suficientemente eficaz em doentes imunocompetentes, porém aquando da imunossupressão do sistema imunitário é necessário recorrer à terapêutica conjugada, tópica e sistémica. Por outro lado, é necessário ter atenção os doentes com recorrências, levando em consideração o desenvolvimento de resistências por determinadas espécies (Patil et al., 2015; Rautemaa & Ramage, 2011).

Na CO a terapêutica de primeira linha são as soluções orais de nistatina e anfotericina B, durante um período mínimo de 7 dias e, no caso de recorrências, a terapêutica deverá ser prolongada por mais 4-6 semanas. Apesar do prognóstico positivo destas moléculas, os azóis, nomeadamente, o miconazol, itraconazol, cetoconazol e clotrimazol também são utilizados na terapêutica tópica de CO (Garcia-Cuesta et al., 2014; López-Martínez, 2010; Rautemaa & Ramage, 2011).

No que diz respeito à terapêutica sistêmica, esta apenas é considerada e iniciada em doentes que não obtiveram resposta, com resistências ou que não toleram a terapêutica tópica, bem como em CO complicadas devido a outras patologias ou com risco elevado de desenvolver infecções sistêmicas. Os fármacos antifúngicos frequentemente administrados sistemicamente são preferencialmente, o fluconazol, pois é o azol que atinge maiores concentrações na saliva, e o itraconazol (Kragelund, Reibel, & Pedersen, 2016; López-Martínez, 2010; Lyu, Zhao, Hua, & Yan, 2016; Patil et al., 2015). Por outro lado, o posaconazol foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como terapêutica de primeira linha na CO em doentes com doenças graves, ou em doentes que não obtiveram resposta à terapêutica tópica. (Clark, Grim, & Lynch, 2015; Patil et al., 2015).

Apesar do fluconazol ser considerado terapêutica de primeira linha, tem um risco associado de desenvolver resistências por várias espécies. Assim, nestes casos, apresentam-se como opções terapêuticas: solução oral de itraconazol ou suspensão oral de posaconazol, 200 mg e 400mg, uma e duas vezes por dia, respetivamente, mantem a dose de 400 mg duas vezes por dia durante um período de 28 dias. Outra hipótese terapêutica, em doentes refratários, é a utilização de equinocandinas ou de anfotericina lipossomal, pois possuem eficácia terapêutica em biofilmes maduros formados por *Candida* (Darwazeh & Darwazeh, 2014; Patil et al., 2015).

Numa perspetiva geral, devido a eventuais infecções sistêmicas potencialmente desencadeadas pelo biofilme oral, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm debruçado a sua atenção na eficácia de fármacos antifúngicos, em monoterapia e em terapêuticas conjugadas, sobre as células de *Candida* em biofilme e, por vezes, comparando estas com a ação de antifúngicos nas homólogas planctónicas. No geral, concluem que a terapêutica conjugada apresenta melhores resultados que a utilização de antifúngicos isolados, nomeadamente, aquando da utilização de anfotericina B com caspofungina ou posaconazol. Expcionalmente, a anfotericina B lipossomal em monoterapia, revelou ter eficácia na diminuição da formação do biofilme por *C. albicans*, contrariamente ao descrito para azóis e anfotericina na formulação padrão (Gulati & Nobile, 2016; Kawai, Yamagishi, & Mikamo, 2015; Martinez & Fries, 2010; Sardi et al., 2013; Tobudic, Kratzer, Lassnigg, & Presterl, 2012; Walraven & Lee, 2013).

5.1.2 Mecanismos de resistência

De acordo com a Comissão Europeia sobre Avaliação de Suscetibilidade Antimicrobiana (EUCAST), a resistência pode ser classificada em microbiológica ou clínica, sendo que a clínica é definida pela ausência do efeito terapêutico, e a microbiológica pode ser inata/primária, quando o microrganismo possui resistência antes da exposição ao fármaco, ou adquirida/secundária quando surge após o contacto com a molécula antifúngica (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014).

Existem mecanismos de resistência exclusivos das células de *Candida* em biofilme, como a matriz celular e as células persistentes, e mecanismos comuns a estas células e às suas homólogas planctónicas, como as bombas de efluxo e sobre regulação positiva de alguns genes (Mathé & Van Dijck, 2013).

Por outro lado, as células sésseis não precisam de sofrer alterações genéticas para exhibir resistências aos fármacos, contrariamente ao que acontece com as células planctónicas, que possuem mutações genéticas irreversíveis de modo a adquirirem resistências (Ramage, Rajendran, Sherry, & Williams, 2012).

Apesar dos mecanismos que provocam esta resistência serem de origem multifatorial, ainda não estão bem delineados e, por isso, tratam-se apenas de premissas (Sardi et al., 2013).

➤ Mecanismos de resistência de células sésseis

As **células persistentes** são definidas como células fenotipicamente alteradas e que suportam concentrações de fármacos acima da concentração mínima inibitória (CMI). É também, o facto de viverem em modo de dormência, que faz com que fármacos não tenham efeito sobre as mesmas, pois para que exista efeito farmacológico, as células têm de estar em modo ativo. Contudo, nem todas as espécies têm a capacidade de formar células persistentes, enquanto *C. krusei* e *C. albicans* apresentam esta forma de resistência, o mesmo não acontece para *C. glabrata* (Mathé & Van Dijck, 2013; Taff, Mitchell, Edward, & Andes, 2013).

Um estudo realizado, com o intuito de entender este mecanismo, concluiu que, após a inoculação de células sésseis de *C. albicans*, previamente sujeitas à ação da anfotericina B, ocorreu a formação de um novo biofilme. Apesar deste facto ainda não

estar completamente consolidado cientificamente, os resultados do estudo realizado evidenciam a existência de células persistentes (Sardi et al., 2013; Taff et al., 2013).

A **velocidade de crescimento** celular é considerada um mecanismo de resistência, todavia estudos comprovam que este não é significativo. Apesar da velocidade de crescimento das células em biofilme ser muito baixa e a maioria dos antifúngicos ter ação sobre células em divisão, estudos realizados com anfotericina B, verificam que independentemente da velocidade de crescimento celular, a resistência foi similar em todas as células do biofilme por *C. albicans* (Mathé & Van Dijck, 2013; Taff et al., 2013).

Já no que diz respeito, à **matriz extracelular**, os estudos efetuados afirmam que o grau de produção de ECM de *C. albicans* e *C. tropicalis* está envolvido no mecanismo de resistência. Estudos utilizaram ECM de um biofilme e adicionaram a um meio com células planctônicas, e aqui observou-se o mesmo grau de resistência, sugerindo que ECM é realmente capaz de aprisionar antifúngicos. Para além de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* também apresentam este mecanismo de resistência. Outros estudos referem ainda que esta resistência é manifestada face a azóis, equinocandinas e flucitocina (Taff et al., 2013).

➤ **Mecanismos de resistências de células sésseis e planctónicas**

○ **Bombas de efluxo**

Em *C. albicans* existem duas famílias principais de bombas de efluxo, que diferem na fonte de energia, que permite a expulsão do fármaco do meio intracelular, e na afinidade que possuem para os azóis. As bombas CDR fazem parte da família *ATP-binding cassette* (ABC) e têm a capacidade de expulsar qualquer azol, contrariamente, à bomba que pertence à família *major facilitator superfamily* (MFS) que possui especificidade exclusiva para o fluconazol (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Cannon et al., 2009).

C. albicans manifesta este mecanismo de resistência em relação aos azóis, no entanto o mesmo não se sucede face à anfotericina B e equinocandinas. Quando as leveduras estão na forma de biofilme, os estudos efetuados têm evidenciado que este mecanismo não se manifesta de igual forma em todo o desenvolvimento do biofilme por *C. albicans*, ou seja, as fases inicial e intermédia apresentam maior resistência comparativamente à fase de maturação (Mathé & Van Dijck, 2013; Ramage et al., 2012; Taff et al., 2013).

Por outro lado, os estudos realizados clarificam que há uma menor expressão dos genes, que codificam as respectivas bombas, nomeadamente *CDR1* e *CDR2* para CDR e *MDR1* para MFS, quando não existe uma exposição destes a antifúngicos. Contudo, em oposição, afirmam que aquando da exposição há uma sobre expressão de *CDR1/2* e *MDR1*, bem como uma maior resistência diretamente associada à terapêutica prolongada com azóis (Mathé & Van Dijck, 2013; Ramage et al., 2012; Taff et al., 2013).

- **Sobre expressão de genes**

Estudos revelam que a resistência aos azóis existe em *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e *C. krusei*, sendo que os mecanismos de resistência são idênticos entre espécies, assim a sobre expressão das bombas de efluxo *CDR1*, *CDR2* e *MDR1*, bem como as mutações em *ERG11* têm sido descritas (Freitas & Frade, 2014; Taff et al., 2013).

A sobre regulação de *CDR1*, *CDR2* e *MDR1* deve-se a mutações nos respetivos fatores de transcrição, TAC1 e MRR1. Assim os genes implicados na resistência aos azóis de acordo a espécie de *Candida* são: *C. glabrata* *CDR1*, *CDR2* e *SNQ2*; *C. dubliniensis* *CDR1* e *CDR2*; *C. tropicalis* *CDR1* e *C. krusei* *CDR1* e *CDR2* (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Spampinato & Leonardi, 2013).

Recentemente, surgiu um mecanismo de resistência para *C. albicans* e *C. tropicalis* relacionado com mutações em *ERG11* e *ERG3*. Apesar disto, no geral, mutações em *ERG11* estão implícitas na resistência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014).

Para além disto, Upe2 é um fator de transcrição de *ERG11* em *C. albicans* e, estudos evidenciam que mutações neste fator originam, igualmente, sobre expressão de *ERG11* e, consequentemente, menor ação do fluconazol (Flowers et al., 2012).

No que diz respeito às equinocandinas, sabe-se que os mecanismos de resistência são fundamentalmente secundários, já que os primários são praticamente ausentes. Assim, os primeiros devem-se a mutações pontuais em genes que codificam (1,3) - β -glucano-sintetase, sendo que estudos clínicos evidenciam esta resistência em *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016; Spampinato & Leonardi, 2013).

A resistência concomitante entre equinocandinas e outros antifúngicos, como azóis e polienos, é controversa. Enquanto estudos afirmam que a suscetibilidade aos últimos

permanece inalterada, outros corroboram que existe resistência cruzada entre azóis e equinocandinas em algumas espécies de *Candida*, como é exemplo *C. glabrata* (Alcazar-Fuoli & Mellado, 2014; Alexander et al., 2013; Murray et al., 2016).

Relativamente à anfotericina B a resistência é rara, contudo espécies como *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* podem possuir resistência intrínseca ao polieno. Por outro lado, o mecanismo de resistência de *Candida* à anfotericina B ainda não é conhecido, contudo acredita-se estar relacionado mutações em genes como *ERG2*, *ERG3* e *ERG6*, que codificam, respetivamente, as enzimas C-8 esterol isomerase, C-5 estereol desaturase e C-24 esterol metiltransferase, respetivamente (Murray et al., 2016; Spampinato & Leonardi, 2013; Taff et al., 2013).

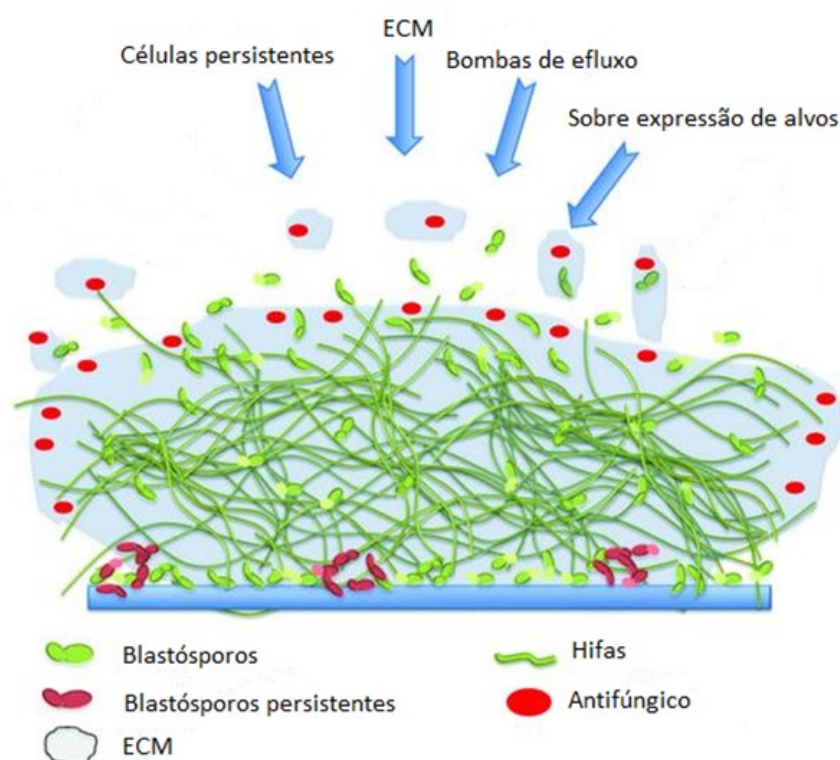


Figura 14 Mecanismos de resistência do biofilme formado por *C. albicans*. (Adaptado de, Ramage et al., 2012).

5.2 Terapêuticas Alternativas

5.2.1 Probióticos

Tanto probióticos como os prebióticos podem ser utilizados quer na prevenção, quer no tratamento, de infeções causadas por biofilmes polimicrobianos de *Candida*, como é exemplo a candidose oral. Assim, os *Lactobacillus* podem ser usados neste âmbito, uma vez que reduzem a colonização das leveduras. Contudo, ainda não existem evidências científicas sobre a utilização de probióticos como terapêutica prolongada, sendo necessários mais estudos neste contexto (Allison et al., 2016; D. W. Williams et al., 2011).

5.2.2 Produtos Naturais

Os produtos naturais têm sido amplamente estudados, como possíveis alternativas na erradicação do biofilme por *Candida* e, dado aos resultados obtidos, apresentam-se como estratégias promissoras neste âmbito. Dentro dos compostos obtidos a partir de plantas, destacam-se os terpenóides, compostos fenólicos, péptidos, alcaloides e biossurfactantes. Por sua vez, os fungos e bactérias, produzem compostos como resultado do seu metabolismo primário, como proteínas, lípidos e glicolípidos, metabolitos primários, e do metabolismo secundário como os alcaloides e terpenos. Existem ainda os produtos naturais obtidos através de animais, inclusive, do Homem, tais como péptidos e proteínas. Todos estes produtos obtidos por fontes diferentes apresentam-se como estratégias alternativas (Girardot & Imbert, 2016).

A tabela 6 pretende representar um conjunto de estudos realizados, sobre vários compostos obtidos de diferentes produtos naturais, face às diferentes fases de desenvolvimento do biofilme por *Candida*, com o intuito de transmitir uma visão ampla do que já foi estudado.

A utilização destes produtos contra infeções microbiológicas deve-se às suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, mas também por apresentarem menos reações adversas. Contudo, uma das desvantagens é o facto de ainda não existirem estudo sobre a toxicidade destes compostos. Não obstante, continua a ser uma terapêutica aliciante (Nett, 2014; Petrović et al., 2014).

Tabela 6 Ação de produtos naturais sobre diferentes fases do desenvolvimento do biofilme por *Candida*. A- adesão; M- maturação; D- dispersão; +- com atividade em determinada fase do biofilme (Adaptado de, Girardot & Imbert, 2016).

Produtos	Grupos químicos ou funcionais		Desenvolvimento do biofilme			Espécies
			A e/ou M	M	D	
Plantas	Terpenóides	Óleos essenciais/terpenos	+	+		<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. orthopsilosis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>
		Saponinas	+	+		<i>C. albicans</i>
	Compostos fenólicos	Taninos	+	+	+	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>
		Flavonoides	+	+		<i>C. albicans</i>
	Péptidos	-	+	+		<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>
	Alcaloides	-	+	+		<i>C. albicans</i>
	Biossurfactantes	-	+			<i>C. albicans</i>
Homem	Péptidos/proteínas	-	+	+		<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>
Animais	Anticorpos (proteínas)	-	+			<i>C. albicans</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i>

- **Extratos de plantas e Óleos essenciais**

De acordo com a literatura, os compostos obtidos através de plantas, como são exemplo as saponinas, alcaloides, péptidos e proteínas, constituem a maior fonte de compostos ativos contra biofilmes de fungos (Girardot & Imbert, 2016; Spampinato & Leonardi, 2013).

Assim, plantas e extratos de óleos essenciais têm sido vastamente utilizados como compostos antifúngicos contra *C. albicans*, constituindo uma alternativa em infecções como por exemplo estomatite protética (Petrović et al., 2014).

Estudos com terpenóides afirmam a sua eficácia na inibição das formas leveduriformes e filamentosas de *C. albicans* e, revelam-se auspiciosos na terapêutica conjugada com fluconazol, aumentando o efeito deste (Spampinato & Leonardi, 2013).

Um estudo avaliou as propriedades antifúngicas de óxido de etileno, óleo essencial da planta *Cymbopogon nardus* (L.), conhecida como citronela, em biofilmes por *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Concluiu-se que este óleo foi capaz de inibir maioritariamente o biofilme por *C. albicans*, contudo também inibiu a formação do biofilme por *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Apesar de não existirem estudos complementares na literatura sobre a ação deste óleo, os resultados parecem apelativos na erradicação da maturação do biofilme (Toledo et al., 2016).

Outro óleo essencial, um hidrato de carbono derivado do ácido fúlvico (CHD-FA) revelou ter eficácia no biofilme oral por *C. albicans*. Além disto, mantém atividade contra outras espécies de *Candida* com resistência a outras terapêuticas (Nett, 2014).

- **Péptidos**

Os péptidos sintéticos possuem atividade antimicrobiana contra uma variedade de microrganismos, e podem exercer a sua ação terapêutica em diferentes fases do desenvolvimento do biofilme (Bujdáková, 2016).

Um estudo realizado com KSL, decapeptido α -helicoidal, e o homólogo KSL-W, avaliou a sua ação em biofilmes por *Candida*. Concluiu-se que KSL-W foi capaz de diminuir a formação do biofilme de *C. albicans*, bem como suspender a sua maturação (Bujdáková, 2016).

Por sua vez, estudos com o péptido ApoEdpL-W, confirmam a sua capacidade em inibir a formação inicial de biofilmes por *C. albicans* e associados a dispositivos médicos, nomeadamente, quando estes são revestidos por poliestireno. Contudo, ApoEdpL-W não foi capaz de inibir a fase de maturação (Rossignol, Kelly, Dobson, & D'Enfert, 2011).

Estudos afirmam que, OSIP108, um decapeptido extraído da planta *Arabidopsis thaliana*, é capaz de inibir a inibição do biofilme por *C. albicans*. Para além disto, aumenta a ação de caspofungina e anfotericina B, logo possui uma ação sinérgica na

erradicação da fase madura do biofilme por *C. albicans*. Neste estudo foi também avaliada a toxicidade deste composto e concluiu-se que não era tóxico (Delattin et al., 2014).

5.2.3 Terapêutica Fotodinâmica

A terapêutica fotodinâmica (TFD) foi descrita em 1960, e constitui uma alternativa às terapêuticas convencionais antifúngicas no biofilme por *Candida*. Atualmente é utilizada em oncologia mas também em infecções superficiais e sistêmicas, provocadas por fungos, bactérias, vírus e protozoários (Bujdaková, 2016; Pražmo, Mielczarek, Kwaśny, & Łapiński, 2016; S. Singh et al., 2015).

O mecanismo de ação de TFD tem por base uma reação fotodinâmica citotóxica, capaz de matar as células do microrganismo. Para que esta reação ocorra é necessário que exista um fotossensibilizador o (FS), uma fonte de luz e de oxigénio. Desta forma, o FS é administrado ao doente, posteriormente, ocorre a emissão de um comprimento de onda específico que ativa FS e, por fim, ocorre uma reação fotoquímica que compreende reações de fase I e II. Neste último passo, ocorre a destruição seletiva dos microrganismos, por formação de espécies de oxigénio reativas (reações de fase I) e, pela formação de produtos oxigenados (reações de fase II) (Azizi, Amirzadeh, Rezai, Lawaf, & Rahimi, 2016; Pražmo et al., 2016; M. P. Silva et al., 2016).

O FS, substância química e principal da TFD, pode ser administrado por via tópica ou sistémica, quer esteja na forma quimicamente ativa ou inativa, no caso de ser administrado um precursor. Os principais agentes FS estão agrupados consoante a sua estrutura química e origem, e são tidos como exemplo: corantes de fenotiazinas, azul de toluidina e azul de metileno; corantes de ftalocianina como a naftalocianina e porfirinas, como o ácido-5-aminolevulínico (ALA), precursor da protoporfirina IX (Gursoy et al., 2013; Pražmo et al., 2016).

Vários estudos *in vitro* evidenciam a atividade de azul metileno, toluidina azul, porfirinas e ftalocianinas tanto em células planctónicas como em sésseis de *C. albicans* (Soukos & Goodson, 2011).

Um estudo *in vitro* testou a eficácia de TFD num biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* e concluiu que a terapêutica foi eficaz na redução destes. Contudo, aquando da resistência ao fluconazol, TFD revelou ter menor eficácia (Gursoy et al., 2013).

Outro estudo, comparou a eficácia de dois fotossensibilizadores, nomeadamente, azul de metileno e protoporfirina IX, utilizando uma fonte de luz vermelha, num biofilme de *C. albicans* sobre uma resina acrílica. Concluiu-se que houve uma diminuição de 96% do biofilme quando exposto ao azul metileno, imediatamente após 10 min e sem manifestar toxicidade (Sousa et al., 2016).

Por conseguinte, a TFD pode ser utilizada no tratamento de infeções orais, em conjunto com outras terapêuticas ou em monoterapia, pois apresenta a vantagem de ser uma terapêutica económica, sem resistências e toxicidade associadas. Assim, a título de exemplo, estudos têm descrito a sua eficácia na candidose oral recorrente em doentes VIH/SIDA (Gursoy et al., 2013; Soukos & Goodson, 2011).

6 CONCLUSÃO

O microbioma humano oral é bastante complexo, sendo que a cada estrutura da cavidade oral corresponde um microbioma específico, variável ao longo do tempo e de indivíduo para indivíduo. Apesar do microbioma humano oral ser majoritariamente constituído por bactérias, os fungos também fazem parte da sua constituição, sendo género *Candida* o mais relevante.

Assim, as leveduras do género *Candida* são microrganismos comensais do microbioma oral da maioria da população em geral, entre 30-55% dos adultos e 45%-65% dos bebés. Na cavidade oral, a espécie *albicans* é a mais frequente, porém espécies não-*albicans* como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. rugosa* e *C. dubliniensis* também são frequentemente isoladas de indivíduos saudáveis, sendo as primeiras as mais prevalentes.

O equilíbrio entre *Candida* e o hospedeiro contribui para a manutenção de um estado saudável, mantido pelas diversas funções que a microflora oral desempenha através, por exemplo, da saliva, interações sinérgicas entre microrganismos, pH, humidade, potencial de oxi-redução e temperatura. Para além disto, o sistema imunitário oral, inato e adquirido, contribui igualmente para a homeostase oral, bem como mecanismo de defesa face a microrganismos patogénicos.

A passagem de *Candida* da forma comensal à patogénica deve-se, essencialmente, ao seu oportunismo, criado pelos fatores de predisposição do hospedeiro, mas também aos seus fatores de virulência, tais como: adesão, dimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas e formação do biofilme. Desta forma, *Candida* é capaz de causar diversas infeções, tanto superficiais como sistémicas.

A candidose oral é a infeção fúngica oral mais frequente e está associada à formação do biofilme por *C. albicans*, contudo espécies não-*albicans* como *C. glabrata* e *C. tropicalis* também têm sido descritas em indivíduos com CO. Não obstante, as cáries, estomatite protética, infeções endodônticas, periodontite e a queilite angular são infeções que parecem estar igualmente associadas à formação de biofilmes polimicrobianos por este género. Importa ainda ressaltar, que a capacidade do biofilme por *Candida*, em formar-se sobre superfícies abióticas orais tais como: próteses implantes e aparelhos ortodônticos também está na origem de diversas infeções, tanto perda de funcionalidade

do dispositivo médico como por este servir de possível reservatório para o desenvolvimento contínuo de infecções.

A terapêutica consiste na erradicação completa do biofilme e, na candidose oral, os antifúngicos tópicos em doentes com candidoses não complicadas e que não tem doenças graves associadas, as soluções orais de anfotericina B e nistatina apresentam um bom prognóstico. Todavia, apesar do arsenal de antifúngicos disponíveis, a terapêutica antifúngica nem é eficaz, motivo pelo qual têm sido desenvolvidos diversos estudos, que apresentam resultados positivos com terapêuticas que recorrem à utilização de probióticos, produtos naturais e à terapêutica fotodinâmica.

Em suma, a capacidade destas leveduras em formar um biofilme oral acarreta várias implicações clínicas tanto orais como sistémicas, devido à possibilidade de disseminação a partir da cavidade oral. Face ao exposto, esta temática apresenta-se como uma preocupação emergente, devido ao aumento de hospedeiros com fatores predisponentes, bem como ao aumento significativo da resistência aos antifúngicos. Como tal torna-se imprescindível apostar na instituição de terapêuticas alternativas, que se apresentam viáveis, bastante promissoras e viabilizam a diminuição das infecções inerentes à formação do biofilme oral por *Candida*.

7 BIBLIOGRAFIA

- Alcazar-Fuoli, L., & Mellado, E. (2014). Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British Journal of Haematology*, *166*(4), 471–484. <http://doi.org/10.1111/bjh.12896>
- Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jimenez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., ... Pfaller, M. A. (2013). Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, *56*(12), 1724–1732. <http://doi.org/10.1093/cid/cit136>
- Allison, D. L., Willems, H. M. E., Jayatilake, J. A. M. S., Bruno, V. M., Peters, B. M., & Shirtliff, M. E. (2016). *Candida*–Bacteria Interactions: Their Impact on Human Disease. *Microbiology Spectrum*, *4*(2), VMBF-0030-2016. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0030-2016>.
- Avila, M., Ojcius, D. M., & Yilmaz, Ö. (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA and Cell Biology*, *28*(8), 405–411. <http://doi.org/10.1089/dna.2009.0874>
- Azizi, A., Amirzadeh, Z., Rezai, M., Lawaf, S., & Rahimi, A. (2016). Effect of photodynamic therapy with two photosensitizers on *Candida albicans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *158*, 267–273. <http://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.027>
- Barriuso, J. (2015). Quorum sensing mechanisms in fungi. *AIMS Microbiology*, *1*(1), 37–47. <http://doi.org/10.3934/microbiol.2015.1.37>
- Belizário, J. E., & Napolitano, M. (2015). Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Frontiers in Microbiology*, *6*(1050), 1–16. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01050>
- Bruckner, D. A., & Deak, E. (2014). Classification of fungi. In *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases* (7th ed., pp. 2702–2704). Copyright.
- Brunke, S., Mogavero, S., Kasper, L., & Hube, B. (2016). Virulence factors in fungal pathogens of man. *Current Opinion in Microbiology*, *32*, 89–95. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.010>
- Bujdáková, H. (2016). Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiology*, *11*(2), 235–251.

- <http://doi.org/10.2217/fmb.15.139>
- Canabarro, A., Valle, C., Farias, M. R., Santos, F. B., Lazera, M., & Wanke, B. (2013). Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, *48*(4), 428–432. <http://doi.org/10.1111/jre.12022>
- Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Baret, P. V., Keniya, M. V., ... Monk, B. C. (2009). Efflux-Mediated Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(2), 291–321. <http://doi.org/10.1128/CMR.00051-08>
- Clark, N., Grim, S., & Lynch, J. (2015). Posaconazole: Use in the Prophylaxis and Treatment of Fungal Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, *36*, 767–785. <http://doi.org/10.1055/s-0035-1562902>
- Costa, A. V. (2014). Resposta imunológica a agentes infecciosos. In *Microbiologia Médica - Volume 1* (pp. 129–143). Lisboa: Lidel.
- Costalonga, M., & Herzberg, M. C. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, *162*, 22–38. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>
- Cruvinel, W. de M., Júnior, D. M., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. de, Silva, N. P. da S., & Andrade, L. E. C. (2010). Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol*, *50*(4), 434–461.
- Darwazeh, A. M. G., & Darwazeh, T. A. (2014). What Makes Oral Candidiasis Recurrent Infection? A Clinical View. *Journal of Mycology*, 1–5. <http://doi.org/10.1155/2014/758394>
- Delattin, N., De Brucker, K., Craik, D. J., Cheneval, O., Frohlich, M., Veber, M., ... Thevissen, K. (2014). Plant-Derived Decapeptide OSIP108 Interferes with *Candida albicans* Biofilm Formation without Affecting Cell Viability. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(5), 2647–2656. <http://doi.org/10.1128/AAC.01274-13>
- Desai, J. V., Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *4*(10), a019729. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a019729>
- 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. <http://doi.org/10.1128/JB.00542-10>
- Dharmgaye, S., Qu, Y., & Peleg, A. Y. (2016). Polymicrobial infections involving

- clinically relevant Gram-negative bacteria and fungi. *Cellular Microbiology*, 1–7. <http://doi.org/10.1111/cmi.12674>
- Douglas, L. J. (2003). Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30–36. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00002-1](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00002-1)
- Emeterio, J. P. S., Lara, T. E., & Andrés, G. Q. (2002). Características generales de los hongos. Estructura, clasificación y reproducción. In *Microbiología Oral* (2ª, pp. 221–229). Madrid: McGRAW-HILL.
- Fanning, S., & Mitchell, A. P. (2012). Fungal Biofilms. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002585. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>
- Feller, L., Khammissa, R. A. G., Chandran, R., Altini, M., & Lemmer, J. (2014). Oral candidosis in relation to oral immunity. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 43, 563–569. <http://doi.org/10.1111/jop.12120>
- Filoche, S., Wong, L., & Sissons, C. . H. (2010). Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), 8–18. <http://doi.org/10.1177/0022034509351812>
- Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. (2011). Genetic Control of Candida Albicans Biofilm Development. *National Review of Microbiology*, 9(2), 109–118. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2475>
- Flemmig, T. F., & Beikler, T. (2011). Control of oral biofilms. *Periodontology 2000*, 55(1), 9–15. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00383.x>
- Flowers, S. A., Barker, K. S., Berkow, E. L., Toner, G., Chadwick, S. G., Gyax, S. E., ... Rogers, P. D. (2012). Gain-of-Function Mutations in UPC2 Are a Frequent Cause of ERG11 Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of Candida albicans. *Eukaryotic Cell*, 11(10), 1289–1299. <http://doi.org/10.1128/EC.00215-12>
- Freiberg, J. A., Hänsch, G. M., Peters, B. M., Shirliff, M. E., Krom, B. P., Filler, S. G., ... Jabra-Rizk, M. A. (2015). Systemic Staphylococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology*, 161(1), 168–181. <http://doi.org/10.1099/mic.0.083485-0>
- Freitas, G. (2010). Fungos. In *Microbiologia* (pp. 146–165). Lisboa: Lidel.
- Freitas, G., & Frade, J. P. (2014). Agentes Antifúngicos. In *Microbiologia médica - Volume 2* (pp. 291–308). Lisboa: Lidel.
- García-Cuesta, C., Sarrion-Perez, M., & Bagan, J. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 6(5), e576–e582. <http://doi.org/10.4317/jced.51798>

- Geraldino, T. H., Maris, T., Soares, P., Roberta, C., Veronez, N., Micheletti, P., ... Felipe, I. (2012). Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*. *Biosaúde*, *14*(1), 26–41.
- 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. <http://doi.org/10.1590/S1676-24442010000300009>
- Girardot, M., & Imbert, C. (2016). Natural Sources as Innovative Solutions Against Fungal Biofilms. In *Fungal Biofilms and related infections* (pp. 105–125). Copyright. http://doi.org/10.1007/5584_2016_12
- Gonçalves, T. (2014). Princípios gerais de micologia: Estrutura e multiplicação dos fungos. In *Microbiologia Médica - Volume 1* (pp. 47–51). Lisboa: Lidel.
- Guinea, J. (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, *20*(6), 5–10. <http://doi.org/10.1111/1469-0691.12539>
- Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, *18*, 310–321. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, *198*(1), 1–15. <http://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Gursoy, H., Ozcakir-Tomruk, C., Tanalp, J., & Yılmaz, S. (2013). Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clinical Oral Investigations*, *17*(4), 1113–1125. <http://doi.org/10.1007/s00784-012-0845-7>
- Han, T.-L., Cannon, R. D., & Villas-Bôas, S. G. (2011). The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genetics and Biology*, *48*(8), 747–763. <http://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.04.002>
- Hanson, B. M., & Weinstock, G. M. (2016). The importance of the microbiome in epidemiologic research. *Annals of Epidemiology*, *26*, 301–305. <http://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.03.008>
- Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2011). Importance of *Candida*–bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in Microbiology*, *19*(11), 557–563. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2011.07.004>
- Henriques, M., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2006). *Candida* Species Adhesion to Oral Epithelium: Factors Involved and Experimental Methodology Used. *Critical*

- Reviews in Microbiology*, 32(4), 217–226.
<http://doi.org/10.1080/10408410601023524>
- Ion, I. R., & Chetruș, V. (2013). Dental Plaque-Classification, Formation, and Identification. *International Journal of Medical Dentistry*, 3(2), 139–144.
- Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. (2012). Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(1), 85–93. <http://doi.org/10.1586/eri.11.152>
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2005). Imunidade mediada por células T. In *Imunobiologia - O sistema imune na saúde e na doença* (6ª edição, pp. 319–366). Santana: Artmed.
- Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). Candida albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiology*, 1–15. <http://doi.org/10.5402/2012/538694>
- Kang, J., He, Y., Hetzl, D., Jiang, H. Q., Jun, M. K., Jun, M. S., ... Cirillo, N. (2016). A Candida Assessment of the Link between Oral Candida Containing Biofilms and Oral Cancer. *Advances in Microbiology*, 6, 115–123.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211–224.
- Kauffman, C. (2016). Candidiasis. In L. Goldman & A. Shacfer (Eds.), *Goldman-cecil medicine* (25th ed., pp. 2079–2083). Philadelphia: Copyright.
- Kawai, A., Yamagishi, Y., & Mikamo, H. (2015). In vitro efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-albicans Candida species biofilms. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 21(9), 647–653. <http://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.05.007>
- Kiyoura, Y., & Tamai, R. (2015). Innate immunity to Candida albicans. *Japanese Dental Science*, 51, 59–64. <http://doi.org/10.1016/j.jdsr.2014.12.001>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 471–480. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Kragelund, C., Reibel, J., & Pedersen, A. M. L. (2016). Management of Patients with Oral Candidiasis. In *Oral Infections and General Health* (pp. 137–144). Switzerland: Springer International Publishing. http://doi.org/10.1007/978-3-319-25091-5_13

- Krom, B. P., Kidwai, S., & Cate, J. M. ten. (2014). *Candida* and Other Fungal Species: Forgotten Players of Healthy Oral Microbiota. *Journal of Dental Research*, *93*(5), 445–451. <http://doi.org/10.1177/0022034514521814>
- Krom, B. P., Levy, N., Meijler, M. M., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Farnesol and *Candida albicans*: Quorum Sensing or Not Quorum Sensing? *Israel Journal of Chemistry*, *56*, 295–301. <http://doi.org/10.1002/ijch.201500025>
- Kullberg, B.-J., Veerdonk, F. van de, & Netea, M. G. (2014). Immunotherapy: a potential adjunctive treatment for fungal infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *27*(6), 511–516. <http://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000105>
- Lastauskienė, E., Čepulytė, J., Girkontaitė, I., & Zinkevičienė, A. (2015). Phenotypic Switching of *Candida guilliermondii* is Associated with Pseudohyphae Formation and Antifungal Resistance. *Mycopathologia*, *179*, 205–211. <http://doi.org/10.1007/s11046-014-9844-3>
- Li, W., Yu, D., Gao, S., Lin, J., Chen, Z., & Zhao, W. (2014). Role of *Candida Albicans*-secreted aspartyl proteinases (Saps) in severe early childhood caries. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(6), 10766–10779. <http://doi.org/10.3390/ijms150610766>
- Liu, Y., & Filler, S. G. (2011). *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic Cell*, *10*(2), 168–173. <http://doi.org/10.1128/EC.00279-10>
- López-Martínez, R. (2010). Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology*, *28*(2), 178–184. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.014>
- Lyu, X., Zhao, C., Hua, H., & Yan, Z. (2016). Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Design, Development and Therapy*, (10), 1161–1171. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>
- Maddi, A., & Scannapieco, F. A. (2013). Oral biofilms, oral and periodontal infections, and systemic disease. *American Journal of Dentistry*, *26*(5), 249–254.
- Marsh, P. D., Moter, A., & Devine, D. A. (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000*, *55*(1), 16–35. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x>
- Marsh, P. D., & Nyvad, B. (2005). A microbiota oral e biofilmes formados sobre os dentes. In *Cárie Dentária - A Doença e o seu Tratamento Clínico* (pp. 29–49). São Paulo: Livraria Santos.
- Marsh, P., & Martin, M. V. (2005a). A microflora oral na saúde e na doença. In *Microbiologia Oral* (4ª edição, pp. 1–4). São Paulo: Livraria Santos.

- Marsh, P., & Martin, M. V. (2005b). Aquisição, aderência, distribuição e metabolismo da microflora oral. In *Microbiologia Oral* (4ª edição, pp. 36–57). São Paulo: Livraria Santos.
- Marsh, P., & Martin, M. V. (2005c). Infecções orais fúngicas. In *Microbiologia Oral* (4ª edição, pp. 153–162). São Paulo: Livraria Santos.
- Marsh, P., & Martin, M. V. (2005d). Placa dentária. In *Microbiologia Oral* (4ª edição, pp. 55–81). São Paulo: Livraria Santos.
- Martin, R., Wächter, B., Schaller, M., Wilson, D., & Hube, B. (2011). Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 417–422. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.009>
- Martinez, L. R., & Fries, B. C. (2010). Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Current Fungal Infection Reports*, 4(4), 266–275. <http://doi.org/10.1007/s12281-010-0035-5>
- Mathé, L., & Van Dijck, P. (2013). Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59(4), 251–264. <http://doi.org/10.1007/s00294-013-0400-3>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119–128. <http://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mendes, J. (2012). Abordagem Diagnóstica e Terapêutica da Candidíase Invasiva em Doentes Adultos Não-Neutropênicos Internados em Unidades de Cuidados Intensivos. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 8(2), 76–84.
- Metwalli, K. H., Khan, S. A., Krom, B. P., & Jabra-Rizk, M. A. (2013). *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS Pathogens*, 9(10), 1–5. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>
- Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in Dermatology*, 34, 487–494. <http://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
- Miranda, T. T., Vianna, C. R., Rodrigues, L., Rosa, C. A., & Corrêa, A. (2015). Differential Proteinase Patterns among *Candida albicans* Strains Isolated from Root Canal and Lingual Dorsum: Possible Roles in Periapical Disease. *Journal of Endodontics*, 41(6), 841–845. <http://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.012>
- Modrezewka, B., & Kurnatowski, P. (2015). Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Annals of Parasitology*, 61(1), 3–9.
- Modrzewska, B., Kurnatowski, P., & Khalid, K. (2016). Comparison of proteolytic

- activity of *Candida* sp. strains depending on their origin. *Journal de Mycologie Médicale*, 26, 138–147. <http://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.01.005>
- Moralez, A. T. P., França, E. J. G., Furlaneto-Maia, L., Quesada, R. M. B., & Furlaneto, M. C. (2014). Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. *Medical Mycology*, 52(1), 1–9. <http://doi.org/10.3109/13693786.2013.825822>
- Muadcheingka, T., & Tantivitayakul, P. (2015). Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in oral candidiasis patients: Correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 894–901. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.002>
- Mukherjee, P. K., & Chandra, J. (2015). *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiology Spectrum*, 3(4), 1–24. <http://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0020-2015>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). Antifungal Agents. In *Medical Microbiology* (8th ed., p. 595–606.e1). Copyright.
- Nett, J. E. (2014). Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 12(3), 375–382. <http://doi.org/10.1586/14787210.2014.885838>
- Ng, K. P., Kuan, C. S., Kaur, H., Na, S. L., Atiya, N., & Velayuthan, R. D. (2015). *Candida* species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. *Tropical Medicine & International Health*, 20(11), 1447–1453. <http://doi.org/10.1111/tmi.12577>
- Nobbs, A. H., & Jenkinson, H. F. (2015). Interkingdom networking within the oral microbiome. *Microbes and Infection*, 17(7), 484–492. <http://doi.org/doi:10.1016/j.micinf.2015.03.008>
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual Review of Microbiology*, 69, 71–92. <http://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
- Noumi, E., Snoussi, M., Hentati, H., Mahdouani, K., del Castillo, L., Valentin, E., ... Bakhrouf, A. (2010). Adhesive Properties and Hydrolytic Enzymes of Oral *Candida albicans* Strains. *Mycopathologia*, 169(4), 269–278. <http://doi.org/10.1007/s11046-009-9259-8>
- O'Donnell, L. E., Millhouse, E., Sherry, L., Kean, R., Malcolm, J., Nile, C. J., & Ramage, G. (2015). Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS*

- Yeast Research*, 15(7), fov077. <http://doi.org/10.1093/femsyr/fov077>
- Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Spatial and temporal variability of the human microbiota. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(4), 5–7. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03861.x>
- Parslow, T. G., & Bainston, D. F. (2004). Imunidade Inata. In *Imunologia Médica* (10^a edição, pp. 18–31). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 6(1391), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., O'May, G. A., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2012). Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 193–213. <http://doi.org/10.1128/CMR.00013-11>
- Petrović, M., Kostić, M., Kostić, M., Krunić, N., Igić, M., Pešić, Z., & Otašević, S. (2014). Therapeutic alternatives of natural compounds in treatment of candida associated denture stomatitis. *Acta Medica Medianae*, 53(1), 73–79. <http://doi.org/10.5633/amm.2014.0113>
- Pierce, C. G., Srinivasan, A., Uppuluri, P., Ramasubramanian, A. K., & López-Ribot, J. L. (2013). Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5), 726–730. <http://doi.org/10.1016/j.coph.2013.08.008>
- Prażmo, E., Mielczarek, A., Kwaśny, M., & Łapiński, M. (2016). Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 25(4), 799–807. <http://doi.org/10.17219/acem/32488>
- Ramage, G., Martínez, J. P., & López-Ribot, J. L. (2006). Candida biofilms on implanted biomaterials: A clinically significant problem. *FEMS Yeast Research*, 6, 979–986. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00117.x>
- Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*, 1–14. <http://doi.org/10.1155/2012/528521>
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2005). Candida Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633–638. <http://doi.org/10.1128/EC.4.4.633-638.2005>
- Rang, H., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2016). Antifungal drugs. In

- Rang&Dale's Pharmacology* (8th ed., pp. 653–657). Copyright.
- Rautemaa, R., & Ramage, G. (2011). Oral candidosis – Clinical challenges of a biofilm disease. *Critical Reviews in Microbiology*, 37(4), 328–336. <http://doi.org/10.3109/1040841X.2011.585606>
- Reddy, P. M. (2011). Control and Prevention of Biofilm In Dental Office. *Indian Journal Of Dental Advancements*, 3(2), 512–520.
- Richard, P. (2013). Fungal infections. In *Emergency Medicine* (2nd ed., pp. 1483–1490). Philadelphia: Copyright.
- Richardson, J. P., & Moyes, D. L. (2015). Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*, 6(4), 327–337. <http://doi.org/10.1080/21505594.2015.1004977>
- Rossignol, T., Kelly, B., Dobson, C., & D'Enfert, C. (2011). Endocytosis-Mediated Vacuolar Accumulation of the Human ApoE Apolipoprotein-Derived ApoEdpL-W Antimicrobial Peptide Contributes to Its Antifungal Activity in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4670–4681. <http://doi.org/10.1128/AAC.00319-11>
- Sandhu, N. (2014). Chronic Mucocutaneous Candidiasis. Disponível em 14 de agosto 2016, consultado em <http://emedicine.medscape.com/article/1091928-overview#a5>
- Sanitá, P. V., Zago, C. E., Mima, E. G. de O., 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* species isolated from patients with oral candidiasis with or without diabetes. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 118(1), 84–91. <http://doi.org/10.1016/j.oooo.2014.03.020>
- Santana, D. P., Ribeiro, E. L., Menezes, A. C. S., & Naves, P. L. F. (2013). Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Revista De Ciências Médicas E Biológicas*, 12(2), 229–233.
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. J. S. (2013). *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10–24. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Scannapieco, F. A. (2013). The Oral Microbiome: Its Role in Health and in Oral and Systemic Infections. *Clinical Microbiology Newsletter*, 35(20), 163–169. <http://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2013.09.003>
- Scully, C. (2014). Mucosal candidiasis. Disponível em 14 de agosto 2016, consultado em

- <http://emedicine.medscape.com/article/1075227-overview#showall>
- Seabra, C. L. (2011). *Estudo de factores de virulência de culturas mistas de Candida albicans e Candida parapsilosis após adesão a uma superfície abiótica*. Universidade do Minho - Escola de Engenharia.
- Shi, B., Chang, M., Martin, J., Mitreva, M., Lux, R., Klokkevold, P., ... Li, H. (2015). Dynamic Changes in the Subgingival Microbiome and Their Potential for Diagnosis and Prognosis of Periodontitis. *mBio*, 6(1), e01926-14. <http://doi.org/10.1128/mBio.01926-14>
- Silva, M. P., Santos, T. A. dos, Barros, P. P. de, Camargo Ribeiro, F. de, Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2016). Action of antimicrobial photodynamic therapy on heterotypic biofilm: *Candida albicans* and *Bacillus atrophaeus*. *Lasers in Medical Science*, 31(4), 605–610. <http://doi.org/10.1007/s10103-016-1876-0>
- Silva, N. C., Nery, J. M., & Dias, A. L. T. (2014). Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses*, 57(1), 1–11. <http://doi.org/10.1111/myc.12095>
- Silva, P. C. (2014). Flora microbiana comensal humana. In *Microbiologia Médica - Volume 1* (pp. 60–65). Lisboa: Lidel.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2011). Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 19(5), 241–247. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2011.02.003>
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 288–305. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
- Simões, R. J., Fonseca, P., & Figueiral, M. H. (2013). Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. *Odontologia Clínico-Ciêntifica*, 12(4), 19–22.
- Singh, A., Verma, R., Murari, A., & Agrawal, A. (2014). Oral candidiasis: An overview. Disponível em 14 de agosto 2016, consultado em <http://www.jomfp.in/article.asp?issn=0973-029X;year=2014;volume=18;issue=4;spage=81;epage=85;aulast=Singh>
- Singh, S., Sharma, P., & Shreehari, A. K. (2015). Dental Plaque Biofilm: An Invisible Terror in the Oral Cavity. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (pp. 422–428). Formatex.
- Soll, D. R. (2014). The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis

- of *Candida albicans*. *Journal of Oral Microbiology*, 6, 1–13. <http://doi.org/10.3402/jom.v6.22993>
- Soukos, N. S., & Goodson, J. M. (2011). Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontology 2000*, 55(1), 143–166. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00346.x>
- Sousa, A. S., Prates, R. A., de Santi, M. E. S. O., Lopes, R. G., Bussadori, S. K., Ferreira, L. R., & Deana, A. M. (2016). Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: Influence of the radiant energy and photosensitizer charge. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 14, 111–114. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.03.004>
- Spampinato, C., & Leonardi, D. (2013). *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*, 1–13. <http://doi.org/10.1155/2013/204237>
- Taff, H. T., Mitchell, K. F., Edward, J. A., & Andes, D. R. (2013). Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, 8(10), 1325–1337. <http://doi.org/10.2217/fmb.13.101>
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., & Nakonieczna, J. (2013). Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. *BioMed Research International*, 1–13. <http://doi.org/10.1155/2013/150653>
- Thompson, D. S., Carlisle, P. L., & Kadosh, D. (2011). Coevolution of Morphology and Virulence in *Candida* Species. *Eukaryotic Cell*, 10(9), 1173–1182. <http://doi.org/10.1128/EC.05085-11>
- Thuy, D., Devine, D., & Marsh, P. D. (2013). Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry*, 5, 11. <http://doi.org/10.2147/CCIDE.S31005>
- Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., & Presterl, E. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), 199–204. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02076.x>
- Toledo, L., Ramos, M., Spósito, L., Castilho, E., Pavan, F., Lopes, É., ... Almeida, M. (2016). Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–16. <http://doi.org/10.3390/ijms17081252>
- Urenã, J. L., García, P. B., & López-Dóriga, C. R.-A. (2002). Microbiología de las placas dentales. In *Microbiología Oral* (2ª edición, pp. 541–559). Madrid: McGRAW-

HILL.

- Ureña, J., Mondelo, J., Cubillos, S., & Estévez, M. (2002). Determinantes ecológicos orales. In *Microbiología Oral* (2ª edición, pp. 527–539). Madrid: McGRAW-HILL.
- Ureña, J., Rodríguez, M., Cabanillas, M., & Alonso, L. (2002). Composición y ecología de la microbiota oral. In *Microbiología Oral* (2ª edición, pp. 515–525). Madrid: McGRAW-HILL.
- Vasudevan, R. (2014). Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(3), 1–16. <http://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00014>
- Wade, W. G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research*, 69, 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>
- Walraven, C. J., & Lee, S. A. (2013). Antifungal Lock Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 1–8. <http://doi.org/10.1128/AAC.01351-12>
- Wang, Y. (2015). Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*, 6(4), 307–308. <http://doi.org/10.1080/21505594.2014.1000752>
- Wecker, L., Crespo, L. M., Dunaway, G., Faingola, C., & Waths, S. (2010). Antifungal Agents. In *Brody's Human Pharmacology* (5th ed., pp. 583–592). Copyright.
- Whibley, N., & Gaffen, S. L. (2015). Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. *Cytokine*, 76(1), 42–52. <http://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.07.025>
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3, 1–11. <http://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>
- Williams, D. W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, M. A. O. (2011). *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55, 250–265. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00338.x>
- Wongsuk, T., Pumeesat, P., & Luplertlop, N. (2016). Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*, 56(5), 440–447. <http://doi.org/10.1002/jobm.201500759>
- Wüthrich, M., Deepe, G. S., & Klein, B. (2012). Adaptive Immunity to Fungi. *Annual Review of Immunology*, 30, 115–148. <http://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074958>
- Yang, Y.-L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 36(4), 223–228.

- 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*, 109–120. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x>
- Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., ... Andes, D. R. (2014). Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. *mBio, 5*(4), e01333-14. <http://doi.org/10.1128/mBio.01333-14>