



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

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

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

Trabalho submetido por
Catarina Apolinário Filipe Viegas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro de 2016



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

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ESTUDO DA FLORA FÚNGICA EM INDIVÍDUOS PORTADORES
DE PRÓTESE**

Trabalho submetido por
Catarina Apolinário Filipe Viegas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Guilhermina Moutinho

e coorientado por
Mestre Teresa Nascimento

outubro de 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Prof. Doutora Guilhermina Moutinho, minha orientadora, por ter aceite trabalhar comigo pela segunda vez e acompanhar-me nesta última etapa do Mestrado Integrado em Medicina Dentária.

De igual forma, agradeço à Mestre Teresa Nascimento por também ter aceite pela segunda vez orientar-me e acompanhar-me com a sua exigência nesta última etapa do Mestrado Integrado em Medicina Dentária.

Agradeço especialmente à Susana, Natacha e Sandra do Laboratório de microbiologia do ISCSEM, que por vezes dispensaram do seu tempo para me tirar dúvidas e ajudar na concretização do procedimento laboratorial deste estudo que foi um dos maiores obstáculos que ultrapassei. Obrigada!!!

Quero agradecer também ao Prof. Luís Proença pela ajuda no tratamento estatístico, sem ele, os meus resultados não teriam qualquer relevância.

Agradeço também ao Prof. Doutor José João Mendes por ter aceite que a Clínica Universitária Egas Moniz, fosse um dos meus locais de estudo, do qual, apreendi e cresci bastante. Agradeço também aos pacientes desta clínica, que fizeram que crescessem todos os dias, que tornam o meu sonho de ser Médica Dentista possível. Com eles, foi possível recolher as amostras necessárias para que o projeto chegasse ao fim. Muito Obrigado!

À minha família, Obrigado, não só pelo apoio nesta fase importante mas por me terem apoiado e acreditado sempre no meu esforço e dedicação que me faz chegar ao fim deste longo percurso! Sem vocês, era impossível chegar onde hoje cheguei!!!

Aos que chamo segunda família, que me encham o coração quando não há ninguém por perto para o fazer, quando te dizem que têm orgulho em mim e me dão um abraço tão forte que ajuda a superar qualquer barreira. E foi assim que ao longo deste percurso, foram me ensinando a crescer e a fazer acreditar, quando me parecia que este momento nunca iria chegar, afinal chegou! Por todos os momentos que passaram ao meu lado e me fizeram sorrir todos os dias, ficarão para sempre no meu coração, Um Muito Obrigado, por se terem cruzado na minha vida e por terem ficado!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcuta)

Resumo

Objetivos: Este estudo teve como objetivos: (i) avaliar a caracterização de estirpes *Candida*, isoladas na cavidade oral de participantes diabéticos e não diabéticos com próteses removíveis. (ii) estudar a caracterização patogénica associada aos isolados encontrados de *Candida* sp. através da expressão de enzimas hidrolíticas como as proteinases e as fosfolipases, comparar essa caracterização nos dois grupos de participantes diabéticos e não diabéticos.

Materiais e Métodos: Foram observados, na Clínica Universitária Egas Moniz, 70 participantes, de ambos os sexos, portadores de próteses removíveis. Destes, 36 eram diabéticos tipo 2 e 34 não diabéticos. A recolha das amostras foi realizada na área subjacente à prótese removível da cavidade oral dos pacientes através de uma zaragatoa estéril. Estas recolhas foram tratadas posteriormente no laboratório do ISCSEM, de modo, a obter os objetivos acima indicados. Os resultados obtidos foram analisados em SPSS.

Resultados: Das 70 amostras observadas foi possível identificar 2 estirpes *Candida* sp., especificamente, em que, *C. albicans*, foi a espécie mais prevalente nos dois grupos de estudo, diabético (30%) e não diabético (34,29%). Enquanto que *C. tropicalis* foi detetada numa menor percentagem, tanto no grupo diabético (5,71%) como no não diabético (7,14%). Foi possível verificar a patogenicidade nas espécies isoladas, através da expressão de enzimas extracelulares como fator de virulência. Estas enzimas foram expressas em maior percentagem no grupo diabético. *C. albicans* para além de ter sido a espécie prevalente também revelou ser a espécie com maior capacidade patogénica (72,22%).

Conclusão: Os resultados permitiram concluir que existe uma relação entre a perda dentária e a doença DM em idades mais avançadas, em que, poderão ser considerados fatores de predisposição à colonização por *Candida* sp. na cavidade oral. *C. albicans*, foi a espécie mais prevalente em ambos os grupos e apresentou a maior capacidade de expressar proteinases e fosfolipases. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0.05$) entre o grupo diabético e o grupo controlo em relação à colonização por *Candida* sp. e os seus respetivos fatores de virulência.

Palavras-Chave: *Candida* sp., Diabetes Mellitus, Prótese Dentária, Enzimas extracelulares

Abstract

Aim and objective: This study aimed to: (i) evaluate, the characterization of *Candida* strains, isolated in the oral cavity of diabetic and non-diabetic patients users of dentures. (ii) to study the pathogenic characterization associated with isolates of *Candida* sp. through the expression of hydrolytic enzymes such proteinases and phospholipases, comparing this characterization between a group of diabetic participants and non-diabetic participants.

Materials and methods: Were observed in the University Egas Moniz Clinic, 70 participants from both sexes, were observed users of removable dentures. Of these 36 were diabetic type II and 34 were non-diabetic. The collection of samples was performed from the oral cavity inherent to the denture through using a sterile swab. These samples were taken and treated in the ISCSEM microbiology laboratory, in order to obtain the goals above mentioned. The results obtained were analyzed and treated using SPSS.

Results: Of the 70 samples observed was possible to identify two *Candida* sp. strains, specifically, in which *C. albicans* was the most prevalent species in both groups, diabetic (30%) non-diabetic (34,29%). While *C. tropicalis* has been detected in a lower percentage in two groups, diabetic group (5,71%) and non-diabetic group (7,14%). It was possible to verify the pathogenicity in the isolated species through the expression of extracellular enzymes as a virulence factor. These enzymes in higher percentage in the diabetic group *C. albicans* in addition to being the prevalent species also proved to be the species with greatest pathogenic capacity (72,22%).

Final considerations: The results allowed to conclude that there is a relationship between tooth loss and DM disease at more advanced ages, in which, they may be considered predisposing factors to *Candida* sp. colonization. In the oral cavity, *C. albicans* was the most prevalent species in both groups and showed the greatest ability to express proteinases and phospholipases. However, no significant differences were found ($P > 0.05$) between the diabetic group and non-diabetic group compared to colonization by *Candida* sp. and their respective virulence factors.

Key words: *Candida* sp., Diabetes Mellitus, Dentures, extracellular enzymes

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS

Resumo	1
Abstract	3
Índice de Figuras	6
Índice de Quadros e Tabelas	8
Lista de Abreviaturas.....	10
I – INTRODUÇÃO.....	11
1.1 – Reabilitação Oral.....	11
1.2 - Caraterização da colonização do género <i>Candida</i> sp.	15
2 – Infecções associadas ao género <i>Candida</i> sp.....	27
3 – A Diabetes <i>Mellitus</i>	29
4 – Identificação laboratorial das espécies do género <i>Candida</i>	34
II - OBJETIVOS.....	38
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
1- Tipo de estudo	39
2 -Local do Estudo.....	39
3- Amostra estudada	39
4 – Procedimento utilizado na recolha de informação para a amostra	40
5 - Protocolo laboratorial.....	41
5.1. - <u>1ª Parte - Identificação de espécies <i>Candida</i> sp.</u>	41
5.2 - <u>2ª Parte - Estudo da Virulência</u>	43

IV – RESULTADOS/DISCUSSÃO.....	49
V - CONCLUSÃO	63
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
VII - ANEXOS	71

Índice de Figuras

Figura 1 – Classificação do tipo de prótese dentária	12
Figura 2 – Classificação de Kennedy (adaptado de Todescan, et al, 2003)	13
Figura 3 – Biofilme de <i>C. albicans</i> , constituído por tubos germinativos, hifas e pseudo-hifas com uma estrutura polimétrica (Adaptada de (Ramage, Saville, & Thomas, 2005).	18
Figura 4 - Fases da formação do biofilme de <i>Candida</i> numa superfície de um catéter de PVC – A) superfície do cateter com uma camada de substâncias condicionantes à adesão. B) adesão primária C) formação de micro colónias e sua adesão à superfície D) maturação das micro colónias assumindo diferentes formas como hifas, pseudo-hifas e mesmo a forma normal ovoide da levedura.(Adaptada de (Douglas, L. Julia, 2003)....	20
Figura 5– Imagens clínicas das várias Candidíases orais em estado primário – (A) Candidíase pseudomembranosa, (B) Candidíase eritematosa aguda, (C) Candidíase hiperplásica crónica, (D) Candidíase eritematosa crónica (Adaptada de (Williams & Lewis, 2011)).	28
.....	36
Figura 6 – Observação do crescimento em meio SDA (A) e à direita crescimento em meio cromogénico (B) (Meio Candi Select – BioRad) com colónias rosa (<i>C. albicans</i>) e Verdes (<i>C. tropicalis</i>).....	36
Figura 7 – Protocolo para isolamento e identificação do género <i>Candida</i> a partir de amostras da cavidade oral (Adaptado de (Costa & Candido, 2007).....	42
Figura 8 - Gráfico relativo à variável idade nos grupos não diabético e diabético.	50
Figura 9 - Gráfico de barra relativo à faixa etária <65 anos de idade nos grupos não diabético e diabético.	51

Figura 10 - Gráfico de barra relativo à faixa etária <65 anos de idade segundo a Classificação de desdentados de Kennedy.	52
Figura 11 - Gráfico de barras relativamente à classificação de desdentados de Kennedy no grupo não diabético e diabético.	53
Figura 12 - Gráfico de barras para o valor percentual para a presença de Candida sp. em participantes diabéticos e não diabéticos.	54
Figura 13 - Gráfico de barras para o valor percentual relativo à expressão de proteinases no grupo diabético e não diabético.	55
Figura 14 - Gráfico de barras para o valor percentual relativo à expressão de fosfolipases no grupo diabético e não diabético.	56
Figura 15 e 16– Observação da atividade das proteinases no meio YCB_BSA corado com a solução de revelação de amido black.	57
Figura 17 e 18 – Observação do halo da atividade das fosfolipases, sendo à direita um isolado ATCC C. albicans	58
Figura 19 - Gráfico de barras para o valor percentual para a expressão das proteinases no género Candida sp..	58
Figura 20 - Gráfico de barras para o valor percentual para a expressão de fosfolipases no género Candida sp..	59
Figura 21 - Gráfico de barras para o valor percentual relativo à patogenicidade de Candida sp.	60
Figura 22 - Gráfico de barras para o valor percentual para o grupo diabético e não diabético em relação à patogenicidade.	61

Índice de Quadros e Tabelas

Quadro 1 – Resumo dos fatores de predisposição num indivíduo à colonização de <i>Candida sp.</i>	21
Quadro 2 – Resumo dos fatores de virulência de <i>Candida sp.</i>	22
Tabela 1 – Fatores de virulência de <i>Candida sp.</i> e o seu efeito (Adaptada de (Williams & Lewis, 2011)).	24
Quadro 3 – Resumo dos fatores de adesão às próteses dentárias (Adaptado de (Pereira-Cenci et al., 2008; Zamperini. A. C. & Vergani. C. E., Pavarina. A.C. Giampaolo. E. T., 2010)).....	25
Quadro 4 – Resumo dos sinais da doença Diabetes Mellitus (Adaptado de (American Diabetes Association, 2011; Correia et al., 2015; Kasper et al., 2015)).....	31
Quadro 5 – Resumo das complicações da doença Diabetes Mellitus(American Diabetes Association, 2011; Kasper et al., 2015)).....	32
Quadro 6 – Composição do meio YPD para inoculação de leveduras em crescimento exponencial.....	43
Quadro 7 – Modo de preparação do meio de cultura YCB_BSA para verificar a produção de proteinases adaptado de (Costa & Candido, 2007; Deepa et al., 2015; Ghannoum, 2000; Ishida et al., 2013; Pereira Neto et al., 2014; Tsui et al., 2016; Udayalaxmi, 2016)	44
Quadro 8 – Método de preparação do meio de cultura para verificar a produção de fosfolipases adaptado de (Costa & Candido, 2007; Deepa et al., 2015; Ghannoum, 2000; Ishida et al., 2013; Pereira Neto et al., 2014; Tsui et al., 2016; Udayalaxmi, 2016).....	45
Tabela 2 -Frequência absoluta (F) e valor percentual (%) referentes ao género.	49

Tabela 3 - Frequência absoluta e valor percentual dentro da expressão de proteinases (%), em participantes diabéticos e não diabéticos..... 55

Tabela 4 - Frequência absoluta e valor percentual dentro da expressão de fosfolipases (%), em participantes diabéticos e não diabéticos..... 57

Lista de Abreviaturas

ALS - *Agglutin-like sequence*

Als3 - *the agglutinin-like sequence protein*

ATCC – American Type Culture Collection

BSA – Albumina Bovina

DM – *Diabetes Mellitus*

GAGs - Glicosaminoglicanas

HbA – Hemoglobina A

HbA1c – Hemoglobina glicada

Hwp1- *hyphal wall protein*

IgA – Imunoglobulina A

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

MEC – Células da matriz extracelular

NaCl – Cloreto de sódio

PPR – Prótese parcial removível

PBS – Tampão fosfato-salino

Pz – Atividade enzimática

SAP - Proteinase secretória aspártica

SDA - Agar Sabouraud Dextrose

YCB – Yeast Carbon Base

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

YPD – Yeast Peptone Dextrose

I – INTRODUÇÃO

A população envelhecida, composta por indivíduos a partir dos 60 anos, está sujeita a alterações na cavidade oral tanto fisiológicas como metabólicas, incluindo a diminuição do número de células do organismo, contração dos tecidos periodontais, redução na espessura da mucosa oral devido à desidratação dos tecidos, a redução das papilas gustativas e também a mudanças sistêmicas que influenciam diretamente os tecidos orais. Estas alterações em conjunto com doenças metabólicas existentes, poderão levar à perda dentária precoce, sendo esta, parcial ou total (edentulismo), requerendo ao uso de próteses dentárias ou de outro tipo de reabilitação oral. Estas reabilitações levam a alterações físicas e biológicas da saliva e das estruturas envolventes, muitas vezes provocando um desequilíbrio na microflora oral. (Bianchi et al., 2016; Kim et al., 2013)

Leveduras como as espécies de *Candida*, que habitam e predominam na cavidade oral humana, podem ser responsáveis por infecções fúngicas orais, sendo *Candida albicans*, a espécie mais patogénica. O conjunto de alterações tanto fisiológicas como metabólicas na população idosa e a prevalência da doença Diabetes *Mellitus* (DM) nesta faixa etária, torna os indivíduos mais suscetíveis à colonização por *Candida* sp. e posteriormente a infecções fúngicas na cavidade oral (Fatahinia, Poormohamadi, & Mahmoudabadi, 2015).

1.1 – Reabilitação Oral

Os indivíduos edêntulos totais ou parciais, têm cada vez mais a necessidade de fazer a reabilitação da cavidade oral através de próteses dentárias. Assim, a prótese dentária é definida por ser “*a ciência e a arte de prover substitutos convenientes para a porção coronária dos dentes, ou para mais ou menos dentes perdidos e para as suas partes associadas, de maneira a restaurar as funções perdidas, aparência estética, o conforto e a saúde do paciente*” (Turano, L. M., Turano, 2007). Assim, as principais próteses dentárias podem (Figura 1);

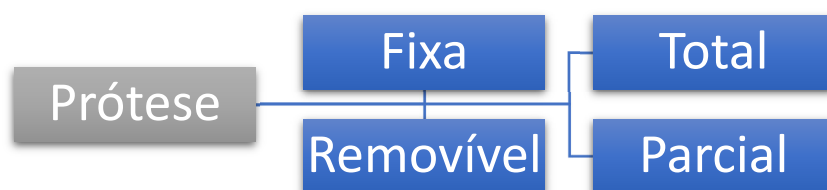


Figura 1 – Classificação do tipo de prótese dentária

A Prótese Parcial Fixa ou normalmente denominada como Prótese Fixa, é uma prótese unitária, ou seja, tem a necessidade de ter retentores que lhe apoiem a fixação neste caso, retalho do dente original, e assim são construídas: restaurações metálicas, coroas, pontes, núcleos de preenchimento. Nestes elementos são utilizados materiais como: ligas metálicas, porcelana, cerâmica e resina acrílica (Turano, L. M., Turano, 2007).

As Próteses Parciais Removíveis (PPR) são próteses dentárias que têm a finalidade de substituir, funcionalmente e esteticamente, os dentes naturais ausentes. Este tipo de prótese é removível e pode ser reposicionada em boca, sempre que necessário, sem causar danos à sua estrutura ou aos elementos biológicos. Relativamente à classificação das PPR, temos as dento-suportadas e as dento-muco-suportada. Para a utilização de uma PPR dento-suportada são necessários dentes remanescentes como elementos de suporte, retenção e estabilidade, denominados “*dentes pilares*”. Na PPR dento-muco-suportada, existem poucos “*dentes pilares*” havendo um contacto íntimo na mucosa que reveste o rebordo residual. Os elementos constituintes das PPR são basicamente: o retentor (apoio oclusal, grampos e corpo), a sela, os dentes artificiais e os conectores (maiores e menores). Estes elementos podem ser constituídos por diversos materiais como o metal (liga metálica – cromo-cobalto), dentes de porcelana e resina acrílica (Bhuminathan S., Julius A., 2011; Di Fiore, R. S., Di Fiore, M. A., Di Fiore, 2010). Foi definido por Kennedy em 1925, uma classificação para este tipo de prótese baseada na posição dos espaços êdentulos em relação à arcada dentária. Esta classificação é a atualmente utilizada e divide-se por quatro tipos de classe:

- Classe I – zonas desdentadas bilaterais e se situam por trás dos dentes suportes.
- Classe II – caso em que a zona desdentada é unilateral e se situa atrás dos dentes suportes, isto é, quando se tiver todos os dentes presentes de um lado da cavidade oral e todos os posteriores ausentes do lado oposto.
- Classe III – caso em que o espaço desdentado é intercalar e unilateral e, de igual modo, as selas.
- Classe IV – caso em que a zona desdentada é inteiramente anterior (Figura 2). O caso mais comum é aquele, no qual foram perdidos os quatro incisivos e nenhum outro dente.

No entanto, por vezes poderão ocorrer diferentes casos dos acima descritos e que poderão determinar modificações dentro da mesma classe:

- Modificação 1 da classe I – Quando houver um só espaço suplementar devido, por exemplo, à perda do incisivo central, do lateral ou do canino.
- Modificação 2 da classe II – Quando houver dois espaços edentados não-unidos, quer dizer, com dentes entre ambos.
- Modificação 3 da classe I – Quando houver três espaços separados por dentes.
- Modificação 4 da classe I – Quando houver quatro espaços protéticos separados por dentes.

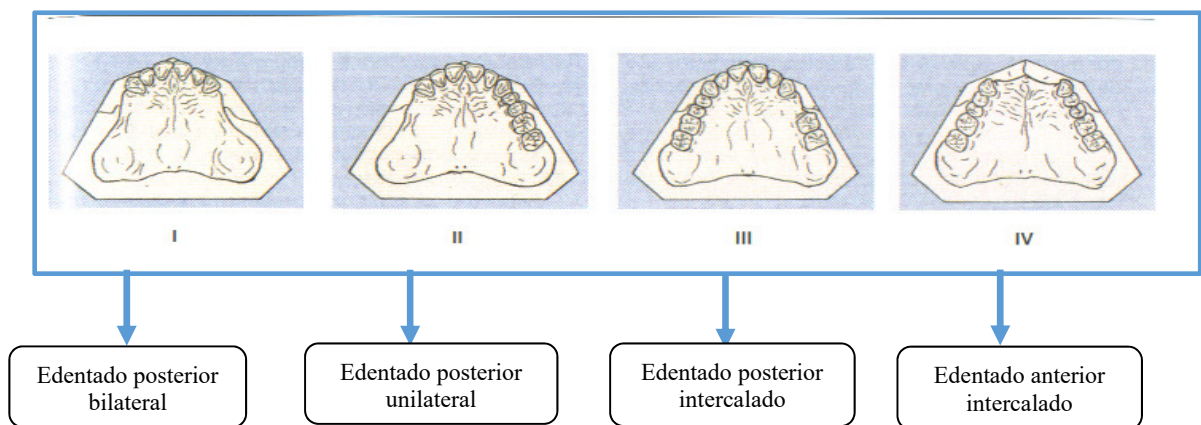


Figura 2 – Classificação de Kennedy (adaptado de Todescan, et al, 2003)

O mesmo sucede com as outras classes, classe II e classe III. A classe IV não admite modificações, pois se existisse mais de um espaço protético, cairia dentro de uma das outras três classes.

No entanto, existem algumas regras de Applegate aplicadas à classificação de Kennedy (Kaiser, 2010):

- 1) A classificação final só deverá ser realizada após as extrações indicadas pelo médico dentista.
- 2) Segundos e Terceiros Molares ausentes que não serão reabilitados, não devem ser incluídos na classificação.
- 3) Terceiro Molar utilizado como elemento suporte da prótese deve ser incluído na classificação.
- 4) A área ou áreas desdentadas mais posteriores sempre determinam a classificação.
- 5) As outras áreas desdentadas que passam a ser secundárias à que determina a classificação, são denominadas modificações e são designadas por seu número.
- 6) Neste tipo de modificações não é considerada a extensão do desdentado.
- 7) Não existem modificações na classe IV de Kennedy.

A Prótese Total é adequada a indivíduos edêntulos totais, em que há substituição de ambos os arcos dentários perdidos. Este tipo de prótese é removível e capaz de recuperar as funções mastigatórias e funcionais de um indivíduo edêntulo total. Neste tipo de prótese são utilizados vários tipos de materiais como: resinas termoplásticas acrílicas, silicone, dentes de porcelana, entre outros (Turano, L. M., Turano, 2007).

O uso de próteses dentárias removíveis é um fator de predisposição bastante importante e frequente para a prevalência da colonização do gênero *Candida* sp., devido à alteração de ambiente causado à cavidade oral. Estes dispositivos, constituídos normalmente por resina acrílica e metal, como é o caso das próteses parciais removíveis e totais, são muito porosos e de difícil higienização, ambientes ideais para o crescimento e colonização desta espécie. A colonização por *Candida* sp., encontra-se em 25-50% dos indivíduos saudáveis sem próteses dentárias enquanto que em indivíduos saudáveis em que o uso de prótese seja recorrente, a sua colonização encontra-se em cerca de 80%. O uso recorrente de próteses dentárias pode levar a traumatismos na cavidade oral por mal adaptação, por serem de difícil higienização, por terem dimensões verticais inadequadas, levando à **Candidíase**, a uma infecção oral fúngica, muitas vezes, denominada estomatite (Candidíase crónica atrofica) (Prakash, Shekar, Maiti, Karunasagar, & Padiyath, 2015; Zomorodian et al., 2011). É uma inflamação da área que se encontra sob a prótese dentária e que afeta cerca de dois terços da população que utiliza próteses dentárias, ocorrendo várias vezes em conjunto com a queilite angular (perda da dimensão vertical). (Cate, J.M, Ten, Klis, F.M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W., Groot, 2009) A estomatite protética (um dos tipos de Candidíase) está fortemente associada à colonização por fungos, sendo *C.*

albicans a espécie que intervém mais neste processo devido à elevada expressão de enzimas hidrolíticas como as proteinases e as fosfolipases (Prakash et al., 2015).

1.2 - Caracterização da colonização do género *Candida* sp.

Taxonomia

As leveduras são fungos ubiqüitários, unicelulares, eucariotas que pertencem ao reino Fungi, que inclui cerca de 600 espécies potencialmente patogénicas para o Homem (Mayer, Wilson, & Hube, 2013). Neste momento são conhecidas cerca de 150 espécies diferentes pertencentes ao género *Candida*. (Mayer et al., 2013; Williams & Lewis, 2011). Entre estas, as espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. stellata*, *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii*, que se podem distinguir pelas suas características fenotípicas e genotípicas. Clinicamente, torna-se cada vez mais importante perceber estes organismos, quanto à sua capacidade de provocar infeção, pois podem infetar tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com o sistema imune comprometido (C. H. G. Martins et al., 2016)

De todas estas espécies isoladas em humanos, a mais prevalente, tanto em indivíduos saudáveis como em indivíduos com o sistema imune comprometido, é *C. albicans* (47%-75%). Apenas algumas espécies, chamadas espécies não-*albicans* referidas acima, são conhecidas por causar infeção no Homem, entre estas; *C. tropicalis* (7%), *C. glabrata* (>7%), *C. krusei* (<5%), *C. parapsilosis* (>5%) e *C. guilliermondii* (<5%) (Bandara, Yau, Watt, Jin, & Samaranyake, 2010; Fatahinia et al., 2015; M. Martins et al., 2010; Williams & Lewis, 2011).

Morfologia e Morfogénese

Os fungos do género *Candida* sp., são fungos polimórficos, pois podem crescer tanto em forma ovóide, como também em formas alongadas e elípticas com constrições no septo (pseudohifa) ou ainda em verdadeiras hifas, tornando-se patogénicas. Espécies como *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* são observadas na maioria das vezes como leveduras, no entanto podem também ser observadas como verdadeiras hifas ou pseudo-hifas. A variação da forma destas espécies deve-se a alterações do pH ou a variações de temperatura, em que um pH inferior a 6, predomina a forma de levedura,

enquanto que um pH superior a 7 predomina a forma de hifa, em que se torna assim a espécie patogénica (Mayer et al., 2013; Meurman, Siikala, Richardson, & Rautemaa, 2007; Williams, David, Kuriyama, Silva, Malic, & Lewis, Michael, A., 2011). Assim sendo, a hifa tem um papel crucial na invasão dos tecidos e dos biomateriais, pois é demonstrada que a sua presença influencia a adesão e a sua resistência à fagocitose, causando um distúrbio na flora do hospedeiro. Ou seja, a formação da hifa é considerada significativa para a patogenicidade (Mayer et al., 2013; Williams, David et al., 2011).

Quimicamente, a parede celular de *Candida* sp., também tem um papel importante nesta invasão, cujas principais funções são de manter a forma das células e mediar a comunicação entre estas e o meio ambiente, de ajudar na sua nutrição e promover a capacidade de funcionar como barreira protetora. Os principais constituintes da parede celular são manoproteínas, glicoproteínas e quitina associadas a outras proteínas estruturais que necessitam de fontes de carbono e iões de amónia ou nitrato como fonte de azoto, que se encontram no organismo do hospedeiro (Barroso, Meliço-Silvestre, & Taveira, 2014; Sánchez-Vargas, Estrada-Barraza, Pozos-Guillen, & Rivas-Caceres, 2013; Williams, David et al., 2011).

Macroscopicamente, as leveduras do género *Candida* sp. em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) apresentam colónias brancas, cremosas com aspeto que pode ser liso brilhante ou rugoso opaco, consoante a espécie. Em meio cromogénico, como o meio Brilliance Agar (CHROMagar), as diferentes espécies podem ser detetadas de acordo com a cor que apresentam no meio. Assim, é possível uma identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, pela morfologia e cor (Barroso et al., 2014).

Colonização na cavidade oral

C. albicans continua a ser a principal espécie patogénica, graças à sua capacidade de se ligar e proliferar através dos tecidos duros ou moles da cavidade oral e também pela participação no complexo e heterogéneo biofilme bacteriano (Barroso et al., 2014; Salerno et al., 2011). Esta capacidade deve-se aos vários mecanismos de adaptação aos diferentes ambientes do hospedeiro como alterações dos níveis de oxigénio, temperatura e disponibilidade de nutrientes, que levam a esta espécie à formação de tubos germinativos, podendo até formar clamidósporos (estruturas terminais ou intercaladas de uma hifa, muito resistentes que se formam quando o fungo se encontra sem os nutrientes

essenciais para se desenvolver). A distinção entre colonização e infecção, por vezes pode tornar-se difícil pois cerca de 86% dos doentes críticos, encontram-se colonizados por *Candida* sp.. Sendo a colonização, um dos principais fatores de risco para a infecção, constitui um pré-requisito para a invasão (Barroso et al., 2014).

Interação entre *Candida* sp. e o Hospedeiro

O mecanismo de interação entre *Candida* sp. e hospedeiro advém da complexidade da interação entre os ligandos celulares da *Candida* sp. e os recetores celulares do hospedeiro. Esta interação relaciona-se com a extensa presença de *Candida* sp. como agente colonizador e agente patogénico na mucosa oral, uma vez que a sua adesão a células e a superfícies constitui o primeiro passo para a subsequente colonização e invasão dos tecidos (Nett & Andes, 2006). A relação comensal depende da integridade do tecido, da flora oral do hospedeiro e do sistema imunitário do hospedeiro. Quando existem alterações metabólicas e uma supressão do sistema imunitário, as espécies do género *Candida* sp. podem tornar-se virulentas. O grau de adesão de certas espécies às superfícies biológicas pode ser um indicador do seu potencial patogénico. Estes diferentes graus de adesão podem ser explicados pela heterogeneidade fenotípica das espécies expressas pelas diferentes hidrofobicidades, secreções de proteínases e fosfolipases extracelulares, formação de hifas, que influenciam diretamente a adesão de *Candida* sp. ao hospedeiro. (Pereira Neto, Silva, & Lemes, 2014). Para além destes fatores associados às leveduras também os condicionantes do Hospedeiro, na cavidade oral como a temperatura, o pH, a concentração de hidratos de carbono, a diminuição do fluxo salivar, entre outros, podem influenciar a adesão de *Candida* sp. à mucosa oral (De Rossi et al., 2011; Pereira Neto et al., 2014). Em pacientes idosos, o uso de medicamentos, como antidepressivos, diuréticos e com efeitos anticolinérgicos, leva a capacidade de gerar xerostomia. A diminuição do fluxo salivar reduz a capacidade de limpeza por este fluido, diminui também os níveis de imunoglobina, que ajudam no combate de microrganismos como *C. albicans* (Balan, Castelino, & Fazil Areekat, 2015; Williams & Lewis, 2011).

É bastante importante assim a distinção entre a colonização e infecção. A colonização define-se como o crescimento de um fungo num hospedeiro sem existir resposta imunológica por parte do hospedeiro. A colonização deste fungo pode ocorrer na cavidade oral, trato respiratório, trato gastro intestinal, urinário, pele e circulação sanguínea do Homem e outros animais. Esta colonização é encontrada em cerca de 25 a

75% dos indivíduos saudáveis, de forma assintomática. Já na mucosa vaginal, a colonização é manifestada em 20% - 30% das mulheres. A infecção é, invariavelmente, precedida pela colonização, e é entendida, neste caso, como a multiplicação de um fungo num tecido viável existindo sinais e sintomas no hospedeiro. A infecção mais descrita é a Candidíase. (De Rossi et al., 2011; Douglas, 2003).

Formação do biofilme

Os biofilmes são estruturas bem organizadas e constituídas por uma comunidade estruturada de espécies *Candida* sp., consiste numa matriz polimérica (Figura 3), onde existe passagem de nutrientes e água, capaz de suportar os diversos ambientes que existem no hospedeiro. Esta matriz formada tanto adere a uma superfície inerte como a uma viva (Byadarahally Raju & Rajappa, 2011; C. H. G. Martins et al., 2016).

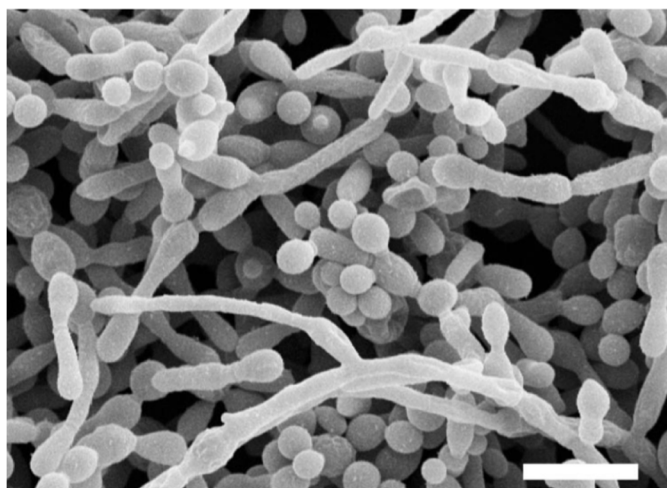


Figura 3 – Biofilme de *C. albicans*, constituído por tubos germinativos, hifas e pseudo-hifas com uma estrutura polimérica (Adaptada de (Ramage, Saville, & Thomas, 2005).

A adesão é o primeiro passo na formação do biofilme, através da adesão dos microrganismos à superfície do hospedeiro, dá a aproximação. Esta aproximação depende de vários fatores, como; as forças electrostáticas, interações hidrofóbicas, saliva, carga da superfície, energia livre da superfície, forças de *Van der Waals* e hidrofobicidade. Esta fase intitula-se **adesão primária**. A **adesão secundária**, caracteriza-se pela consolidação do processo de adesão, onde os microrganismos, em particular as leveduras, expõem proteínas, polissacarídeos e onde há uma reação de interação entre o microrganismo e o hospedeiro, através de recetores específicos das paredes celulares. Depois da adesão à superfície, dá-se o início da **colonização**. Uma vez ligadas à superfície, as células

leveduriformes formam, normalmente, tubo germinativos que se prolongam até hifas e pseudohifas capazes de invadir as células vizinhas. (Cate, J.M, Ten, Klis, F.M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W., Groot, 2009; Douglas, 2003; Ramage et al., 2005).

A colonização depende da razão entre a aquisição (taxa de células leveduriformes que entram na cavidade oral), crescimento e remoção das células da cavidade oral, através da deglutição e da higiene oral. Assim, a colonização para além de depende dos fatores de predisposição do hospedeiro também depende da aquisição ou entrada de células dentro da cavidade oral, da adesão e do crescimento dessas mesmas células, da penetração nos tecidos e por fim da eliminação das células da cavidade oral (Sánchez-Vargas et al., 2013; Tsui, Kong, & Jabra-rizk, 2016).

Por fim, dá-se o **crescimento e maturação do biofilme** que depende de vários fatores como; a rapidez de crescimento, da difusão de nutrientes, do pH e da temperatura do meio, da libertação de resíduos, do equilíbrio entre o hospedeiro e agente patogénico e principalmente dos fatores de virulência (C. H. G. Martins et al., 2016). Os biofilme maduros tornam-se mais resistentes a agentes antifúngicos sobrevivendo aos mecanismos de defesa no hospedeiro (Mayer et al., 2013; Nett & Andes, 2006). Se o crescimento e maturação do biofilme forem bem-sucedidos, haverá um elevado grau de colonização, que por sua vez poderá causar infeção por *Candida* (Candidíase) (Byadarahally Raju & Rajappa, 2011). Estas infeções podem ser crónicas ou temporárias e podem tornar-se bastante perigosas, se houver; suscetibilidade ao sistema imunitário, resistência aos desinfetantes e aos fármacos antifúngicos (Dongari-Bagtzoglou, Kashleva, Dwivedi, Diaz, & Vasilakos, 2009; Douglas, 2003; C. H. G. Martins et al., 2016).

Os microrganismos que co-habitam nestes biofilmes, competem pelos nutrientes, interagindo de forma sinérgica, estimulam o seu próprio crescimento, produzem compostos antagonistas que inibem o crescimento de outros microrganismos residentes e neutralizam fatores de virulência, de forma a que seja possível haver biofilmes formados de diferentes espécies e a crescer em conformidade (C. H. G. Martins et al., 2016)

Em termos clínicos poderemos encontrar a presença de biofilme em dispositivos que estão em íntimo contacto com tecidos mucosos, cateteres hospitalares, nas válvulas protéticas pulmonares e cardíacas, e nos materiais acrílicos e metálicos de próteses dentárias e inclusive implantes dentários. Esta grande capacidade em aderir com muita

facilidade a variadas superfícies pode ajudar-nos a compreender o fato deste fungo ser uma das quatro causas mais comuns de infecção invasora através da corrente sanguínea, podendo colocar em risco alguns pacientes imunodeprimidos (Dongari-Bagtzoglou et al., 2009; M. Martins et al., 2010; Washington Winn, J., Stephen Allen, William Janda, Elmer Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, 2008). Na Figura 4 podemos observar todos os passos da formação do biofilme (Douglas, 2003).

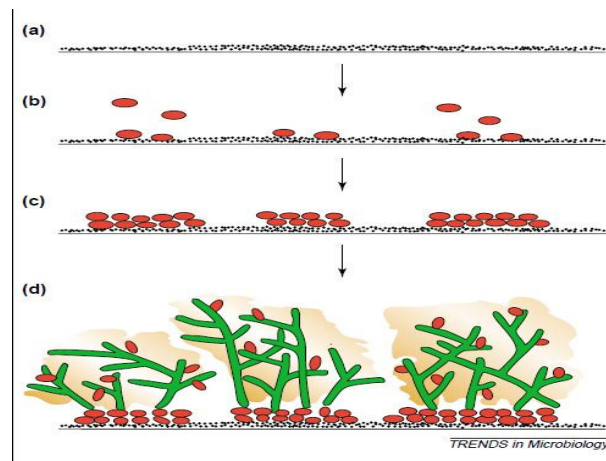


Figura 4 - Fases da formação do biofilme de *Candida* numa superfície de um catéter de PVC – A) superfície do cateter com uma camada de substâncias condicionantes à adesão. B) adesão primária C) formação de micro colônias e sua adesão à superfície D) maduração das micro colônias assumindo diferentes formas como hifas, pseudo-hifas e mesmo a forma normal ovoide da levedura. (Adaptada de (Douglas, 2003)

Candida sp., sobrevive melhor em superfícies húmidas do que em objetos inanimados, podendo permanecer durante pelo menos 24 horas nestas superfícies, se o grau de contaminação for elevado. A cavidade oral é um ambiente onde existe um fluxo contínuo de saliva e se o biofilme não for consistente e maduro, as suas células de serão lavadas ou excluídas da cavidade oral pela saliva, a menos que consigam aderir às mucosas orais e que se repliquem (Tobergte & Curtis, 2013; Tsui et al., 2016).

Fatores do hospedeiro adjacentes à colonização

Como já foi referido anteriormente, a colonização do género *Candida* sp., depende essencialmente de fatores de predisposição, fatores fisiológicos, fatores patológicos e mecânicos que modifiquem o relacionamento entre o hospedeiro e o agente patogénico. O sistema imunitário é bastante importante na resposta à patogenicidade do género *Candida* sp., pois atua na destruição do fungo por meio de produção de citocinas e quimiocinas ou por barreira física e química para impedir a adesão destes

microrganismos. Perante um sistema imunitário debilitado, os fungos adaptam-se rapidamente às condições do ambiente, ideais para o seu desenvolvimento.

Existem outros fatores que podem levar à colonização, os quais podem ser encontrados no Quadro 1: (Byadarahally Raju & Rajappa, 2011; De Rossi et al., 2011; Dongari-Bagtzoglou et al., 2009; Williams & Lewis, 2011)

Quadro 1 – Resumo dos fatores de predisposição num indivíduo à colonização de *Candida* sp. (Adaptado de (Williams & Lewis, 2011))

- a) Secreção salivar reduzida;
- b) Imunodeficiência adquirida ou inata;
- c) Doenças relacionadas com a imunodeficiência como os doentes com o vírus VIH;
- d) Doenças endócrinas/metabólicas (DM, Hipotiroidismo, Hipertiroidismo);
- e) Locais com lesão ou doença na mucosa oral ou mesmo com malignização;
- f) Alterações no epitélio ou da flora;
- g) Uso frequente de próteses dentárias totais e removíveis;
- h) Deficiência nutricional por exemplo, alto consumo de hidratos de carbono;
- i) Uso de antibióticos de largo espectro;
- j) Idade;

Fatores Patogénicos do género *Candida* sp.

É confirmada a prevalência do género *Candida*, especialmente a espécie *C. albicans* em indivíduos com os fatores de predisposição presentes, no entanto esta colonização também depende da expressão de fatores de virulência desta espécie. Sendo a espécie a mais aderente à cavidade oral, devido à sua capacidade de aderir a muitos ligandos diferentes e de possuir fatores de virulência que lhe dão uma vantagem de crescimento. É possível enumerar os vários fatores de virulência (Quadro 2): (De Rossi et al., 2011; Pereira Neto et al., 2014);

Quadro 2 – Resumo dos fatores de virulência de *Candida sp.*
(Adaptado de (Williams & Lewis, 2011)).

- a) Secreção de enzimas hidrolíticas; capacidade de expressão de enzimas extracelulares como, aspartil proteinases secretórias (SAP) e fosfolipases;
- b) Terem a capacidade de iludir o sistema imunológico; produção de substâncias tóxicas que causam lesão celular, formação de biofilmes, produção de tubo germinativo por algumas espécies;
- c) Características dos componentes da parede celular fúngica; hidrofobicidade relativa da superfície celular;
- d) Produzirem metabolitos com efeito tóxico sobre células do hospedeiro (mecanismos de defesa); produção de hemolisinas;
- e) Sofrerem alterações fenotípicas;

Um fator condicionante que influencia o equilíbrio entre a adesão, a colonização e a infecção é o sistema imunológico. A superfície do organismo do hospedeiro é o local das interações físicas entre os fungos, as proteínas do hospedeiro, dos tecidos que levam à adesão e de outros fatores que levam à formação do biofilme. Esta formação depende de processos biológicos e não biológicos. Entende-se como processos não biológicos, as interações físicas entre as macromoléculas, como as forças de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogénio. Por processos biológicos, entende-se a expressão de adesinas (De Rossi et al., 2011; Tsui et al., 2016). Após a adesão na cavidade oral, a rápida germinação nos tecidos deve-se à produção de proteases e adesinas que se ligam as proteínas da matriz extracelular, a recetores de ligação e a proteínas do sistema do complemento (Williams, David et al., 2011). As adesinas, são consideradas proteínas secretadas da família de genes, *Agglutinin-Like Sequence (ALS)*, expressas na superfície da levedura e mediadas por proteínas das células hospedeiras, as adesinas quando ligadas às caderinas, induzem a fagocitose da levedura. Para além deste, no hospedeiro existem vários mecanismos de defesa que dificultam a colonização do género *Candida* na cavidade oral, que são: (i), a barreira física (epitélio da mucosa), (ii) lise da parede celular fúngica, (iii) péptidos antimicrobianos e (iv) fatores salivares específicos como a lisozima, histatina e lactoferrina, fazendo estes, parte do sistema imunitário inato (Mayer et al., 2013; Williams, David et al., 2011).

C. albicans segrega enzimas hidrolíticas como a Proteinase Secretória Aspártica (SAP) e as fosfolipases que desempenham um papel na destruição e na penetração de tecidos hospedeiros. As SAP são de extrema importância no desenvolvimento da infecção da espécie, pois degradam eficazmente a matriz extracelular e as proteínas imunitárias da superfície do hospedeiro como a imunoglobulina, lactoperoxidase, lactoferrina, mucina e pepstatina. A destruição destas proteínas é crucial à invasão no hospedeiro e patogênese (Akçağlar, Ener, Beyza, & Töre, 2011). A SAP1, SAP2 e SAP3 são as enzimas extracelulares mais prevalentes em Candidíases orais (De Rossi et al., 2011; Williams, David et al., 2011). Relativamente às enzimas, fosfolipases, invadem as membranas fosfolipídicas das células do hospedeiro, catalizando a hidrólise dos fosfolípidos, que por sua vez, são os componentes major da membrana do hospedeiro. Os tipos de fosfolipases mais predominantes na infecção oral são PLB1, PLB2, PLC1, PLD1 (De Rossi et al., 2011; Williams, David, Kuriyama, Silva, Malic, & Lewis, Michael, A., 2010). Quando existem alterações do meio ambiente como a falta de nutrientes e a alteração de pH, a espécie *C. albicans* é capaz de se adaptar ao pH ambiental e alterar o pH extracelular, alcalinizando o ambiente pela autoindução da forma de hifa. Através desta forma de hifa, tem capacidade de expressar maior quantidade de enzimas hidrolíticas, sendo, esta produção crucial para que haja infecção, ou seja, para que a espécie seja patogénica (De Rossi et al., 2011; Lyon, Juliana & Resende, 2006; Williams, David et al., 2011).

A deteção destas enzimas é bastante importante para diagnosticar a patogenicidade das espécies que se podem encontrar na cavidade oral como comensais ou então como espécies patogénicas. Ou seja, a compreensão dos mecanismos de patogenicidade de *Candida* sp. torna-se essencial para o seu diagnóstico e para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas (Mayer et al., 2013; Williams, David et al., 2011).

Em resumo (Tabela 1.), podemos verificar os diversos fatores de virulência de *Candida* sp. e o seu respetivo efeito;

Tabela 1 – Fatores de virulência de *Candida* sp. e o seu efeito (Adaptada de (Williams & Lewis, 2011).

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

Colonização de *Candida* sp. em próteses dentárias removíveis

O género *Candida* sp. adere a uma variedade de dispositivos médicos, como cateteres hospitalares, válvulas protéticas pulmonares e cardíacas, próteses dentárias e implantes dentários, podendo promover a colonização e a formação do biofilme nas superfícies destes materiais, causando por vezes a sua deterioração (Dongari-Bagtzoglou et al., 2009; M. Martins et al., 2010; Salerno et al., 2011).

Os principais motivos que levam à adesão desta levedura a polímeros inertes *in vitro* são os que se encontram mencionados no Quadro 3; (Zamperini. A. C. & Vergani. C. E., Pavarina. A.C. Giampaolo. E. T., 2010).

Quadro 3 – Resumo dos fatores de adesão às próteses dentárias (Adaptado de (Pereira-Cenci et al., 2008; Zamperini. A. C. & Vergani. C. E., Pavarina. A.C. Giampaolo. E. T., 2010)

- a) o grau de rugosidade do material;
- b) o tipo de material da base da prótese dentária (esquelética ou acrílica);
- c) efeito da saliva;
- d) hidrofobicidade;
- e) energia livre da superfície;

A energia livre da superfície é um dos principais fatores relacionados com o desenvolvimento de Candidíase nos indivíduos com próteses dentárias. Esta é definida pela interação entre forças de coesão e adesão. Logo, quanto maior for a energia livre da superfície maior é a adesão dos microrganismos. As diferentes cargas existentes nas próteses dentárias e na superfície das leveduras leva a haja uma relação entre a hidrofobicidade. Estas cargas podem estar diretamente relacionadas com a água, tendo esta capacidade de união, pois quanto mais próxima a superfície com energia livre estiver do substrato e da levedura, maior é a probabilidade de adesão (Pereira-Cenci, Del Bel Cury, Crielaard, & Ten Cate, 2008; Salerno et al., 2011). Assim, as espécies mais hidrófobas são: *C. tropicalis*, *C. glabratae* e *C. krusei*, que aderem com menor facilidade a polímeros inertes, nomeadamente materiais de resina para base de próteses dentárias. As espécies menos hidrofóbicas são: *C. albicans*, *C. stellatoidea* e *C. parapsilosis* que aderem com maior facilidade aos mesmos polímeros (Pereira-Cenci et al., 2008; Radford, Challacombe, & Walter, 1999). Relativamente a rugosidade do material, este fato é mais visível em materiais de acrílico devido às irregularidades existentes neste material, assim, é demonstrado que *C. albicans* apresenta maior adesão ao acrílico, a superfícies ásperas de borracha e ao silicone, comparativamente com superfícies lisas (Pereira-Cenci et al., 2008; Zamperini. A. C. & Vergani. C. E., Pavarina. A.C. Giampaolo. E. T., 2010). Este fenómeno poderá estar relacionado com o fator de rugosidade, pois quanto mais rugosa a

superfície do material for, maior é a adesão. Exemplo disto, é o envelhecimento da prótese dentária, em que há uma deterioração da resina acrílica, que se caracteriza por um aumento da porosidade, tornando a superfície progressivamente mais rugosa, logo maior é a adesão. Assim também o diâmetro e o grau de aspereza da superfície afeta a retenção dos microrganismos (Salerno et al., 2011).

A função da saliva humana também é crucial na adesão de *Candida* sp., no entanto, ainda é um pouco controversa pois, a saliva demonstra ter um efeito de limpeza e de defesa inata. Esta defesa inata é demonstrada a partir de várias moléculas que compõem a saliva como as lisozimas, histatina, lactoferrina, calprotectina e IgA. Estas moléculas interagem com as espécies de *Candida* sp., diminuindo a sua adesão e colonização com as superfícies orais. No entanto, as proteínas que fazem parte da saliva servem como nutrientes para os microrganismos, ajudam no seu crescimento, reprodução e no desenvolvimento do biofilme. Assim, as películas de saliva que revestem a cavidade oral poderão aumentar a aderência da espécie *C. albicans* a grânulos polimetilmetacrilato HA e a bactérias (Divya Rani, Surya Prabha, Lakshmipriya, & Chitralkha, 2014; Pereira-Cenci et al., 2008; Salerno et al., 2011).

A espécie *C. albicans* co-adere com várias espécies de bactérias orais, como: a *Streptococcus gordinii*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius* e *Actinomyces*. Este ambiente de interação é induzido por situações de *stress* ou de acesso restrito a certos nutrientes como a sacarose. As condições de multiplicação destas bactérias podem afetar a adesão de leveduras do género *Candida* sp., podendo até ativar alguns fatores de virulência destas. Como exemplo, durante a colonização de *Candida* sp. em próteses acrílicas, a presença de *Streptococcus* influencia a presença de sacarose que poderá melhorar da ligação de adesão de *Candida* sp.. No entanto, esta competição pela glucose pode afetar a sua taxa de crescimento, pois as bactérias existem em concentrações mais elevadas na cavidade oral (Cristina de Lima, Nakata, Balducci, & Almeida, 2008; Zomorodian et al., 2011). O tratamento com antibióticos, reduz o número de bactérias orais, que se torna um fator de predisposição para a formação do biofilme e colonização de outros microrganismos como *Candida* sp.. Outro fator de predisposição é a doença DM, que devido à sua sintomatologia causa alterações nos tecidos da cavidade oral proporcionando condições ideais para a colonização de *Candida* sp. e a sua adesão às células epiteliais (Durán et al., 2007; Salerno et al., 2011).

2 – Infecções associadas ao género *Candida* sp.

Candidíase oral

Um dos tipos de infecções patogénicas mais comuns é a micose, que se denomina Candidíase, caracterizada pela colonização de espécies do género *Candida*. Esta colonização depende da eficácia das defesas do hospedeiro, ou seja, poderá ser uma indicação de deficiência imunológica (Barroso et al., 2014; Zomorodian et al., 2011). Nesta infecção normalmente podem estar envolvidas espécies do género como; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. krusei* (Kasper et al., 2015; Santos, Piva, Vilela, Jorge, & Junqueira, 2016). Apesar da origem da Candidíase poder ser diferente, a capacidade da espécie persistir em superfícies mucosas de indivíduos saudáveis é um fator bastante importante que contribui para a sua virulência. Este tipo de infecção afeta grande parte dos indivíduos com o sistema imune debilitado, nomeadamente, os diabéticos que apresentam predisposição a este tipo de infecções (Barroso et al., 2014; De Rossi et al., 2011). Na cavidade oral, esta infecção, pode caracterizar-se como mucocutânea, cutânea e sistémica. Podendo apresentar quatro formas clínicas diferentes: (Kasper et al., 2015; Williams, David et al., 2011)

a) **Candidíase Eritematosa** - também denominada Candidíase Eritematosa Crónica, apresenta-se sob a forma de manchas ou áreas eritematosas avermelhadas numa fina e lisa camada, este tipo ocorre com frequência no palato, devido a próteses mal adaptadas de uso frequente ou mesmo por inadequada higiene oral. Este tipo também pode ser denominado de Estomatite, devido à sua associação com próteses removíveis e totais, podendo-se desenvolver em por baixo de qualquer superfície acrílica ou aplicação intra-oral. É o tipo de infecção mais prevalente e considerado persistente ou crónico, encontrando-se em cerca de 75% dos usuários de próteses dentárias.

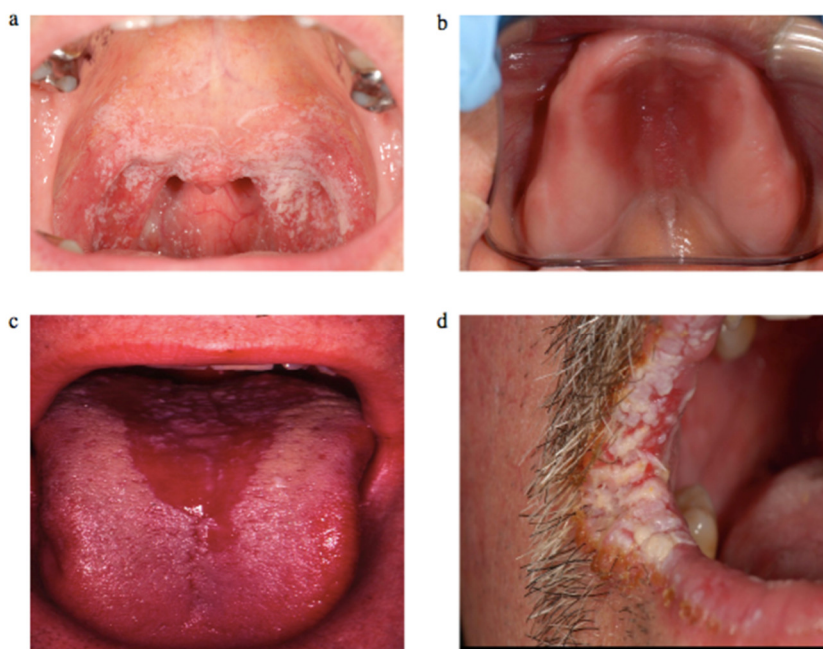
b) **Candidíase Eritematosa aguda** - apresenta variações tanto nos aspetos clínicos como no grupo de pacientes afetados, no entanto predomina a lesão avermelhada dolorosa. A forma localizada caracteriza-se pela Candidíase persistente e prolongada na mucosa oral, encontrando-se no dorso da língua e palato, no entanto esta é um tipo de infecção considerada temporária e que também se pode localizar para além da cavidade oral nas unhas, da pele e da mucosa vaginal. Inicia-se como Candidíase pseudomembranosa envolvendo, pouco depois, unhas e pele.

c) **Candidíase Pseudomembranosa** - é uma infecção vulgarmente conhecida como “alfas”. É a mais comum em neonatos e crianças (5-10%), denominando-se como “sapinhos” nestes casos, também é comum em doentes com xerostomia e principalmente quando existe alguma supressão imunitária local. Caracteriza-se pela presença de placas esbranquiçadas ou amareladas facilmente removíveis por meio de raspagem deixando a mucosa com áreas eritematosas e hemorrágicas. Esta facilidade de remoção pode ser considerada um meio diagnóstico que diferencia este tipo de Candidíase. Este tipo de infecção é considerado transitório ou temporário.

d) **Candidíase Crónica Hiperplásica** - é caracterizada pela apresentação de placas brancas, mais frequentes na comissura labial ou no dorso da língua que não podem ser removidas pela raspagem. Uma particularidade deste tipo de infecção é a possibilidade de desenvolvimento malignização, ou seja, partes escamosas ou carcinogénicas em locais de lesão. É também conhecida como leucoplasia por *Candida* sp., em forma de hifa no epitélio. Este tipo de infecção também é considerado persistente ou crónica.

Na Figura 5, podemos observar clinicamente os quatro diferentes tipos de Candidíase.

Figura 5– *Imagens clínicas das várias Candidíases orais em estado primário – (A) Candidíase pseudomembranosa, (B) Candidíase eritematosa aguda, (C) Candidíase hiperplásica crónica, (D) Candidíase eritematosa crónica (Adaptada de (Williams & Lewis, 2011)).*



3 – A Diabetes *Mellitus*

Apresentação clínica da DM

A doença Diabetes *Mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia crónica, com distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas e na secreção de insulina ou apenas da sua ação. Os diferentes tipos de DM são causados por uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais. A homeostase da glicose reflete um equilíbrio entre a produção hepática de glicose e a captação e utilização de glicose periférica. A insulina é o regulador mais importante deste equilíbrio metabólico. Os órgãos que regulam a glicose e os lípidos comunicam por mecanismos neuronais e humorais com gordura e produzindo adiposinas musculares, metabolitos que influenciam a função do pâncreas. No estado de jejum, os níveis baixos de insulina aumentam a produção de glicose, promovendo a gluconeogénese hepática e a glicogenólise e existe uma redução da absorção de glicose em tecidos sensíveis à insulina (músculo esquelético e tecido adiposo) promovendo, assim a mobilização dos precursores armazenados, como os aminoácidos e ácidos gordos livre (lipólise). O glucagon, segregado pelas células alfa pancreáticas, quando os níveis de glicose no sangue ou de insulina são baixos, estimula a glicogenólise e a gluconeogénese pelo fígado e pela medula renal. Como critérios de diagnóstico de Diabetes são utilizados; glicémia em jejum (fasting plasma glucose, FPG) > 126 mg/dl (ou > 7,0 mmol/l), hemoglobina A1c (HbA1c) > 6,5%, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose ou sintomas clássicos de descompensação + glicemia ocasional > 200 mg/dl (ou > 11,1 mmol/l). A Hiperglicemia intermédia é também conhecida como pré-diabetes, é uma condição em indivíduos que apresentem níveis de glicose no sangue superiores ao normal, no entanto, não são suficientemente elevados para serem classificados como Diabetes. Os indivíduos com Hiperglicemia intermédia poderão ter uma anomalia da glicemia em jejum (AGJ) – Glicemia em jejum > 110 mg/dl e < 126 mg/dl (ou > 6,1 e < 7,0 mmol/l) ou a Tolerância diminuída à glicose (TDG) – Glicemia às 2 horas após a ingestão de 75 gr de glicose > 140 mg/dl e < 200 mg/dl (ou > 7,8 e < 11,1 mmol/l), sendo estes critérios para o seu diagnóstico. Sendo as formas mais comuns de DM tipo 1 e 2. Nos pacientes diabéticos já em tratamento, o melhor exame é a hemoglobina glicada (HbA1c). Este

exame é extremamente útil, pois serve para avaliar o estado de glicémia nos últimos 2-3 meses. Um paciente diabético controlado apresenta valores abaixo de 7%, os níveis acima de 7%, estão associados a um maior risco de complicações a níveis desta doença. (American Diabetes Association, 2011; Correia et al., 2015; Kasper et al., 2015).

Classificação da DM

Esta doença pode ser classificada em dois tipos, que dependem da ausência parcial ou total de insulina no organismo. Na DM do tipo 1, é o resultado de interações entre os fatores genéticos, ambientais e imunológicos no pâncreas, que causa uma destruição das células β pancreáticas, ou seja, existe uma deficiência completa da insulina, pois a sua produção ocorre nesse órgão. A doença pode afetar qualquer idade, mas os primeiros sinais desta doença verificam-se entre 5-7 anos de idade e na puberdade, antes dos 20 anos de idade, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária. A incidência de DM tipo 1 está a aumentar em todo o mundo, uma taxa de 3-4% ao ano por motivos incertos. Apesar deste tipo de DM não ter cura, o tratamento passa pelo controlo metabólico de forma a evitar complicações. Estes doentes têm sempre que fazer insulino-terapia, ou seja, necessitam de injeções de insulina diariamente para controlar os seus níveis de glicose no sangue. Sendo a DM tipo 1 mais frequente do que o tipo 2, a sua incidência tem vindo a aumentar (American Diabetes Association, 2011; Correia et al., 2015).

A resistência ou a secreção anormal de insulina são dois fatores fundamentais para o desenvolvimento de DM tipo 2. A DM tipo 2, provavelmente engloba uma gama de transtornos com fenótipo comum de hiperglicemia. Este tipo verifica-se numa faixa etária mais elevada geralmente após os 40 anos de idade, sendo caracterizada por uma diminuição da secreção da insulina ou pela resistência à sua ação, ou seja, quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não consegue utilizar eficazmente a insulina produzida. A DM tipo 2 é a forma mais comum, ocorrendo em cerca de 90-95% dos casos, na sua maioria associada à obesidade, com grande percentagem de massa gorda na região abdominal. Nas fases iniciais da doença, a tolerância à glicose permanece quase normal, apesar da resistência à insulina, pois as células beta pancreáticas compensam, aumentando a produção de insulina. Ou seja, não são dependentes de insulina exógena, mas podem necessitar de insulina no controlo da hiperglicemia se não conseguirem através da dieta associada a antidiabéticos orais. O método mais habitual para avaliar o estado de diabetes é através da determinação da

hemoglobina A1c. É uma análise ao sangue que podemos verificar o estado da doença nos últimos três meses. (American Diabetes Association, 2011; Correia et al., 2015; Kasper et al., 2015).

Em 2014, a prevalência de DM na população portuguesa foi cerca de 13,1%, mais de 1 milhão de indivíduos são portadores desta doença. Existe também uma prevalência da Diabetes numa faixa etária mais idosa, em que, mais de um quarto da população numa faixa etária entre 60-79 anos de idades tem Diabetes (Correia et al., 2015).

Estima-se que a incidência desta patologia aumente nos adultos, pois nas duas décadas passadas o aumento até 1985 foi de 30 milhões de casos, passando para 382 milhões em 2013. Segundo, a Federação Internacional dos Diabetes é de prever que cerca de 592 milhões de pessoas venham a manifestar DM até ao ano de 2035 (Correia et al., 2015; Kasper et al., 2015).

Complicações da DM

Como diagnóstico desta patologia, podemos verificar vários sintomas e sinais no Quadro 4:

Quadro 4 – Resumo dos sinais da doença Diabetes Mellitus (Adaptado de (American Diabetes Association, 2011; Correia et al., 2015; Kasper et al., 2015))

- Poliúria
- Polidipsia
- Polifagia
- Perda de peso
- Mudança na visão
- Fadiga/Fraqueza
- Irritabilidade
- Náuseas
- Boca seca
- Hálito cetónico
- Desidratação
- Respiração de Kussmaul (acidótica)
- Sonolência
- Cetoacidose (principalmente na DM tipo 1)

Após as refeições diárias de um diabético, a glicemia, encontra-se acima dos valores normais. Ou seja, em episódios hiperglicémicos é verificada uma deficiência de insulina e consequentemente existe um aumento de glicose na corrente sanguínea, assim, são

excretadas grandes quantidades através da urina, a glicose não é toda reabsorvida pelos túbulos renais assim provocando uma pressão osmótica. A reabsorção de água é menor e por consequência existe grandes perdas de água, de sódio, de potássio e de glicose através da urina (American Diabetes Association, 2011; Kasper et al., 2015). Esta ação irá provocar ao diabético, sede e desidratação na maioria das vezes. A colonização por *Candida* sp. poderá ser despertada a partir de um período hiperglicêmico, pois haverá uma alteração do ambiente oral (Balan et al., 2015).

Para além destas alterações, existem também alterações orais associadas à DM durante períodos hiperglicêmicos devido a disfunções imunitárias como podemos verificar no Quadro 5:

Quadro 5 – Resumo das complicações da doença Diabetes Mellitus (American Diabetes Association, 2011; Kasper et al., 2015)

- Xerostomia
- Síndrome da boca ardente
- Glossodinia
- Hálito cetônico
- Ulcerações
- Líquen plano
- Cárie dentária,
- Doença periodontal,
- Hipocalcificação do esmalte
- suscetibilidade para infeções bucais,
- Alteração do paladar
- Queilite
- Dificuldade na retenção de próteses removíveis com trauma dos tecidos moles

A xerostomia é frequente em cerca de 10-30% dos diabéticos. A redução do fluxo salivar leva a redução da capacidade tampão e antimicrobiana da saliva, assim, a cavidade oral torna-se um ambiente ideal para o desenvolvimento de cáries dentárias e a outras infeções. Para além deste fator, a elevada concentração de glicose na saliva, uma má higiene oral e a polimedicação destes doentes, são fatores que também ajudam no desenvolvimento de cáries dentárias (American Diabetes Association, 2011; Cristina de Lima et al., 2008; Nikbin, Bayani, Jenabian, Khafri, & Motallebnejad, 2014).

A suscetibilidade às infeções orais, é favorecida pela hiperglicemia, pela diminuição do fluxo salivar e por alterações da composição salivar em proteínas

antimicrobianas como lactoferrina, lisozima e lactoperoxidase. Estas alterações aumentam a suscetibilidade a infeções, nomeadamente à *Candida* sp. (Balan et al., 2015; Sanitá et al., 2012).

Controlo e tratamento da DM 2

É recomendado um despiste a esta doença porque normalmente é uma doença assintomática. Para um diagnóstico precoce é importante ter em atenção os fatores de risco, como; a história familiar de DM, Obesidade (IMC >25 KG/M²), inatividade física, alimentação inadequada, o envelhecimento, o ambiente intra-uterino deficitário e a etnia. O aparecimento da DM está muitas vezes associado a uma hipertensão arterial e ao nível de colesterol elevado. O controlo destes fatores, também poderá ajudar no controlo da DM (Correia et al., 2015). Segundo o *Programa de Prevenção de Diabetes Portuguesa (DPP)*, de forma a manter o valor de glicemia controlado, são necessárias mudanças para um estilo de vida saudável (ingestão de insulina, uma alimentação adequada, exercício físico e uma educação constante no controlo da doença). Existem várias opções de fármacos para o tratamento de DM tipo 2; entre eles; as Biguanidas, (que reduzem a quantidade de glicose produzida pelo fígado), os Inibidores de DPP-4 e GLP 1, (que induzem a diminuição de glicémia, aumentando a quantidade de insulina produzida pelo pâncreas), a Insulina, os Inibidores de alfa glucosidase, (que após as refeições ajudam na decomposição e absorção dos hidratos de carbono), as sulfonilureias e meglitinidas, (que estimulam o pâncreas a libertar insulina) e por fim, as Glitazonas, (que ajudam o organismo a utilizar a insulina) (Correia et al., 2015; Kasper et al., 2015).

Colonização de *Candida* sp. em diabéticos

A hiperglicemia auxilia a colonização e a multiplicação do género *Candida*. Sendo muitas vezes observadas infeções do tipo Candidíase, devido ao mau controlo glicémico. Os elevados níveis de glicose salivar aumentam a aderência de *Candida* sp. às células epiteliais bucais. A glicose salivar produz produtos de glicosilação durante episódios hiperglicémicos, levando à sua acumulação nas células epiteliais (Balan et al., 2015; Sanitá et al., 2012). Esta relação é muito frequente, uma vez que os indivíduos diabéticos têm um sistema imune debilitado, tornam-se mais suscetíveis a infeções. Este fenómeno acontece devido a existir algumas diferenças relativamente à adesão nas células epiteliais bucais em indivíduos diabéticos, que os leva a ter maior probabilidade de transportar

microrganismos como; a degeneração microvascular; a redução do fluxo salivar, ao consumo de fármacos antifúngicos e à presença de próteses dentárias na cavidade oral (Sanitá et al., 2012; Tsang et al., 2007).

Espécies como; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. fomatata*, *C. kruesi*, *C. krefyr*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, estão envolvidas em estudos da colonização desta levedura na cavidade oral de diabéticos (Tsang, C. S. P., et al, 2007; Dongari-Bagtzoglou, A., et al, 2009). Como podemos observar no estudo de Fatahinia (2015), foram isolados 855, de indivíduos diabéticos, dos quais, a espécie predominante foi a *C. albicans* (58,6%), seguida de *C. parapsilosis* (11%), *C. glabrata* (8,3%), *C. tropicalis* (7%), *C. kefyri* (5.8%), *C. krusei* (4.4%), *C. orthpsilosis* (2.1%) e *C. guilliermondii* (0.6%) (Fatahinia et al., 2015). Noutros estudos são também encontrados resultados semelhantes na colonização de *Candida* sp. em indivíduos diabéticos (Durán et al., 2007; Martinez, Hernández-Pérez, Fabián-San Miguel, Jaimes-Aveldañez, & Arenas, 2013; Tsang et al., 2007).

4 – Identificação laboratorial das espécies do género *Candida*

Para a identificação das espécies de *Candida*, são utilizados os métodos fenóticos e genotípicos. Os métodos de identificação, permitem identificar e isolar espécies. Os métodos fenóticos são utilizados frequentemente para diferenciar e isolar as diferentes espécies de *Candida*, por expressão de fatores de virulência das espécies, como o metabolismo enzimático, fermentativo e metabólico. Para ser possível a identificação da espécie, são estudados os comportamentos que a mesma tem em diferentes meios ou condições. Assim estes métodos são feitos em laboratório com o objetivo de simular o ambiente perfeito para a formação do biofilme das leveduras e conseguir o isolamento destas. Estes métodos são:

- a) crescimento em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (SDA);
- b) crescimento em meio diferencial cromogénico;
- c) testes da produção do tubo germinativo e clamidósporos;
- d) testes da assimilação de hidratos de carbono e azoto;
- e) testes para comprovar a virulência (produção extracelular de proteinases e fosfolipases).

Métodos de Identificação

Métodos de isolamento

a) Crescimento em meio SDA;

O meio mais utilizado para o isolamento de *Candida* sp. é o meio de cultura SDA que apresenta na sua composição cloranfenicol e/ou gentamicina. Quando existe crescimento de leveduras do género *Candida*, neste meio, verificamos a presença de colónias brancas ou brancas-amareladas, de forma convexa, brilhantes, lisas, húmidas, cremosas e com odor característico, normalmente denominado de “placa branca”. Este meio inibe a presença de bactérias devido ao seu baixo pH e à sua fonte de azoto. (Figura 6 - A). No entanto, o isolamento neste meio não permite a diferenciação de espécies do mesmo género, por isso é recomendado que se utilize um meio cromogénico para a diferenciação de espécies (Byadarahally Raju & Rajappa, 2011; Costa & Candido, 2007; Dongari-Bagtzoglou et al., 2009; M. Martins et al., 2010; Meurman et al., 2007).

b) Crescimento em meio diferencial cromogénico;

O meio cromogénico é utilizado para a diferenciação pois contém vários substratos cromogénicos que reagem sob a ação de hexominidases produzidas pelo fungo, produz colónias pigmentadas que correspondem a diferentes espécies. Este meio é vantajoso pois permite a deteção de várias espécies de *Candida* numa única placa após 24 a 48 horas de incubação. Exemplo deste meio, é o meio “Candi Select (Bio-Rad)” que identifica eficazmente as espécies *Candida*, pigmentando a espécie *C. albicans* (rosa), *C. tropicalis* (verdes - turquesa intenso) e *C. krusei* (verde) (Figura 6 - B). (Cate, J.M, Ten, Klis, F.M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W., Groot, 2009; Costa & Candido, 2007).

Para verificar o comportamento e o crescimento, são utilizados outros métodos para o diagnóstico fisiológico, como o teste do tubo germinativo e assimilação de hidratos de carbono e de azoto.

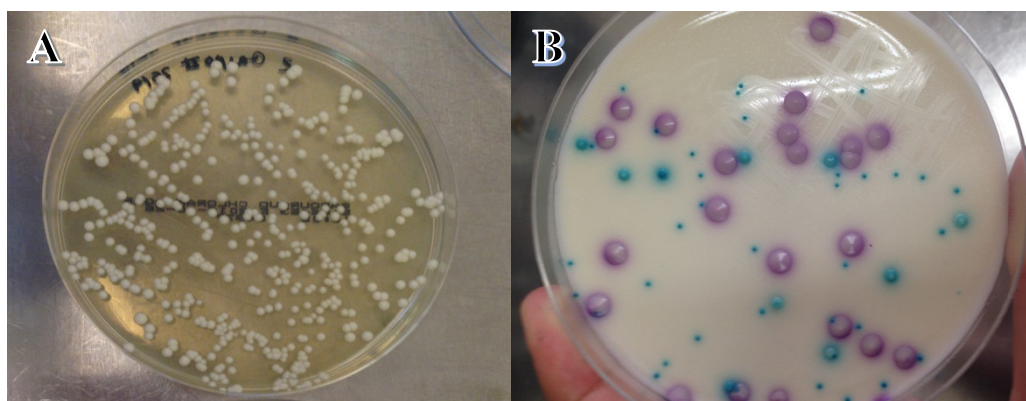


Figura 6 – Observação do crescimento em meio SDA (A) e à direita crescimento em meio cromogénico (B) (Meio Candi Select – BioRad) com colónias rosa (*C. albicans*) e Verdes (*C. tropicalis*).

Métodos fenotípicos:

c) Teste da assimilação de hidratos de carbono e azoto

O teste da assimilação de hidratos de carbono consiste na capacidade de uma levedura crescer aerobicamente na presença de vários elementos, com açúcares tais como a galactose, glicose, sacarose, maltose, lactose, xilose, trealose, como única fonte de energia. A assimilação de azoto, consiste na capacidade que uma levedura possui de crescer aerobicamente na presença de um composto nitrogenado fornecido como única fonte de energia. Neste método pode ser observado a produção de gás-carbónico e a diminuição de pH visualizado no meio pela presença de gás e a mudança de cor. Para uma rápida aplicação destes métodos foram criados sistemas como; o sistema API 20C, ID 32C (Biomérieux®), Vitek Yeast Biochemical Card (YBC) e o Vitek 2 ID-YST. Estes sistemas ou “kits” são galerias plásticas que contêm microcápsulas de hidratos de carbono desidratados, em que se inocula a suspensão da levedura a condições de temperatura e tempo recomendadas pelo fabricante. As amostras positivas são verificadas pela turvação da microcúpula ou pela mudança de cor. A inoculação dos poços é realizada através da adição da suspensão de levedura e após 18h a 24h a 35°C de incubação, são lidos os resultados através de positivos e negativos pela turvação ou da cor do poço. (Byadarahally Raju & Rajappa, 2011; Costa & Candido, 2007).

d) Testes de produção de Tubo germinativo e Clamidósporos

O teste do tubo germinativo também conhecida como prova de blastese é utilizado para diferenciar *C. albicans* e *C. dubliniensis* das outras espécies *Candida* pois estas espécies conseguem desenvolver-se completamente em forma de hifa e portanto não tem constrição característica das pseudo-hifas. Se houver tubos germinativos, pode-se estabelecer identificação de *C. albicans*, pois nem todas as espécies produzem tubos germinativos, por isso a cultura deve ser inoculada em meio rico, como soro animal ou humano para facilitar a morfogênese. Este teste é rápido, simples, económico e padrão para identificar *C. albicans* (95-97%), envolvendo a indução de crescimento de hifas (tubos germinativos) de leveduras cultivadas em soro de duas a quatro horas a 37°C (Meurman, J. H., et al, 2007; Spolidorio, D. M. P., 2009; Yarid, D. S., et al, 2010). *C. albicans* e *C. dubliniensis*, são capazes de produzir clamidospóros, diferenciando-se apenas por a *C. albicans* apresentar clamidospóros em pares, ou mais, que aderem lateralmente às pseudo-hifas (Byadarahally Raju & Rajappa, 2011; Costa & Candido, 2007) .

II - OBJETIVOS

Num estudo *in vitro*, através de recolhas obtidas na Clínica Universitária do ISCSEM em 34 indivíduos reabilitados com próteses removíveis não diabéticos e em 36 indivíduos reabilitados com próteses removíveis diabéticos pretendeu-se:

- 1) Avaliar a caracterização da prevalência das diferentes estirpes *Candida* sp. isoladas na cavidade oral de indivíduos não diabéticos portadores de próteses removíveis (grupo controlo).;
- 2) Avaliar a caracterização da prevalência das diferentes estirpes *Candida* sp. isoladas na cavidade oral de indivíduos diabéticos portadores de próteses removíveis (grupo de trabalho).;
- 3) Avaliar a caracterização da patogenicidade das diferentes estirpes *Candida* sp. encontradas em cada um dos grupos anteriores (1 e 2);

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1- Tipo de estudo

O referido estudo é de caráter exploratório e descritivo, com uma abordagem metodológica envolvendo uma perspectiva quantitativa que, segundo Fortin (Fortin, 2000), possibilita maior aproximação com o quotidiano e as experiências vividas pelos próprios indivíduos. Em termos temporais trata-se de um estudo transversal, isto é, realizado num único momento de observação.

2 -Local do Estudo

Relativamente à recolha da informação da amostra, foi recolhida na Clínica Universitária do ISCSEM. O procedimento laboratorial foi todo efetuado no Laboratório de Microbiologia do ISCSEM.

3- Amostra estudada

Este estudo foi realizado em doentes desdentados totais e parciais reabilitados com próteses removíveis e diabéticos e não diabéticos na Clínica Universitária do ISCSEM. Esta recolha foi elaborada de forma de conveniência e de acessibilidade e não aleatória. A população usada como amostra, neste estudo, foi constituída por 70 indivíduos adultos, de ambos os géneros, com idades compreendidas entre 24-90 anos de idade, em que 36 indivíduos portadores de prótese removíveis eram diabéticos (grupo de trabalho) e 34 indivíduos portadores de prótese removível eram não diabéticos (grupo de controlo).

Os critérios de inclusão: todos os participantes tinham de ser portadores de prótese removível e para o grupo de trabalho teriam que ser doentes diabéticos tipo 2.

Quanto aos critérios de exclusão consideraram-se os doentes reabilitados com prótese removível que apresentavam os seguintes parâmetros clínicos:

1. Prótese em função por um período inferior a 6 meses ao estudo

2. Doentes submetidos a terapêutica antifúngica e antibioterapia por um período inferior a 6 meses ao estudo

4 – Procedimento utilizado na recolha de informação para a amostra

A recolha de amostras nos dois grupos: (i) Grupo de trabalho - indivíduos diabéticos reabilitados com prótese removível (36) e (ii) Grupo controlo - indivíduos reabilitados com prótese removível (34), foi feita da seguinte forma:

- Os indivíduos foram informados, de forma detalhada, verbalmente e por escrito através do consentimento informado (Anexo 1), que, após ter sido lido pelo doente, foi assinado. Foi-lhes ainda pedido que respondessem verbalmente a um questionário (Anexo 2).
- Após a formação do estudo, foi efetuada uma observação clínica da cavidade oral e foi registado na folha de questionário os dados a analisar.
- Por fim, foi feita a recolha das amostras a analisar recorrendo a uma zaragatoa estéril com meio de transporte (Stuart), utilizada para cultura de microrganismos. Esta recolha foi realizada segundo o protocolo de recolha de amostras, em que por intermédio de uma zaragatoa estéril fez-se o esfregaço por toda mucosa abrangida pela prótese dentária durante cerca de 1 minuto. Assim a amostra foi colocada no meio de transporte (Stuart), devidamente identificada e enviada para o laboratório de Microbiologia num prazo máximo de 48 horas.

Materiais utilizados na recolha da amostra

Para a realização do exame clínico utilizaram-se os seguintes materiais:

- **Material básico:**
 - Água corrente
 - Cadeira odontológica
 - Copo
 - Corrente para babete
 - Kit básico de observação (espelho, pinça e sonda exploratória)
- **Material de proteção:**

- Luvas
- Máscaras

- **Material de recolha:**
 - Zaragatoas estéreis com meio de transporte (Stuart)

5 - Protocolo laboratorial

O processamento laboratorial das amostras foi dividido em 2 partes:

1ª parte – Identificação de espécies *Candida* sp.;

2ª parte – Estudo da virulência (estudo das proteinases e fosfolipases).

5.1. - 1ª Parte - Identificação de espécies *Candida* sp.

No laboratório de microbiologia do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, inocularam-se as amostras por estrias com a própria zaragatoa do meio Stuart nos seguintes meios de cultura; meio SDA e o Meio “Candi Select” (Bio-Rad) (Figura 7 – A e B). Estas inoculações foram manipuladas dentro da Câmara de fluxo laminar para evitar contaminações externas. E, em seguida estas placas foram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 48 - 72 horas. Após o tempo necessário de incubação das placas, foi realizada uma primeira abordagem sobre a identificação de algumas características das colónias, como a morfologia, cor, consistência, mobilidade da colónia.

Executamos várias repicagens para o meio de SDA, de forma a obter culturas puras, podendo assim executar os testes de identificação presuntiva.

Como o meio “Candi Select”, permitia identificar a espécie de praticamente todos os isolados através da diferença de cores, apenas foi necessário realizar testes fisiológicos a algumas amostras que revelavam ambiguidade entre espécies. Para estas amostras foi realizado o teste das galerias APi 20 *Candida* (Biomérieux®) (Figura 7 – C), segundo as normas do fabricante de modo a obter de forma rápida e eficaz a identificação exata da espécie. O teste do tubo germinativo também foi elaborado para diferenciar a espécie *C. albicans* das outras espécies.

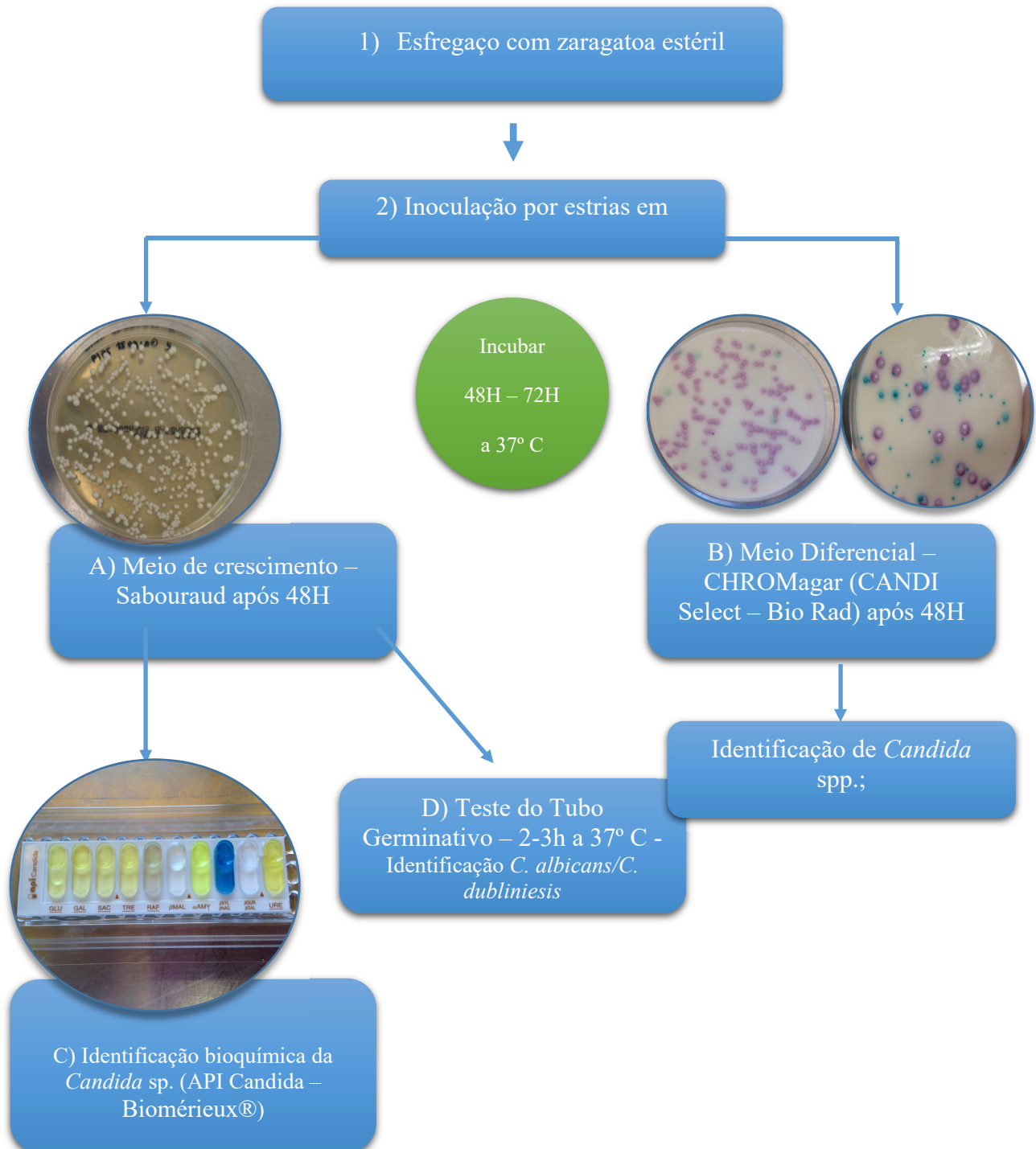


Figura 7 – Protocolo para isolamento e identificação do género *Candida* a partir de amostras da cavidade oral (Adaptado de (Costa & Candido, 2007)

5.2 - 2ª Parte - Estudo da Virulência

A segunda parte do procedimento laboratorial foi realizada após a identificação exata da espécie *Candida* sp., para compreender a expressão de virulências nestas espécies. Através da produção das enzimas hidrolíticas, como as proteinases e fosfolipases conseguimos verificar o fator de virulência de cada espécie.

Primeiramente as leveduras necessitam de atingir o crescimento exponencial, para isso foram inoculadas em meio YPD (Quadro 6), que é um meio líquido de enriquecimento. Após o crescimento, o meio foi centrifugado de forma a separar o sedimento (constituído por leveduras) do sobrenadante. Posteriormente foi feita uma inoculação em meio YCA_BSA (Quadro 7) para verificação da produção de proteinases e uma inoculação em meio FOSFOLIPASES (Quadro 8) para verificação da produção de fosfolipases.

Quadro 6 – *Composição do meio YPD para inoculação de leveduras em crescimento exponencial*

Meio YPD, preparado em 100 ml com os seguintes elementos:

2% glucose (dextrose)

1% extrato de levedura

2% peptona

Quadro 7 – Modo de preparação do meio de cultura YCB_BSA para verificar a produção de proteinases adaptado de (Costa & Candido, 2007; Deepa et al., 2015; Ghannoum, 2000; Ishida et al., 2013; Pereira Neto et al., 2014; Tsui et al., 2016; Udayalaxmi, 2016)

Meio de cultura para a produção de proteinases:

Meio YCB_BSA (1000ml);

- 1) Preparação da solução stock de agar a 2%
18g de agar em 900ml de H₂O destilada e em seguida submeter à autoclavagem
- 2) Preparação da solução que contém os seguintes elementos:
11,7g Yeast Carbon Base (YCB)
2,0g Albumina bovina (BSA)
1,0g Extrato de levedura em 100ml de água destilada. Acertar o pH para 5,0 e esterilizar por filtração.
- 3) Adicionar a solução preparada em 2) à solução 1) a 50°C
- 4) Distribuir em placas

Como revelador de resultados, utilizamos;

Solução Amido black

0,5% amido black

49,5% ácido Acético glacial

50% água destilada

Protocolo Experimental:

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

Notas:

- Não foram colocados mais de 4 discos por placa
- Procedemos ao mesmo protocolo experimental para a realização do controlo negativo (NaCl) e controlo positivo (estirpes ATCC)

9. Leitura dos resultados;

Observar diariamente as zonas de lise à volta do disco;

10. Corar o meio com a solução de amidoblack;

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

12. Cálculo do Pz ($Pz = \text{Diâmetro do disco} / \text{diâmetro da zona não corada}$)

Quadro 8 – Método de preparação do meio de cultura para verificar a produção de fosfolipases adaptado de (Costa & Candido, 2007; Deepa et al., 2015; Ghannoum, 2000; Ishida et al., 2013; Pereira Neto et al., 2014; Tsui et al., 2016; Udayalaxmi, 2016)

Meio Fosfolipases

1) Preparação da base (200 ml):

- 13g Sabouraud + Dextrose agar
 - 11,7g cloreto de sódio (NaCl)
 - 0.111g cloreto de cálcio (CaCl₂)
- em 184mL de água destilada

2) Autoclavar e deixar arrefecer até aos 50°C

3) Juntar 20 mL de emulsão de ovo ao meio base

4) Distribuir em placas

Protocolo Experimental:

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

Notas:

- Não foram colocados mais de 4 pontos de inoculação por placa
- Procedemos ao mesmo protocolo experimental para a realização do controlo negativo (NaCl) e controlo positivo (estirpes ATCC)

8. Leitura dos resultados;

Observar diariamente as zonas de precipitação à volta do disco;

- 9. Medição dos diâmetros dos halos de precipitação (atividade fosfatásica)**
- 10. Cálculo do Pz (Pz = Diâmetro da colónia/diâmetro da colónia + zona de precipitação)**

A atividade das proteinases é avaliada, *in vitro*, em meio de cultura contendo albumina sérica bovina como única fonte de azoto, observando-se uma zona transparente à volta das colónias, resultante da degradação da albumina pelas proteinases secretadas pelo isolado. Quanto à atividade das fosfolipases, a gema de ovo contida no meio contém grandes quantidades de fosfolípidos e quando os isolados produtores de fosfolipases são semeados neste meio produzem uma zona de precipitação branca, bem definida à volta da colónia. Esta zona branca é devida à formação de um complexo de cálcio com os ácidos gordos libertados após a ação das fosfolipases sobre os fosfolípidos presentes na gema de ovo. Todos estes protocolos utilizados foram adaptados de diferentes estudos, devido ao seu grau de sucesso (Costa & Candido, 2007; Deepa, Jeevitha, & Michael, 2015; Ghannoum, 2000; Ishida et al., 2013; Pereira Neto et al., 2014; Tsui et al., 2016; Udayalaxmi, 2016).

6 - Operacionalização das variáveis

Para analisar os resultados, foram escolhidas como variáveis:

- Género
- Idade
- Grupo de trabalho – diabéticos
- Grupo controlo - não diabéticos
- Tipo de prótese removível utilizada
- Tipo de *Candida* sp.
- Teste das proteinases
- Teste das fosfolipases
- Espécies comensais e patogénicas

7 - Análise de dados

O tratamento estatístico foi efetuado através da aplicação do IBM-SPSS versão 24.0 para Mac, visto que, este é um dos programas informáticos que permite dar suporte à análise e interpretação dos dados recolhidos pelo instrumento aplicado. Deste modo, procedeu-se, fundamentalmente, à análise da distribuição de frequências dos dados

obtidos e dos respectivos valores percentuais através da realização do teste do qui-quadrado para comparação das variáveis de estudo. No entanto, é de referir que, nesta fase, o tratamento estatístico não é ambicioso, mas foi considerado suficiente para concretização dos objetivos pretendidos.

IV – RESULTADOS/DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo de investigação através dos questionários foram tratados no programa IBM SPSS *versão 24.0*, o que permitiu organizar, apresentar, analisar e, mesmo, interpretar dados.

O presente estudo teve como principal objetivo observar a prevalência do grau de colonização e da distribuição de espécies *Candida* sp. num grupo de participantes diabéticos e não diabéticos, ambos portadores de próteses removíveis e verificar se estas espécies *Candida* sp. exprimem fatores de virulência favoráveis à infeção. Embora existam vários estudos na literatura sobre a colonização deste género de levedura em indivíduos portadores de prótese removível (Pereira-Cenci et al., 2008; Sanità et al., 2012; Tsang et al., 2007) e outros sobre a colonização da mesma levedura em indivíduos diabéticos (Dorocka-Bobkowska et al., 2010; Fatahinia et al., 2015; Martinez et al., 2013), não foram encontrados quaisquer estudos sobre a colonização de *Candida* sp. em indivíduos diabéticos, portadores de próteses removíveis e que avaliassem a expressão da virulência destas espécies. No presente estudo, foram observados dois grupos; um grupo de participantes diabético tipo 2 (grupo de trabalho) e um grupo de participantes não diabético (grupo controlo) perfazendo um total de 70 participantes (N=70). A distribuição dos doentes por género está representada na (Tabela 2.), não existindo diferença estatisticamente significativa (P=0.134) entre géneros no grupo de participantes diabético como no grupo de participantes não diabético. Em termos de frequência podemos observar que a maioria dos participantes não diabéticos é do género feminino N = 23 (56,1%). Relativamente ao grupo dos diabéticos, não existe diferença no género encontrado, pois encontramos N=18 (50%) tanto género feminino como no género masculino.

Tabela 2 -Frequência absoluta (F) e valor percentual (%) referentes ao género.

Grupo		Frequência	Percentagem (%)
Não diabético	Feminino	23	67,6
	Masculino	11	32,4
	Total	34	100,0
Diabético	Feminino	18	50,0
	Masculino	18	50,0
	Total	36	100,0

A média da idade no grupo de participantes não diabético foi de 61 anos de idade com um DP= 15,47 e um intervalo de confiança para a média a 95% a variar entre os limites 55,92 e 66,72. O valor mínimo registado foi de 24 anos de idade e o valor máximo foi de 90 anos de idade, com um valor de mediana nos 62 anos de idade. A média da idade no grupo de doentes diabéticos foi de 69 anos de idade com um DP= 9,28 e um intervalo de confiança para a média a 95% a variar entre os limites 66,27 e 72,56. O valor mínimo registado foi de 46 anos de idade e o valor máximo foi de 87 anos de idade, com um valor de mediana nos 68 anos de idade. A distribuição relativa à média das idades nos grupos de estudo é observada no gráfico da Figura 8. Uma distribuição semelhante relativamente à média de idades foi observada no estudo de Sanitá (Sanitá et al., 2011), em que se verifica uma média de idades no grupo de diabéticos de 62,6 anos de idade e no grupo de participantes não diabéticos uma média de idades entre os 62,2 anos de idade.

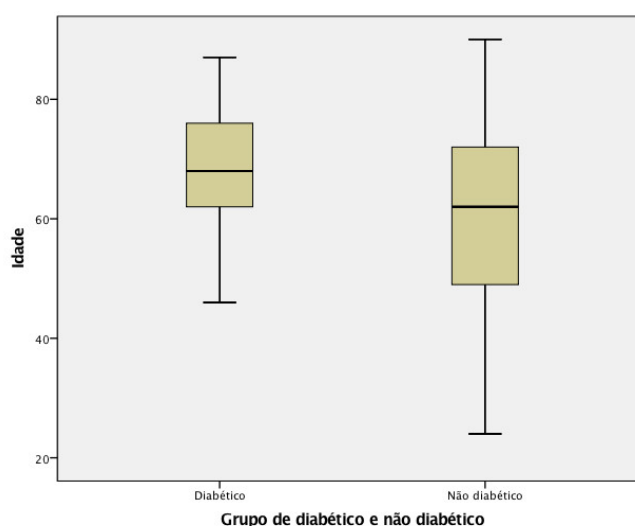


Figura 8 - Gráfico relativo à variável idade nos grupos não diabético e diabético.

O fator idade está relacionado com a doença DM, pois é verificado que na faixa etária 65 anos de idade ou mais, cerca de (32,86 %) dos participantes tem a doença DM e (22,86 %) não são portadores desta doença. Esta distribuição pode ser observada no gráfico de barras da Figura 9, como também é observada que numa faixa etária inferior a 65 anos de idade é verificada uma percentagem de (25,71%) de participantes não diabéticos e cerca de (18,57%) dos participantes têm DM. Com o aumento da idade, o sistema imune dos indivíduos começa a ficar mais debilitado, em que os indivíduos ficarão mais suscetíveis a infeções, alterações imunológicas e doenças sistémicas como a DM que alteram a microflora oral. Segundo as alterações da microflora oral existentes

em participantes com esta faixa etária, é sugerido que exista uma maior colonização e prevalência do género *Candida* sp. na cavidade oral, em que indivíduos diabéticos com mais de 60 anos de idade apresentam uma prevalência estatisticamente significativa para a candidíase (Belazi et al., 2005).

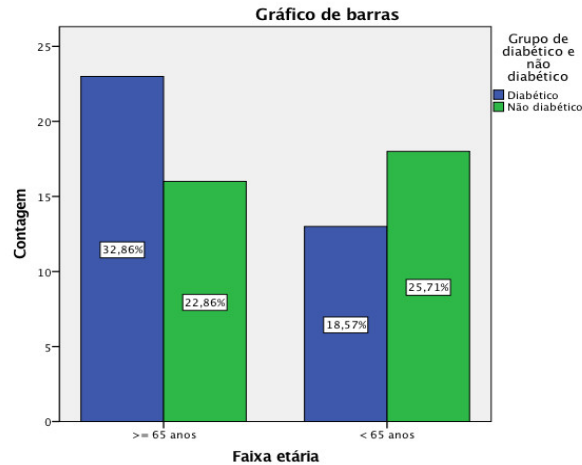


Figura 9 - Gráfico de barra relativo à faixa etária <65 anos de idade nos grupos não diabético e diabético.

O gráfico de barras relativo à faixa etária e ao tipo de desdentados encontrados na população estudada, observado na Figura 10, demonstra que nos participantes com 65 anos de idade ou mais, foi verificada uma prevalência de desdentados totais (N=19) 27,14%. Na mesma faixa etária, é verificada uma distribuição homogénea relativa aos desdentados encontrados. Na população estudada é verificado que nos participantes com menos de 65 anos de idade existe uma homogeneidade relativa ao tipo de desdentado. É possível afirmar que existe uma relação entre a idade e a perda dentária total, o que pressupõem que sejam necessárias reabilitações orais perante o aumento da idade.

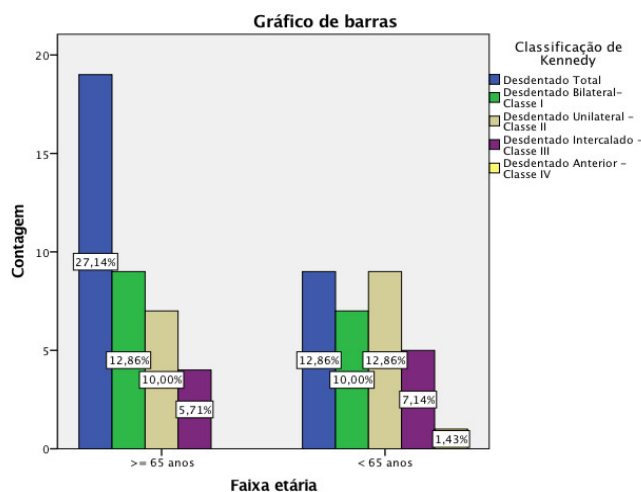


Figura 10 - Gráfico de barra relativo à faixa etária <65 anos de idade segundo a Classificação de desdentados de Kennedy.

Relativamente ao gráfico de barras associado à classificação de desdentados de Kennedy nos grupos de estudo é verificado que (Figura 11), existe uma relação entre a doença DM e a perda precoce de peças dentárias, pois é de verificar maior prevalência de desdentados totais tanto grupo diabético como no não diabético de desdentados totais em cerca de (21,43%) e (18,57%) respetivamente. No entanto, foi observada uma maior percentagem no grupo não diabéticos (12,86%) de desdentados Bilaterais – Classe I em relação ao grupo de diabético (10,00%). Nos desdentados Unilaterais – Classe II foi observado o contrário, uma maior percentagem no grupo diabético (14,29%) face ao grupo controlo (8,57%). Relativamente aos desdentados intercalados – Classe III, voltou-se a verificar que no grupo de trabalho apresenta uma maior percentagem (8,57%) do que o grupo de controlo (4,29%). Apenas o grupo de trabalho apresenta, a classificação de desdentados anteriores – Classe IV (1,43%) (Figura 11).

No estudo de Dorocka-Bobkowska, (Dorocka-Bobkowska et al., 2010), relata também que a doença DM está relacionada com a perda dentária, ou seja, que os indivíduos diabéticos tem mais suscetibilidade à necessidade de prótese dentária. A presença de prótese dentária na cavidade oral, altera o pH, o fluxo salivar e impede a limpeza mecânica da língua na cavidade oral. Sendo, um ambiente ideal para a colonização por *Candida* sp.. (Sanitá et al., 2011). A colonização e multiplicação de espécies *Candida*, é maior em indivíduos portadores de prótese devido ao fato de se tratar de dispositivos que podem ser constituídos com materiais muito porosos e diferentes, com

características específicas e de difícil higienização. O tipo de prótese, adaptação e durabilidade da mesma na cavidade oral, são fatores que levam de forma rápida à adesão e colonização por *Candida* sp.. Quanto maior for a reabilitação oral do participante (prótese total), maior será a adesão e conseqüentemente a colonização por *Candida* sp.. (Pereira-Cenci et al., 2008; Radford et al., 1999). Nos indivíduos portadores de próteses totais diabéticos foi observada, uma das formas de infecção de Candidíase, a Estomatite prótética em (58%) dos indivíduos (Dorocka-Bobkowska et al., 2010).

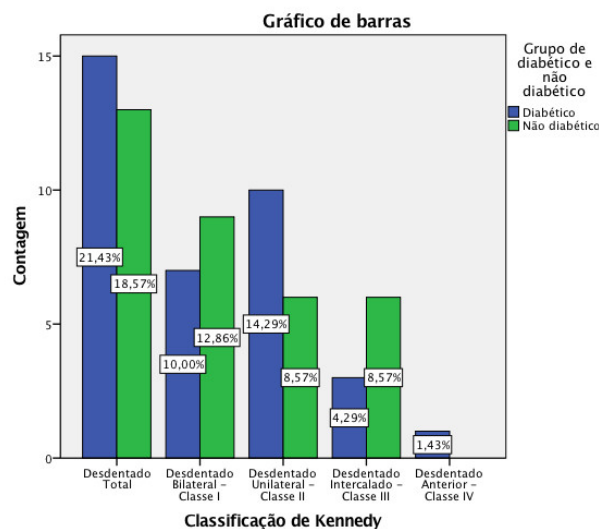


Figura 11 - Gráfico de barras relativamente à classificação de desdentados de Kennedy no grupo não diabético e diabético.

Foram identificadas duas espécies de *Candida* sp. na cavidade oral nos dois grupos, diabéticos e não diabéticos, portadores de próteses removíveis. *C. albicans* foi a espécie detetada em maior prevalência tanto no grupo diabético (30,0%) como no grupo não diabético (34,29%). *C. tropicalis* foi detetada em menor percentagem no grupo de trabalho (5,71%) e no grupo de controlo (7,14%) (Figura 12). No entanto, em (22,85%) das amostras, não foi possível a deteção de *Candida* sp., este fenómeno pode ser explicado por uma higiene oral mais adequada ou pelo controlo da DM. Na comparação das variáveis analisadas neste gráfico, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P=0.286$) entre o grupo diabético e não diabético relativamente à presença de *Candida* sp.. Ou seja, a doença DM não teve influência na formação do biofilme de *Candida* sp. Contrariamente, no estudo de Sanitá (Sanitá et al., 2011), em 210 isolados de participantes diabéticos foi detetada cerca de (81,9%) isolados obtidos através de próteses dentárias da espécie *C. albicans* e (15,24%) da espécie *C. tropicalis*, havendo diferenças significativas entre os grupos de estudo.

No estudo de Prakash, (Prakash et al., 2015), os resultados também sugerem que existe influência no uso de prótese dentária face à colonização por *Candida* sp., pois os portadores de prótese dentária apresentam mais colonização de *C. albicans* (58%), seguida *C. tropicalis* (28%) e de *C.dubliensis* (12%) e *C.glabrata* (2%).

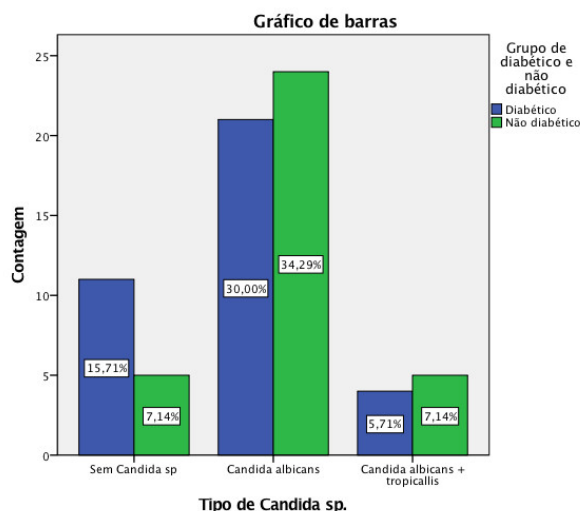


Figura 12 - Gráfico de barras para o valor percentual para a presença de *Candida* sp. em participantes diabéticos e não diabéticos.

A avaliação da expressão de enzimas hidrolíticas, como as proteinases e as fosfolipases, trata-se da expressão de um dos fatores de virulência característica deste género *Candida*. Esta avaliação é bastante utilizada para a identificação da expressão de virulência, ou seja, se são espécies comensais ou patogénicas na cavidade oral do hospedeiro (Akçağlar et al., 2011). No presente estudo, relativamente à expressão de proteinases no grupo de diabético e não diabético (Figura 13), é possível observar em maior percentagem de isolados no grupo diabético que expressaram proteinases (32,86%) enquanto que no grupo controlo verificou-se em (30,0%). A média do Pz, detetava um positivo forte em ambos os casos (0,3-0,6). As respostas negativas verificaram-se nos dois grupos, de igual modo (18,57%) (Tabela 3). No entanto, não se verifica diferenças estatisticamente significativas ($P=0.854$) na produção de proteinases entre o grupo diabético e não diabético (Tabela 3.).

No estudo de Tsang (Tsang et al., 2007), foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos grupos estudados, pois foi verificada expressão de proteinases no grupo diabético como no grupo controlo. No entanto, observou-se maior expressão de proteinases no grupo diabético. Esta taxa de expressão das proteinases pode

ser explicada, pelas alterações orais presentes nos diabéticos assim, como os seus constituintes salivares (Fatahinia et al., 2015).

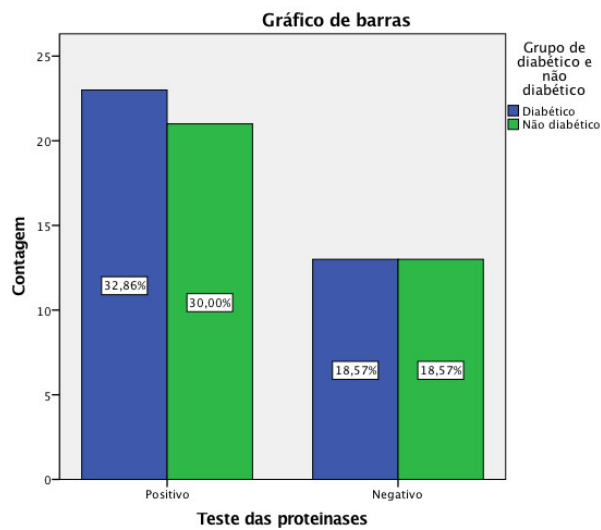


Figura 13 - Gráfico de barras para o valor percentual relativo à expressão de proteinases no grupo diabético e não diabético.

Tabela 3 - Frequência absoluta e valor percentual dentro da expressão de proteinases (%), em participantes diabéticos e não diabéticos.

		Teste das proteinases		Total	
		Negativo	Positivo		
Grupo	Não diabético	Frequência observada	13 _a	21 _a	34
		% dentro do Teste para as proteinases	18,6%	30,0%	62,9%
Grupo	Diabético	Frequência observada	13 _a	23 _a	36
		% dentro do Teste para as proteinases	18,6%	32,9%	37,1%
Total		Frequência observada	26	44	70
		% dentro do Teste para as proteinases	100,0%	100,0%	100,0%

a) cada proporção entre o Teste para as proteinases e as suas categorias (positivo e negativo) e observou-se que as proporções não diferem significativamente entre si para um nível de significância de 0,05. (P=.854).

Relativamente à expressão de fosfolipases no grupo de diabético e não diabético (Figura 14), é possível afirmar que esta expressão revelou-se positiva em maior percentagem no grupo diabético (31,43%) enquanto que no grupo não diabético verificou-se (30,0%). A média do Pz, detetava um positivo forte (0,4-0,8) em ambos os grupos. As respostas negativas ao teste verificam-se no grupo diabético (20,0%) e no grupo não diabético (18,57%) (Tabela 4). No entanto, não se verifica uma diferença estatisticamente significativa (P=0.955) entre o grupo diabético e não diabético relativa à expressão das fosfolipases.

Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Tsang, (Tsang et al., 2007), em que houve expressão de fosfolipases tanto no grupo de diabéticos como no grupo controle, não havendo uma diferença estatisticamente significativa entre estes grupos. O que se pensaria que seria diferente, pois a concentração de glicose salivar aumentada combinada com uma diminuição de fluxo salivar, aumenta o crescimento de leveduras e a sua adesão às células epiteliais dos diabéticos (Fatahinia et al., 2015; Nikbin et al., 2014).

No estudo de Mohan Das (Mohan Das, V., Ballal, M., 2008), a produção de proteinases foi positiva em (74,56%) isolados e a produção de fosfolipases foi positiva em (44,73%) dos isolados.

Tanto no presente estudo como no estudo de Andreola (Andreola, Demathea, Galafassia, & Estelamari Barbieri Elsemanna, Rogério Brasiliense Elsemanna, 2016), produção de proteinases revelou-se significativamente maior comparada com a produção de fosfolipases. Em que, 35 isolados de *Candida* sp. foram positivos para a produção de fosfolipases (29%) e 34 dos isolados foram positivos para a produção de proteinases. Os mesmos resultados são encontrados no estudo de Deepa (Deepa et al., 2015), em que a atividade das fosfolipases foi cerca de (52,6%) nos isolados e a produção de proteinases foi cerca de (86,8%) nos isolados de *Candida* sp..

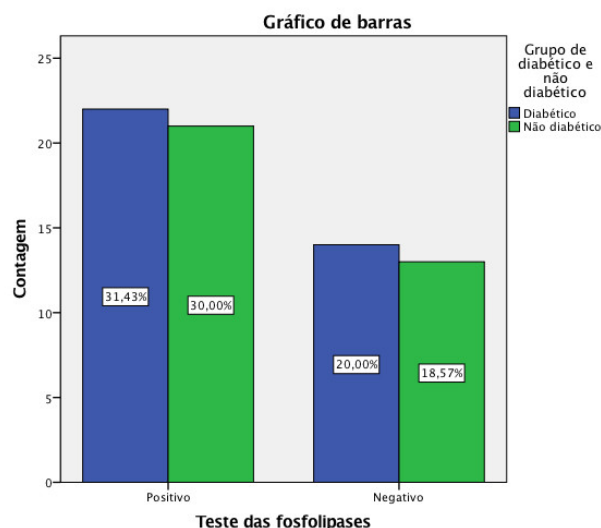


Figura 14 - Gráfico de barras para o valor percentual relativo à expressão de fosfolipases no grupo diabético e não diabético.

Tabela 4 - Frequência absoluta e valor percentual dentro da expressão de fosfolipases (%), em participantes diabéticos e não diabéticos.

		Teste para as fosfolipases		Total	
		Negativo	Positivo		
Grupo	Não diabético	Frequência observada	13 _a	21 _a	34
		% dentro do Teste para as fosfolipases	18,6%	30,0%	48,6%
	Diabético	Frequência observada	14 _a	22 _a	36
		% dentro do Teste para as fosfolipases	20,0%	31,4%	51,4%
Total		Frequência observada	27	43	33
		% dentro do Teste para as fosfolipases	100,0%	100,0%	100,0%

a) cada proporção entre o Teste para as fosfolipases e as suas categorias (positivo e negativo) e observou-se que as proporções não diferem significativamente entre si para um nível de significância de 0,05. (P=.955)

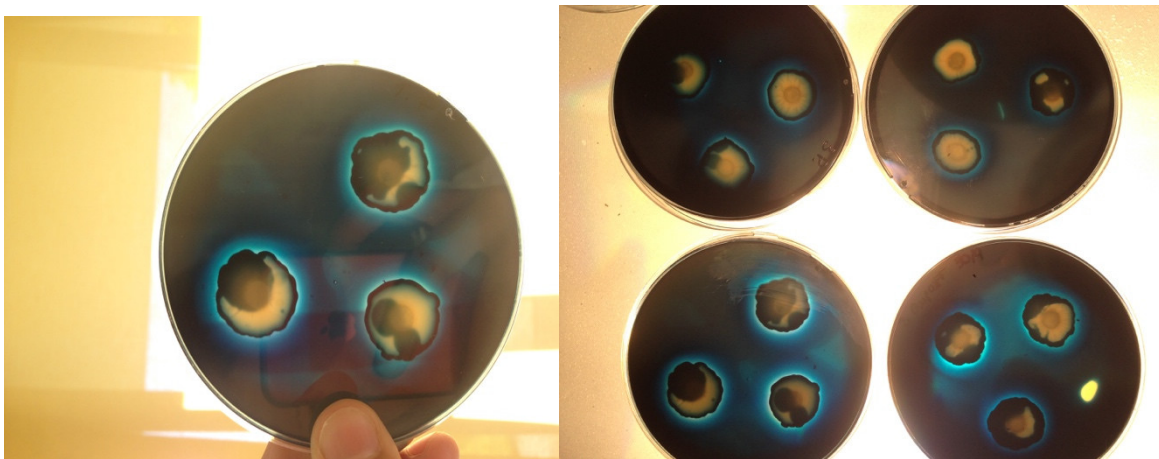


Figura 15 e 16– Observação da atividade das proteinases no meio YCB_BSA corado com a solução de revelação de amido black

A atividade das proteinases é avaliada, *in vitro*, em meio de cultura contendo albumina sérica bovina como única fonte de azoto, observando-se uma zona transparente à volta das colónias, resultante da degradação da albumina pelas proteinases secretadas pelo isolado. Este resultado pode ser observado na Figura 15 e 16.

A gema de ovo contém grandes quantidades de fosfolípidos e quando os isolados produtores de fosfolipases são semeados neste meio produzem uma zona de precipitação branca, bem definida à volta da colónia. Esta zona branca é devida à formação de um complexo de cálcio com os ácidos gordos libertados após a ação das fosfolipases sobre os fosfolípidos presentes na gema de ovo (Figura 17 e 18).

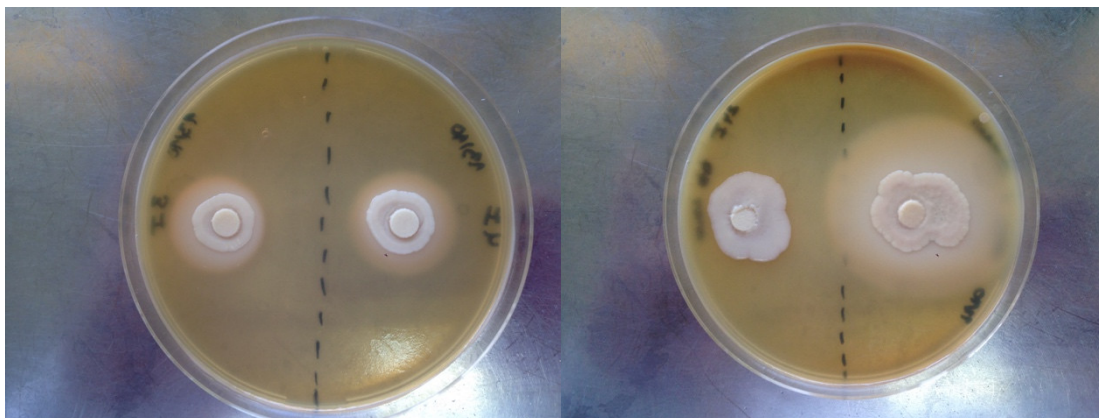


Figura 17 e 18 – Observação do halo da atividade das fosfolipases, sendo à direita um isolado ATCC *C. albicans*

Relativamente ao gráfico de barras (Figura 19) que representa, o resultado da expressão das proteinases nas espécies *Candida* é de observar que a sua produção foi positiva nas duas espécies isoladas; *C. albicans* e *C. tropicalis*. No entanto, verifica-se maior percentagem de expressão positiva na espécie *C. albicans* (70,37%), enquanto que *C. tropicalis* apresenta uma baixa expressão (11,11%). A produção de proteinases é negativa em alguns isolados de ambas as espécies. Relativamente ao resultado da produção das fosfolipases é de observar que o teste revela-se positivo nas duas espécies; *C. albicans* e *C. tropicalis* (Figura 20). No entanto, verifica-se maior expressão positiva na espécie *C. albicans* (66,67%), enquanto que *C. tropicalis* apresenta uma baixa expressão (12,96%). A produção de fosfolipases é negativa em alguns isolados de ambas as espécies.

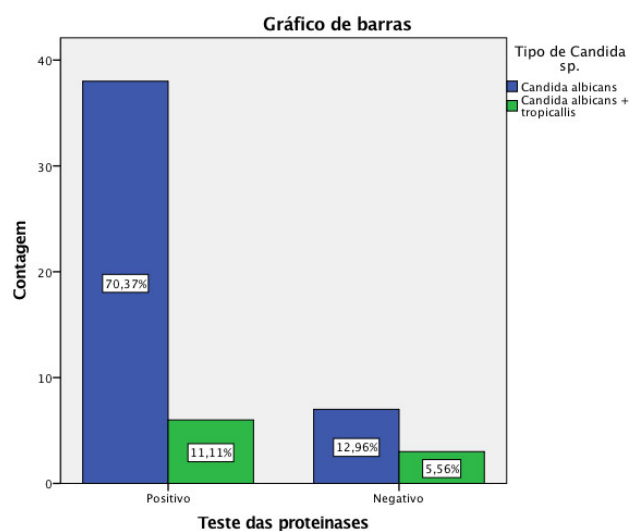


Figura 19 - Gráfico de barras para o valor percentual para a expressão das proteinases no género *Candida* sp..

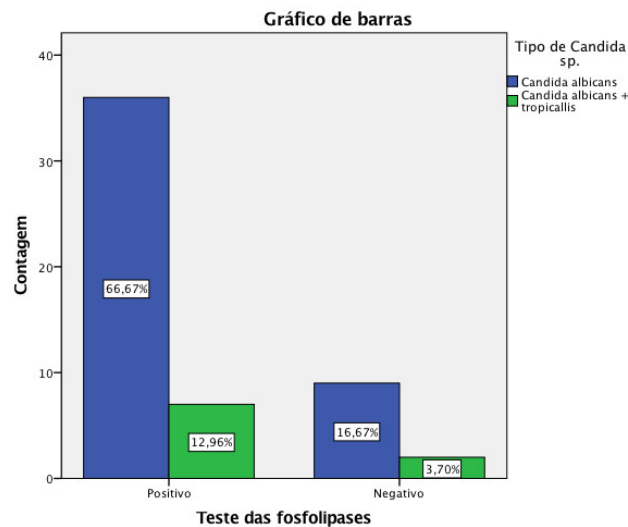


Figura 20 - Gráfico de barras para o valor percentual para a expressão de fosfolipases no género *Candida* sp..

No estudo de Mohan Das (Mohan Das, V., Ballal, M., 2008), assemelha-se aos resultados do presente estudo, na medida, em que na produção de proteinases foi positivo em cerca de (84,8%) dos isolados da espécie *C. albicans* e (6,1%) para isolados da espécie *C. tropicalis*. Na produção de fosfolipases foi positiva em cerca de (66,7%) isolados da espécie *C. albicans*.

No estudo de Andreola (Andreola et al., 2016), *C. albicans* apresentou expressão na atividade das fosfolipases em (33%) dos isolados, no entanto, para as espécies *C. não-albicans* apenas (3%) dos isolados revelaram-se positivos. O que leva a concluir que os isolados de *C. albicans* produzem mais atividade enzimática extracelular do que as espécies *C. não-albicans*. *C. albicans* para além de ser a mais prevalente nos isolados mas também é a que expressa mais virulência.

Candida sp. tem várias particularidades, uma delas, revela-se pelo fato das espécies poderem ser colonizadoras ou serem patogénicas no hospedeiro, produzindo fatores de virulência e causando infeção. O aumento da colonização e adesão de *Candida* sp. ao hospedeiro advém de fatores de predisposição deste como a doença DM e a utilização de prótese dentária. Sendo a maioria das espécies isoladas nos indivíduos com estes fatores de pré-disposição, sejam patogénicas (Williams & Lewis, 2011).

Assim, observou-se no presente estudo, as espécies isoladas neste estudo são na sua maioria patogénicas, ou seja, a maioria dos indivíduos diabéticos e não diabéticos poderá estar infetada com Candidíase.

C. albicans é a espécie mais prevalente neste estudo e em muitos outros, e também conhecida por ser a espécie causadora de infecções Candidíase. Neste estudo, podemos observar que esta espécie é considerada patogénica em cerca de (72,22%) e comensal em (11,11%) na cavidade oral da população estudada. *C. tropicalis* também se manifestou patogénica em (14,81%) dos isolados e comensal (1,85%) também na cavidade oral da população estudada (Figura 21).

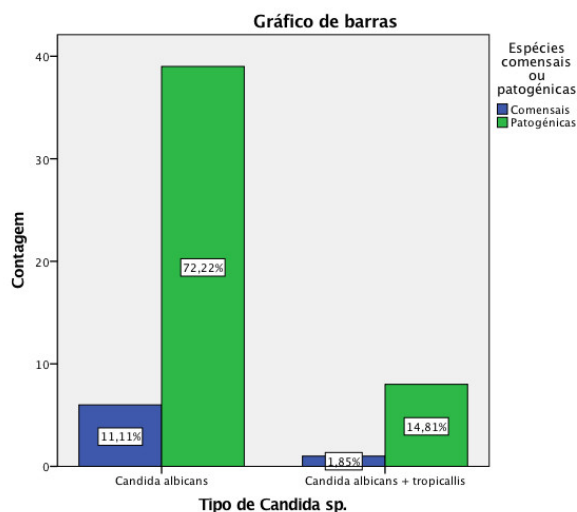


Figura 21 - Gráfico de barras para o valor percentual relativo à patogénica de *Candida sp.*

A maioria dos isolados revelou ser patogénica, assim relativamente ao grupo diabético e não diabético, é importante observar se existe diferença dos isolados. É observado que o grupo diabético contém mais isolados patogénicos (34,39%) que comensais (17,14%) (Figura 22). Ou seja, existem muitos indivíduos diabéticos portadores de próteses removíveis que poderão desenvolver a infeção, Candidíase. Relativamente ao grupo não diabético é observado que também existem mais isolados patogénicos (32,86%) do que comensais (15,71%). No entanto, não existem diferenças estatisticamente significativas entre o grupo diabético e não diabético relativamente ao fato das espécies serem patogénicas ou comensais ($P=0.930$).

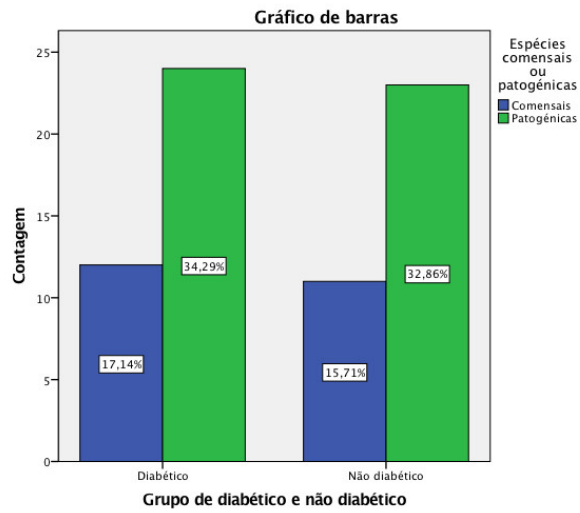


Figura 22 - Gráfico de barras para o valor percentual para o grupo diabético e não diabético em relação à patogenicidade.

V- CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem, que existe uma relação entre a idade avançada (65 anos de idade ou mais) e a presença da doença DM, do mesmo modo, é também sugerido haver uma relação entre a doença DM e a perda dentária. Ou seja, em indivíduos desdentados totais com 65 anos ou mais de idade, existe uma prevalência de diabéticos tipo 2. Neste estudo, como fatores de predisposição foram estudados, o uso recorrente de prótese, a doença DM e a idade devido a serem considerados fatores de predisposição para a colonização por *Candida* sp.. A colonização por *Candida* sp. foi verificada neste estudo, do qual, *C. albicans* foi a espécie mais predominante tanto no grupo diabético e não diabético, devido às suas características morfológicas, à sua capacidade de adesão e de crescimento e de produção de enzimas hidrolíticas. Relativamente à capacidade de expressão das enzimas hidrolíticas, como as proteinases e fosfolipases, os resultados obtidos permitiram constatar que *Candida* sp. é capaz de expressão estes fatores de virulência. Tendo-se verificado que a espécie *C. albicans* foi a que tinha maior capacidade de expressar essas enzimas. Os indivíduos diabéticos e utilizadores de próteses removíveis são mais suscetíveis à infeção (Candidíase) por *Candida* sp., mais especificamente, *C. albicans* a espécie que expressa mais enzimas extracelulares perante a imunossupressão de um indivíduo. Porém, mesmo para as estirpes de *C. albicans* capazes de expressar alguns dos seus fatores de virulência não nos foi possível concluir sobre a patogenicidade das mesmas, visto não se observar correlação clínica. Podemos apenas perspetivar uma forte possibilidade de esta se manifestar no futuro.

Não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas ($P \geq 0.05$) entre os dois grupos de estudo relativamente à colonização de *Candida* sp. e à produção de proteinases e fosfolipases. Em que o fator de predisposição, doença DM, presente no grupo trabalho poderá não ter influência na colonização por *Candida*.

De acordo com estes resultados, considera-se que seja importante a realização de mais estudos, que verifiquem e analisem todos os fatores de virulência existentes no género *Candida* sp.. De forma a perceber e a controlar estas espécies que poderão ser

patogénicas ou comensais em indivíduos imuno debilitados ou em indivíduos saudáveis. São recomendados também mais estudos que expliquem a interação entre biofilmes nas superfícies do hospedeiro e em biomateriais e a prevenção dessa adesão. Desenvolvendo técnicas ou materiais inovadores, por exemplo, diferentes materiais de confecção de próteses dentárias em que os microrganismos não consigam aderir.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akçağlar, S., Ener, Beyza, & Töre, O. (2011). Acid proteinase enzyme activity in *Candida albicans* strains : a comparison of spectrophotometry and plate methods. *Yeast (Chichester, England)*, 35, 559–567. <http://doi.org/10.3906/biy-1002-39>
- American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 34 Suppl 1, S62-9. <http://doi.org/10.2337/dc11-S062>
- Andreola, P., Demathea, A., Galafassia, D., & Estelamari Barbieri Elsemanna, Rogério Brasiliense Elsemanna, A. F. G. (2016). Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral, 45(4), 219–226.
- Balan, P., Castelino, R. L., & Fazil Areekat, B. K. (2015). *Candida* Carriage Rate and Growth Characteristics of Saliva in Diabetes Mellitus Patients: A Case–Control Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospect*, 9(4), 274–279. <http://doi.org/10.15171/joddd.2015.048>
- Bandara, H. M., Yau, J. Y., Watt, R. M., Jin, L. J., & Samaranyake, L. P. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiol*, 10, 125. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2874548/pdf/1471-2180-10-125.pdf>
- Barroso, H., Meliço-Silvestre, A., & Taveira, N. (2014). *Microbiologia Médica*.
- Belazi, M., Velegraki, A., Fleva, A., Gidakou, I., Papanau, L., Baka, D., ... Karamitsos, D. (2005). Candidal overgrowth in diabetic patients: Potential predisposing factors. *Mycoses*, 48(3), 192–196. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01124.x>
- Bhuminathan S., Julius A., M. (2011). Influence of type II Diabetes mellitus on Denture stomatitis. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 8(1), 301–305. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L362543339>
- Bianchi, C., Bianchi, H., Tadano, T. P., Hoffmann-Santos, H., Leite, D., & Hahn, R. (2016). Factores Related To Oral Candidiasis In Elderly Users And Non-Users of Removable, (3), 6–10.
- Byadarahally Raju, S., & Rajappa, S. (2011). Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dentistry*, 2011(Table 2), 487921. <http://doi.org/10.5402/2011/487921>
- Cate, J.M, Ten, Klis, F.M., Pereira-Cenci, T., Crielaard, W., Groot, P. W. J. de. (2009). Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. *Journal of Dental Research*, 88(2), 105–115.
- Correia, L. C., Boavida, J. F., Anselmo, J., Ayala, M., Cardoso, S. M., Costa, A. L., ... Raposo, J. (2015). Diabetes: Factos e Números, o ano de 2014. *Observatório Da Diabetes*.

- Costa, K. R. C. Da, & Candido, R. C. (2007). Diagnóstico Laboratorial da Candidíase Oral. *NewsLab*, 83, 138–145.
- Cristina de Lima, D., Nakata, G. C., Balducci, I., & Almeida, J. D. (2008). Oral manifestations of diabetes mellitus in complete denture wearers. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 99, 60–65. [http://doi.org/10.1016/S0022-3913\(08\)60010-4](http://doi.org/10.1016/S0022-3913(08)60010-4)
- De Rossi, T., Lozovoy, M. A. B., Silva, Rosiane, V., Fernandes, Eduardo, V., Geraldino, Thais, H., Costa, Ivete, C., ... Felipe, I. (2011). Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. *Semina: Ciências Biológicas E Da Saúde*, 32(1), 15–28. <http://doi.org/10.5433/1679-0367.2011v32n1p15>
- Deepa, K., Jeevitha, T., & Michael, a. (2015). In vitro evaluation of virulence factors of *Candida* species isolated from oral cavity. *Academic*, 7(March), 28–32. <http://doi.org/10.5897/JMA2015.0337>
- Di Fiore, R. S., Di Fiore, M. A., Di Fiore, A. P. (2010). *Atlas de Prótese Parcial Removível, Principios Biomecânicos, Bioprotéticos e de Oclusão*. Editora Santos.
- Divya Rani, M., Surya Prabha, P., Lakshmi Priya, R., & Chitrakleha, S. (2014). Prevalence of *Candida* among denture and non denture wearers. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 716–720.
- Dongari-Bagtzoglou, A., Kashleva, H., Dwivedi, P., Diaz, P., & Vasilakos, J. (2009). Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS ONE*, 4(11). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0007967>
- Dorocka-Bobkowska, B., Zozulinska-Ziolkiewicz, D., Wierusz-Wysocka, B., Hedzelek, W., Szumala-Kakol, A., & Budtz-Jørgensen, E. (2010). *Candida*-associated denture stomatitis in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 90(1), 81–86.
- Douglas, L. J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30–36.
- Durán, E. L., Mujica, M. T., Jewtuchowicz, V. M., Finkelievich, J. L., Pinoni, M. V., & Iovannitti, C. A. (2007). Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *Candida albicans* formadores de biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(4), 268–271. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70054-2](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70054-2)
- Fatahinia, M., Poormohamadi, F., & Mahmoudabadi, A. Z. (2015). Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(3), 3–6. <http://doi.org/10.5812/jjm.20893>
- Fortin, M.-F. (2000). *O processo de Investigação*. Lusodidacta.
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(1), 122–143.
- Ishida, K., Ueda-Yamaguchi, M., Yamada-Ogatta, S. F., Ueda-Naklamura, T., Svidzinski, T. I. E., & Nakamura, C. V. (2013). Characterization of *Candida* spp. isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. *Acta Scientiarum. Health Science*, 35(1), 1–8.

<http://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v35i1.13557>

- Kaiser, F. (2010). *PPR no Laboratório* (3^a). Quintessence Editora.
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2015). Harrison's Principles of Internal Medicine. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *II*(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kim, E., Lee, S. G., Choi, Y., Won, K., Moon, J. S., Merchant, A. T., & Lee, H. (2013). Association between diabetes-related factors and clinical periodontal parameters in type-2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*, *13*(1), 64. <http://doi.org/10.1186/1472-6831-13-64>
- Lyon, Juliana, P., & Resende, M. A. (2006). Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, *102*(5), 632–638.
- Martinez, F. F. R., Hernández-Pérez, F., Fabián-San Miguel, G., Jaimes-Aveldañez, A., & Arenas, R. (2013). Oral *Candida* spp carriers: its prevalence in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *88*(2), 222–225. <http://doi.org/10.1590/S0365-05962013000200006>
- Martins, C. H. G., Pires, R. H., Cunha, A. O., Pereira, C. A. M., Singulani, J. de L., Abrão, F., ... Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). *Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. *Fungal Biology*, *120*(4), 530–537. <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.013>
- Martins, M., Henriques, M., Ribeiro, A. P., Fernandes, R., Gonçalves, V., Seabra, A., ... Oliveira, R. (2010). Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Revista Iberoamericana de Micología : Organo de La Asociacion Espanola de Especialistas En Micologia*, *27*(3), 119–124. <http://doi.org/10.1016/j.riam.2010.03.007>
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*(2), 119–28. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3654610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Meurman, J. H., Siikala, E., Richardson, M., & Rautemaa, R. (2007). Non-*Candida albicans* *Candida* yeasts of the oral cavity. *In Vitro*, 719–731.
- Nett, J., & Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(4), 340–345. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.007>
- Nikbin, A., Bayani, M., Jenabian, N., Khafri, S., & Motallebnejad, M. (2014). Oral health-related quality of life in diabetic patients: comparison of the Persian version of Geriatric Oral Health Assessment Index and Oral Health Impact Profile: A descriptive-analytic study. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, *13*(1), 32. <http://doi.org/10.1186/2251-6581-13-32>
- Pereira-Cenci, T., Del Bel Cury, A. A., Crielaard, W., & Ten Cate, J. M. (2008). Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *Journal of*

Applied Oral Science, 16(2), 86–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19089197>

- Pereira Neto, T. A., Silva, M. S. da, & Lemes, R. M. L. (2014). Caracterização fenotípica e perfil de virulência de leveduras do gênero *Candida* obtidas em aulas práticas, 333–343.
- Prakash, B., Shekar, M., Maiti, B., Karunasagar, I., & Padiyath, S. (2015). Prevalence of *Candida* spp. among healthy denture and nondenture wearers with respect to hygiene and age. *Journal of Indian Prosthodontic Society*, 15(1), 29–32. <http://doi.org/10.4103/0972-4052.155041>
- Radford, D. R., Challacombe, S. J., & Walter, J. D. (1999). Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(1), 99–116.
- Ramage, G., Saville, S. P., & Thomas, D. P. (2005). Bio films: an Update†. *Society*, 4(4), 633–638. <http://doi.org/10.1128/EC.4.4.633>
- Salerno, C., Pascale, M., Contaldo, M., Esposito, V., Busciolano, M., Milillo, L., ... Serpico, R. (2011). *Candida*-associated denture stomatitis. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, 16(2).
- Sánchez-Vargas, L. O., Estrada-Barraza, D., Pozos-Guillen, A. J., & Rivas-Caceres, R. (2013). Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of Oral Biology*, 58(10), 1318–1326.
- Sanitá, P. V., Machado, L. A., Pavarina, C. A., Massucato, S. M., Colombo, L. A., & Vergani, E. C. (2012). Microwave Denture Disinfection Versus Nystatin in Treating Patients with Well-Controlled Type 2 Diabetes and Denture Stomatitis: A Randomized Clinical Trial. *The International Journal Prosthodontics*, 25, 232–244.
- Sanitá, P. V., Pavarina, A. C., Giampaolo, E. T., Silva, M. M., de Oliveira Mima, E. G., Ribeiro, D. G., & Vergani, C. E. (2011). *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 111(6), 726–733. <http://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.02.033>
- Santos, J. D. Dos, Piva, E., Vilela, S. F. G., Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2016). Mixed biofilms formed by *C. albicans* and non-*albicans* species: a study of microbial interactions. *Brazilian Oral Research*, 30(1), e23. <http://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0023>
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). Oral Colonization by *Candida Albicans*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Tsang, C. S. P., Chu, F. C. S., Leung, W. K., Jin, L. J., Samaranayake, L. P., & Siu, S. C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology*, 56(10), 1393–1398. <http://doi.org/10.1099/jmm.0.47303-0>
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans*

- Biofilm. *Pathogens and Disease Advance Access*, (410), 1–51. <http://doi.org/10.1093/femspd/ftw018>
- Turano, L. M., Turano, J. C. (2007). *Fundamentos de Prótese Total*. (Editora Santos, Ed.).
- Udayalaxmi, S. (2016). Comparison Between Biofilm Production, Phospholipase and Haemolytic Activity of Different Species of Candida Isolated from Dental Caries Lesions in Children. *J Clin Diagn Res.*, 10(4), 23–25. <http://doi.org/10.7860/JCDR/2016/17019.7643>
- Washington Winn, J., Stephen Allen, William Janda, Elmer Koneman, Gary Procop, Paul Schreckenberger, G. W. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*.
- Williams, David, W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, Michael, A., O. (2010). Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55(1). Retrieved from http://cf5pm8sz2l.search.serialssolutions.com/?ctx_ver=Z39.88-2004&ctx_enc=info:ofi/enc:UTF-8&rft_id=info:sid/summon.serialssolutions.com&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:journal&rft.genre=article&rft.atitle=Candida+biofilms+and+oral+candidosis:+treatment+and+prevention&rft.jtitle=Periodontology+2000&rft.au=Williams,+David+W&rft.au=Kuriyama,+Tomoari&rft.au=Silva,+Sonia&rft.au=Malic,+Sladjana&rft.date=2011-02-01&rft.pub=Blackwell+Publishing+Ltd&rft.issn=0906-6713&rft.eissn=1600-0757&rft.volume=55
- Williams, David, W., Kuriyama, T., Silva, S., Malic, S., & Lewis, Michael, A., O. (2011). Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology 2000*, 55, 250–265.
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3(2011), 1–11. <http://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>
- Zamperini. A. C., M. A. L., & Vergani. C. E., Pavarina. A.C. Giampaolo. E. T., C. N. C. (2010). Adherence in vitro of Candida albicans to plasma treated acrylic resin. Effect of plasma parameters, surface roughness and salivary pellicle. *Oral Biology* 55, 763–770.
- Zomorodian, K., Haghghi, N. N., Rajaei, N., Pakshir, K., Tarazooie, B., Vojdani, M., ... Vosoghi, M. (2011). Assessment of Candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Medical Mycology*, 49(2), 208–11. Retrieved from <http://mmy.oxfordjournals.org/content/49/2/208.full>

Anexos

Anexo 1



Consentimento Informado

Código | IMP:EM.PE.17_02

Monte de Caparica, 13 de Janeiro de 2016

Exmo.(a) Sr.(a),

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária na Unidade Curricular de Projeto Final do(a) Instituto de Ciências da Saúde Egas Moniz, sob a orientação da Professor(a) Doutor(a) Guilhermina Moutinho, solicita-se autorização para a participação no “*Estudo da flora fúngica oral em indivíduos diabéticos portadores de prótese*” da população constituída por pacientes da Clínica Dentária Egas Moniz com o objetivo de investigar em indivíduos diabéticos, desdentados e reabilitados com próteses removíveis, assim como em indivíduos saudáveis, a presença e prevalência de *Candida* spp e estudar genotipicamente os fatores de virulência associados às espécies de *Candida* isoladas.

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

Este estudo pode trazer benefícios tais como saber a presença e prevalência de *Candida* spp. na cavidade oral dos indivíduos diabéticos portadores de prótese e saber se estas espécies isoladas são apenas colonizadoras na cavidade oral ou patogénicas ao progresso do conhecimento.

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

(Riscar o que não interessa)

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

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

Anexo 2



Questionário:

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

Especial atenção, Este questionário, deverá ser questionado verbalmente ao paciente e assinalado pelo aluno que o realizar!

DATA: _____ / _____ / _____

IDADE: _____

SEXO: Masculino Feminino

1 - PORTADOR DE PRÓTESE,

SIM NÃO

SE SIM, DURAÇÃO: _____

1.1- TIPO DE PRÓTESE:

REMOVÍVEL TOTAL

1.2- SE REMOVÍVEL,

CLASSIFICAÇÃO DE KENNEDY: _____

2 - DIABÉTICO,

SIM NÃO

2.1 - QUAL O TIPO? _____

2.2 - ÚLTIMO VALOR DE GLICEMIA: _____

3 - TOMA DE ALGUM DESTES MEDICAMENTOS NOS ÚLTIMOS 6 MESES?

SE SIM, ASSINALAR QUAL:

3.1 - ANTIFÚGICOS

3.2 - ANTIBIÓTICOS

QUAL? _____

QUAL? _____

REALIZADO POR: _____

Anexo 3

Comissão de Ética



Proc. Interno nº 466

Ex.ma Senhora
Catarina Viegas


Monte de Caparica, 17 de fevereiro de 2016.

Ex.ma Senhora,

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

Com os melhores cumprimentos,

A Presidente da Comissão de Ética da Egas Moniz


Prof.ª Doutora Maria Fernanda de Mesquita