



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO LEÔNIDAS & MARIA DEANE-FIOCRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,  
SOCIEDADE E ENDEMIAS DA AMAZÔNIA

CRISTIANO SILVA PONTES

AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA E DO PERFIL DE  
VIRULÊNCIA DE *Candida* spp. BUCAIS ISOLADAS DE  
PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PERIODONTAL E  
DIABETES TIPO 2.

Manaus

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO LEÔNIDAS & MARIA DEANE-FIOCRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE,  
SOCIEDADE E ENDEMIAS DA AMAZÔNIA

CRISTIANO SILVA PONTES

Avaliação da prevalência e do perfil de virulência de *Candida*  
spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença  
periodontal e diabetes tipo 2.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na  
Amazônia da Universidade Federal do Amazonas e  
Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz, como  
requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ormezinda Celeste  
Cristo Fernandes

Manaus

2016

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P814a Pontes, Cristiano Silva  
Avaliação da prevalência e do perfil de virulência de *Candida* spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2. / Cristiano Silva Pontes. 2016  
174 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Ormezinda Celeste Cristo Fernandes  
Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Candida* spp. 2. periodontite. 3. diabetes. 4. proteinase. 5. fosfolipase. I. Fernandes, Ormezinda Celeste Cristo II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CRISTIANO SILVA PONTES

Avaliação da prevalência e do perfil de virulência de *Candida*  
spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença  
periodontal e diabetes tipo 2.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas e Instituto Leônidas e Maria Deane-Fiocruz Amazônia, como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ormezinda Celeste  
Cristo Fernandes

Aprovado em 28 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (ILMD/FIOCRUZ/AM)

Titular: Dra. Suanni Lemos de Andrade (UEA)

Titular: Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura (ILMD/FIOCRUZ/AM)

*Dedico este trabalho a todos que  
trilharam comigo esse longo caminho.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus por todas as graças a mim concedidas e por ter colocado tantas pessoas iluminadas no meu caminho,

Aos pacientes, pela paciência e oportunidade de aprendizado, por terem aceitado participar da pesquisa e terem acreditado neste projeto em benefício daqueles que convivem com o diabetes;

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, essencial na minha formação humana e acadêmica, a quem admiro pelo profissionalismo, pela ética e pela dedicação. Obrigado por ter confiado em mim e por ter me acolhido em um momento tão especial da minha vida. Obrigado pelas palavras de incentivo, puxões de orelha, ensinamentos, apoio, amizade e por me orientar nessa jornada;

À minha família, pela compreensão à minha ausência, por me apoiarem na realização deste sonho;

À Regina, pelo amor imensurável, por me encorajar a buscar novos desafios, por ter estado presente principalmente nos momentos de dificuldades e dar sentido à minha vida;

Aos colegas de laboratório, especialmente Ingrid e Josy pela presteza e pela paciência em dividir comigo suas habilidades com os experimentos;

À Ticiane e Prof. Melo, pela valiosa contribuição no encaminhamento dos pacientes;

Ao Antônio pela contribuição no delineamento da pesquisa, pela atenção a mim dispensada na análise estatística;

Às Enfermeiras do Programa Hiperdia, pelo carinho com que sempre me receberam e pela propaganda positiva feita aos pacientes sobre a pesquisa;

À Dr.<sup>a</sup> Ani Beatriz, sempre disponível para ajudar no que fosse necessário e buscando alternativas para que este projeto se tornasse viável;

À Dr.<sup>a</sup> Suanni pelos ensinamentos e paciência na parte laboratorial;

Aos servidores do Laboratório de Biodiversidade da Fiocruz-AM, pela forma solícita com que atendia;

Aos amigos e colegas dentistas e Auxiliares do CEO-UEA pela ajuda no atendimento aos pacientes, por dividirem seus conhecimentos, e compartilharem suas experiências profissionais e momentos de descontração;

Às secretárias e recepcionistas do CEO-UEA, pela organização da minha agenda e pelo carinho com que tratavam os pacientes;

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane, lugar onde conheci pessoas que se tornaram grandes amigos e mestres, além de fornecer toda a estrutura para realização deste trabalho;

E aos membros da banca examinadora, por dedicaram parte do seu tempo na avaliação deste trabalho e pelas excelentes contribuições realizadas.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

**“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa  
que a fez tão importante?”**

*Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são habitantes comuns da cavidade bucal e podem causar infecção em imunocomprometidos como em Diabéticos. As leveduras podem ser isoladas de bolsa periodontal desses pacientes e originar um quadro de superinfecção. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência e o perfil de virulência quanto à capacidade de aderência e atividade enzimática de proteinase e fosfolipase de *Candida* spp. isoladas da periodontite de pacientes diabéticos atendidos no Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CEO-UEA). Foram coletadas amostras de bolsas periodontais de 30 pacientes diabéticos e situações variáveis de controle glicêmico e 30 pacientes sem diabetes. As amostras foram coletadas com ajuda de swabs e pontas de papel absorvente, e semeados em placas de Petri contendo ágar-Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas à 37°C. Os isolados de *Candida* foram identificados pelas provas clássicas usadas em micologia e submetidas a provas de capacidade de aderência e à atividade de fosfolipase e proteinase. Foram encontradas leveduras em 26,7% dos pacientes. A média de idade dos pacientes do grupo caso e controle foram 56 e 50 anos, respectivamente, havendo diferença significativa entre os grupos ( $p=0,026$ ). Doze indivíduos com diabetes (40%) e quatro pacientes não-diabéticos (13,3%) apresentaram espécies de *Candida*, respectivamente, havendo diferença significativa ( $p=0,041$ ) entre os grupos. O maior número de isolados de diabéticos corresponderam a *C. albicans* (23,3%), seguido de *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%). No grupo controle a maior prevalência também foi de *C. albicans* (6,7%) seguido de *C. krusei* (3,3%), *C. tropicalis* (3,3%). Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p<0,05$ ) que indivíduos não diabéticos. *Candida albicans* e *C. tropicalis* desenvolveram aderência e atividade de proteinase e fosfolipase nos dois grupos testados, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,269$ ). *Candida krusei* apresentou fraca aderência e atividade de proteinase somente no grupo dos diabéticos, e *C. glabrata* isolada de diabéticos apresentou fraca aderência. As cepas de *Candida albicans* e não-*albicans* desenvolveram fatores de virulência sugerindo que a imunossupressão, idade e descontrole glicêmico de pacientes diabéticos podem contribuir para a colonização de leveduras nas bolsas periodontais e consequente progressão da doença periodontal.

**Palavras-chave:** *Candida* spp.; diabetes; periodontite; proteinase; fosfolipase; aderência.

### **ABSTRACT**

*Candida* yeasts are common inhabitants of the oral cavity and can cause infection in immunocompromised as in Diabetics. The yeast may be isolated from periodontal pockets and these patients give a superinfection above. The objective of this study was to evaluate the frequency and virulence profile as the adhesiveness and enzymatic activity of proteinase and phospholipase *Candida* spp. isolated from periodontitis diabetic patients. Periodontal pockets samples of 30 patients with diabetes and glycemic control variables situations and 30 patients without diabetes were collected. The samples were collected with swabs help and absorbent paper points and seeded in Petri dishes containing agar Sabouraud dextrose with chloramphenicol and incubated at 37 ° C. The isolates were identified by classical methods used in mycology. Isolates of *Candida* were subjected to tests of adhesiveness and phospholipase and proteinase activity. Yeasts were found in 26.7% of patients. The average age of the case group and control patients were 56 and 50 years, respectively, with significant difference between groups ( $p = 0.026$ ). Twelve individuals with diabetes had yeast (40%) and four non-diabetic patients (13.3%) with a significant difference ( $p = 0.041$ ) between the groups. The greatest number of isolates in the group corresponding to the case *C. albicans* (23.3%), followed by *C.krusei* (6.7%), *C. tropicalis* (6.7%) and *C. glabrata* (3.3%). In the control group the highest prevalence was also of *C.albicans* (6.7%) followed by *C.krusei* (3.3%), *C. tropicalis* (3.3%). Individuals with diabetes and high blood glucose glycated hemoglobin had a significantly higher percentage of yeasts in periodontal pockets ( $p<0,05$ ) than nondiabetic individuals. *Candida albicans* and *C. tropicalis* developed grip and proteinase and phospholipase activity in the two groups tested ( $p=0,269$ ). *Candida krusei* had a weak grip and proteinase activity only in the diabetic group. Strains of *C. albicans* and non-*albicans* developed virulence factors suggesting that immunosuppression, age and loss of glycemic control in these patients may contribute to the colonization of yeast in periodontal pockets and consequent progression of periodontal disease.

**Keywords:** *Candida* spp.; diabetes; periodontitis; proteinase; phospholipase; adherence

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Histologia do periodonto sadio -----	37
<b>FIGURA 2</b> – Dimensões fisiológicas do periodonto de proteção -----	37
<b>FIGURA 3</b> - Periodonto de sustentação -----	38
<b>FIGURA 4</b> – As duas partes da gengiva: gengiva livre e a gengiva inserida -----	39
<b>FIGURA 5</b> – Visualização da linha mucogengival -----	39
<b>FIGURA 6</b> – As várias fases da organização do ligamento periodontal -----	40
<b>FIGURA 7</b> : Formação da bolsa periodontal -----	42
<b>FIGURA 8</b> - Progressão da doença periodontal .....	42
<b>FIGURA 9</b> – Diferentes sondas periodontais e a recomendada pela OMS -----	43
<b>FIGURA 10</b> – A sonda OMS -----	44
<b>FIGURA 11</b> – Progressão da Doença periodontal -----	45
<b>FIGURA 12</b> - Preservação das amostras em tubos de ensaio contendo ASD -----	60
<b>FIGURA 13</b> - Identificação presuntiva da espécie de <i>Candida</i> spp. de acordo com a variação da coloração da colônia pelo método cromógeno. -----	61
<b>FIGURA 14</b> : Fluxograma de isolamento e identificação dos isolados de <i>Candida</i> spp. -----	61
<b>FIGURA 15</b> : Fluxograma do processo de realização dos testes de pesquisa enzimática -----	63
<b>FIGURA 16</b> - <i>C. albicans</i> isoladas de pacientes diabéticos produtoras de fosfolipase em meio ASD enriquecido com gemas de ovos a 37°C após 72h -----	71
<b>FIGURA 17</b> - <i>C. albicans</i> isoladas de pacientes diabéticos produtoras de proteinases em meio com albumina a 37°C após 7dias -----	72
<b>FIGURA 18</b> - Fraca aderência de <i>C. Krusei</i> (A) e alta aderência de <i>C. Albicans</i> (B) às células epiteliais orais -----	75

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Estimativa dos países com maior número de indivíduos com diabetes em 2000 e 2030 .....	32
<b>TABELA 2</b> – Classificação do Diabetes Mellitus de acordo com a <i>American Diabetes Association</i> .....	34
<b>TABELA 3</b> – Valores de glicose plasmática (mg/dl) para diagnóstico de DM e seus estágios pré-clínicos .....	35
<b>TABELA 4</b> - Relação da HbA1c pelos níveis médios de glicose no sangue .....	36
<b>TABELA 5</b> - Codificação de acordo com o CPI .....	44
<b>TABELA 6</b> - Tabela de registro do CPI .....	45
<b>TABELA 7</b> - Codificação do Índice de Perda de Inserção Periodontal (PIP) .....	45
<b>TABELA 8</b> - Nº de indivíduos que participaram da pesquisa conforme o sexo --	63
<b>TABELA 9</b> - Nº de indivíduos do grupo controle que apresentaram <i>Candida</i> conforme o sexo -----	64
<b>TABELA 10</b> - Faixa etária dos participantes da pesquisa -----	64
<b>TABELA 11</b> - Nº de indivíduos do grupo controle que apresentaram espécies de <i>Candida</i> de acordo com a faixa etária -----	64
<b>TABELA 12</b> - Nº de indivíduos diabéticos que apresentarm <i>Candida</i> segundo a faixa etária -----	65
<b>TABELA 13</b> - Frequência das espécies de <i>Candida</i> na periodontite de indivíduos do grupo caso e controle -----	65
<b>TABELA 14</b> - Prevalência de <i>Candida</i> spp. isoladas da bolsa periodontal de diabéticos e grupo controle -----	68
<b>TABELA 15</b> - Presença de <i>Candida</i> spp. segundo valores de glicemia e hemoglobina glicada -----	70

<b>TABELA 16-</b> Valores de Pz obtidos nos testes de proteinase e fosfolipase dos grupos caso e controle -----	72
<b>TABELA 17-</b> Avaliação da aderência às células epiteliais bucais -----	75

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1-</b> Espécies de <i>Candida</i> isoladas da bolsa periodontal de pacientes diabéticos e controle -----	66
<b>GRÁFICO 2-</b> Espécies de <i>Candida</i> isoladasda bolsa periodontal de pacientes diabéticos -----	66
<b>GRÁFICO 3-</b> Prevalência de espécies de <i>Candida</i> isoladas da bolsa periodontal do grupo controle -----	67
<b>GRÁFICO 4-</b> Presença de leveduras de acordo com a profundidade de sondagem e idade dos grupos pesquisados -----	69
<b>GRÁFICO 5-</b> Leveduras isoladas segundo os valores de glicemia e hemoglobina glicada -----	70
<b>GRÁFICO 6-</b> Distribuição das amostras de <i>Candida</i> provenientes da bolsa periodontal de diabéticos e controle segundo a atividade de proteinase -----	73
<b>GRÁFICO 7-</b> Atividade de fosfolipase das espécies de <i>Candida</i> isoladas da bolsa periodontal de diabéticos -----	73
<b>GRÁFICO 8-</b> Atividade de fosfolipase das espécies de <i>Candida</i> isoladas da bolsa periodontal do grupo controle -----	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AAP	American Association Periodontology
ADA	American diabetes Association
AGEs	advanced glycation end products
ASD	ágar Sabourad dextrose
BP	Bolsa Periodontal
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DL	decilitros
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DP	Doença periodontal
PBS	fosfato em salina
(GJA)	glicemia em jejum alterada
HbA1c	hemoglobina glicosilada
(CPqLMD-Fiocruz)	Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane
(IDF)	International Diabetes Federation
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
(Ig)	Imunoglobulinas

IMC	Índice de massa corporal
(PIP)	Índice de perda periodontal
(CPI)	Índice periodontal comunitário
(IG)	intolerância à glicose
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
(PBS)	profundidade de bolsa periodontal
(PCR)	Reação em cadeia da polimerase
PNS	Programa nacional de saúde
SAB	soro albumina bovina
(SAPs)	aspartil proteinases secretadas
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
YCB	Yeast Carbon base

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	21
2.1 Objetivos específicos	21
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
<b>3.1 Gênero <i>Candida</i></b>	22
3.1.1 Fatores de risco do hospedeiro	24
3.1.2 Fatores de virulência	25
3.1.3 Produção de proteinases e fosfolipases por <i>Candida</i> spp.	25
3.1.4 Tubo germinativo e polimorfismo em <i>Candida albicans</i>	27
3.1.5 Capacidade de adesão a células epiteliais	28
3.1.6 Biofilme dental	30
<b>3.2 Diabetes Mellitus</b>	31
3.2.1 Classificação do diabetes	33
3.2.2 Diagnóstico do diabetes	34
<b>3.3 Periodonto</b>	36
3.3.1 Doença Periodontal	40
<b>3.4 Diabetes e doença periodontal</b>	45
<b>3.5 Interação entre Doença periodontal, diabetes e glicemia</b>	48
<b>3.6 Doença periodontal e <i>Candida</i> spp.</b>	50
<b>3.7 Doença periodontal, Diabetes e <i>Candida</i></b>	53
<b>3.8 Doença Periodontal e fatores de virulência</b>	55
<b>4. METODOLOGIA</b>	57
<b>5- RESULTADOS</b>	63
<b>6- DISCUSSÃO</b>	75
<b>7- CONCLUSÕES</b>	84
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	85
<b>9. Artigo 1</b> Avaliação da prevalência de <i>Candida</i> spp. em pacientes portadores de diabetes tipo 2 e periodontite de um Centro de Especialidades Odontológicas de Manaus	115

<b>10. Artigo 2</b> Estudo da colonização de <i>Candida</i> spp. bucais e seus fatores de virulência na Periodonte de portadores de diabetes tipo 2 .....	137
<b>11. APÊNDICE</b> .....	166
<b>12. ANEXOS</b> .....	169

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* habitam diversos ecossistemas sendo a mucosa bucal considerada um dos principais reservatórios, onde podem se estabelecer como microbiota comensal normal sem causar danos ao hospedeiro (PIZZO et al, 2002). Entretanto, na presença de fatores de predisposição são capazes de se tornarem patogênicas, levando a infecções que podem evoluir de uma lesão superficial na mucosa à disseminação sistêmica (MCMICHAEL et al, 2004; SOUZA et al, 2010); podendo acarretar numa taxa de mortalidade de até 60% relacionadas a candidoses invasivas (EGGIMANN et al., 2003).

Embora *C. albicans* permaneça o agente etiológico mais comum associado à candidoses bucais, verifica-se que outras espécies de *Candida* não *albicans* como *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* também estão envolvidas como importantes patógenos destas infecções fúngicas oportunistas (QI et al., 2005; PFALLER e DIEKEMA, 2007).

A capacidade que as leveduras do gênero *Candida* têm de colonizar, penetrar e fazer danos ao tecido do hospedeiro depende de um equilíbrio entre fatores de virulência deste microrganismo e de fatores específicos ligados ao hospedeiro (PIRES et al., 2001). A maioria das infecções por *Candida* são endógenas e podem resultar da proliferação ou alterações da microbiota humana determinada por fatores de risco tais como a imunossupressão, uso prolongado de antibióticos e tratamentos que comprometam o estado imunológico dos indivíduos, permitindo que esse microrganismo se tornem oportunistas e desencadeiem quadros infecciosos (PAUW; PICAZO, 2008).

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica, caracterizada pelo aumento do nível glicêmico no sangue, a hiperglicemia, que pode acarretar em alterações no organismo, interferindo na resposta fisiológica do indivíduo, no sistema vascular periférico, na resposta inflamatória, no sistema imunológico e, conseqüentemente, na reparação tecidual. Todos esses efeitos acabam por modificar a susceptibilidade do diabético às infecções bucais, geralmente relacionadas com fungos, especialmente *Candida* (KUMAR et al., 2005).

Dentre as implicações bucais do diabetes pode-se destacar o aumento da severidade da doença periodontal (LÖE, 1993), ocorrência da diminuição do fluxo salivar

ou xerostomia, sensação de queimação ou ardência bucal (NISHIMURA, 1998), sendo que a frequência e a gravidade das manifestações clínicas são resultantes da gravidade e da duração do diabetes.

A doença periodontal é caracterizada como um processo inflamatório que acomete os tecidos de sustentação dos dentes, tendo como fator etiológico primário o biofilme bacteriano. A manutenção da integridade dos tecidos periodontais depende do equilíbrio dinâmico entre uma agressão microbiana e/ ou traumática e a resposta do organismo. O desequilíbrio neste mecanismo associado a um comprometimento sistêmico pode exacerbar uma reação inflamatória prévia, levando a uma severa destruição tecidual (TAYLOR et al., 1998).

Além disso, as evidências indicam uma forte correlação entre a severidade da doença periodontal e diabetes, com base no fato de que a infecção periodontal está associada com controle glicêmico inadequado neste grupo específico de pacientes (TAYLOR; BORGNAKKE, 2008), e que a taxa de aumento da ocorrência de leveduras está associada a pacientes imunocomprometidos com doenças periodontais, tais como diabéticos (WILLIS et al., 2000; MANFREDI et al., 2002).

A patogenicidade da *Candida* na doença periodontal pode ser auxiliada pela capacidade de adesão e habilidade de algumas espécies deste gênero produzirem fatores de virulência, como enzimas hidrolíticas (proteínases, fosfolipases), contribuindo na destruição e invasão do tecido hospedeiro (PENHA et al., 2000; KAWECKI et al., 2006, MARDEGAN et al., 2006). Em portadores de DM, pode haver diminuição da função dos leucócitos polimorfonucleares, predispondo esses indivíduos a maior severidade de infecções por *Candida* (URZÚA et al., 2008).

Alguns fatores como a presença de leveduras na doença periodontal, o tipo do diabetes, e o grau de controle glicêmico do paciente têm sido associados com indivíduos diabéticos e microrganismos bucais, entretanto, apesar do relevante papel que as espécies de *Candida* têm desempenhado na ecologia da cavidade bucal, há carência de estudos sobre a distribuição e o papel desses microrganismos na doença periodontal de indivíduos imunocomprometidos, principalmente em diabéticos.

## **2. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar a prevalência e perfil de virulência de *Candida* spp. bucais em portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Isolar espécies de *Candida* da região periodontal de pacientes diabéticos e não diabéticos com periodontite de um Centro de Especialidade Odontológica de Manaus,
- Correlacionar glicemia com as espécies de *Candida* coletadas de bolsas periodontais de diabéticos,
- Avaliar o perfil de virulência dos isolados de *Candida* quanto à capacidade de aderência a células epiteliais bucais e à atividade enzimática das enzimas proteinase e fosfolipase.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 GÊNERO *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas em variados ecossistemas, fazendo parte da microbiota de homens e animais. Esses microrganismos degradam proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, elementos essenciais para seu desenvolvimento (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

Devido a sua capacidade adaptativa, as leveduras podem desenvolver-se tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose. Na maioria das vezes se reproduzem de maneira assexuada, por meio de estruturas denominadas blastósporos, entretanto algumas espécies se multiplicam sexualmente (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

*Candida* é classificada taxonomicamente no reino Fungi, Filo Ascomycota, classe Ascomycetes, família Saccharomycetaceae. De acordo com SIDRIM e ROCHA (2004), o gênero *Candida* é o principal entre as leveduras patogênicas, compreendendo aproximadamente 200 espécies.

*C. albicans* é considerada a principal levedura patogênica oportunista por ser a espécie mais frequentemente isolada em humanos (ANGIOLELLA *et al.*, 2008). Entretanto, nas últimas décadas tem sido observado significativo aumento de outras espécies: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. rugosa*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. catenulata*, *C. utilis*, *C. viswanathii* e *C. zeylanoides*. Essas e outras espécies, conhecidas como não-*albicans*, têm sido cada vez mais implicadas em processos infecciosos em humanos (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Na cavidade bucal, muitas espécies já foram isoladas, sendo reconhecidas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* como os principais agentes de processos patogênicos (CANNON *et al.*, 1995)

Segundo Yang (2003), *Candida albicans* continua sendo a espécie mais prevalente, mas espécies de *Candida* não *albicans*, como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, têm sido identificadas em candidoses bucais com importante frequência (VILLAR *et al.*, 2004).

*Candida albicans* é considerada uma das espécies mais virulenta e adaptada à cavidade bucal, sobrevivendo e proliferando em vários nichos ecológicos fornecidos pelo hospedeiro humano (CALDERONE e FRONZI, 2001). É a mais frequente em infecções fúngicas superficiais e invasivas, e a maioria dos isolados apresentam sensibilidade a antifúngicos de uso sistêmico. Entretanto, foram descritos alguns casos de resistência adquirida a alguns azólicos de uso prolongado (SANGLLARD et al., 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

*C. tropicalis* está presente tanto no ambiente quanto na microbiota humana, e o mecanismo de transmissão é predominantemente endógeno. A maioria dos pacientes colonizados por essa espécie podem desenvolver infecções sistêmicas (BARCHIESI et al., 2000).

*C. glabrata* é uma levedura presente no ambiente hospitalar, sendo a terceira espécie do gênero mais prevalente em hemoculturas e a segunda mais isolada da cavidade oral de indivíduos HIV positivos (DIEKEMA et al., 2002; SANGUINETTI et al., 2005; PFALLER et al., 2009). Estudos indicam que cerca de 9% dos isolados clínicos de *C. glabrata* apresentaram resistência ao fluconazol e 37 a 40% ao itraconazol, além de apresentarem menos susceptibilidade à anfotericina B ((DIEKEMA et al., 2002; SANGUINETTI et al., 2005).

*C. krusei* é responsável por cerca de 2 a 3% dos casos de candidemia em ambiente hospitalar (WINGARD, 2002), sendo associada a indivíduos neutropênicos, que realizaram transplante de medula óssea e ao uso do fluconazol (PFALLER et al., 2008). Apresenta resistência intrínseca ao fluconazol e sensibilidade reduzida à anfotericina B, mas susceptível in vitro ao voriconazol e às equinocandinas (DIEKEMA et al., 2002; HAKKI et al., 2006).

*C. dubliniensis* é fenotipicamente semelhante à *C. albicans*, apresenta maior resistência aos azóis e é menos virulenta (SULLIVAN et al., 1997; NOEL et al., 2003). Relacionada com infecções em pacientes portadores de HIV, sendo isolada com frequência da mucosa oral e vaginal desses indivíduos (NOEL et al., 2003).

Num estudo realizado com o objetivo de diagnosticar leveduroses em pacientes imunocomprometidos incluindo diabéticos, dos 104 pacientes analisados, 19 apresentaram episódios de levedurose. *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida*

*tropicalis* e espécies emergentes como *Candida krusei* e *Candida guilliermondii* foram isoladas, comprovando-se que espécies emergentes têm alterado o perfil epidemiológico de infecções nesses pacientes (MACEDO et al., 2009).

### 3.1.1 Fatores de risco do hospedeiro

Inúmeros fatores ligados ao hospedeiro têm sido relacionados como facilitadores para o desenvolvimento de infecções fúngicas invasivas. Entre os mais importantes estão o uso de antibióticos de largo espectro, tempo prolongado de internação hospitalar, neutropenia, nutrição parental, sonda vesical, ventilação mecânica, cateter venoso central e colonização de vários sítios anatômicos por leveduras (DIGNANI et al., 2003). O estado fisiológico do hospedeiro tem sido reconhecido como a condição primária para a ocorrência de candidoses, mais do que a virulência intrínseca do microrganismo oportunista (NAGLIK et al., 1999).

Segundo Pappas et al. (2003), merecem ser destacados a idade elevada, imunossupressão, insuficiência renal, diabetes, quimioterapia, radioterapia, lesão de mucosas, hemodiálise, cirurgia prévia e corticoterapia.

Hospedeiros imunossuprimidos e a alta virulência de *C. albicans* são uma combinação ideal que favorece o seu surgimento como importante agente de doenças em humanos (ANGIOLELLA et al., 2008). Mudanças fisiológicas no organismo, como gravidez e infância, fatores nutricionais, tratamentos com antibióticos de amplo espectro, drogas imunossupressoras são fatores que predispõem a infecções por *Candida* spp. (KLEINEGGER et al., 1996; TEKELI et al., 2004). Alterações anatomofisiológicas bucais, como macroglossia, doenças respiratórias e comprometimento simultâneo da resposta imunológica inata e adquirida, além de fatores locais, como xerostomia e aparelhos protéticos, são condições que predispõem ao desenvolvimento de infecções e aumentam a susceptibilidade a processos infecciosos, inclusive àqueles causados por leveduras do gênero *Candida* (CARSLEDT et al., 1996; SANITÁ et al., 2009).

Além desses fatores, a hipofunção das glândulas salivares, a diminuição do fluxo ou do pH salivar, diabetes mellitus, pacientes com câncer em estágio avançado, uso de quimioterápicos e HIV positivos também constituem fatores de risco para candidemias (VARGAS & JOLLY, 2002; PEIXOTO et al., 2010). Estudos em pacientes diabéticos demonstraram uma maior prevalência de *Candida* na cavidade bucal quando comparados

aos pacientes não diabéticos, como mostrou o estudo de Sardi et al. (2008), que verificaram maior frequência de espécies de *Candida* nos pacientes diabéticos com periodontite crônica.

### **3.1.2 Fatores de virulência**

A virulência de leveduras do gênero *Candida* pode estar relacionada a vários fatores como a adesão às células do hospedeiro, alterações fenotípicas e capacidade de produzirem enzimas hidrolíticas, principalmente proteinases e fosfolipases (AL-ABEID et al., 2004; NIKAWA et al., 2006; MENEZES, 2014).

Muitos fatores de virulência têm sido propostos na patogenicidade das espécies de *Candida*, sendo que a adesão às células do hospedeiro, secreção de enzimas hidrolíticas, formação de hifas e desenvolvimento de biofilme aparentemente têm maior importância (WILLIAMS et al., 2011).

### **3.1.3 Produção de proteinases e fosfolipases por *Candida* spp.**

As leveduras são capazes de secretar enzimas extracelulares que destroem as membranas celulares do hospedeiro, favorecendo posterior invasão tecidual (FURLANETO-MAYA, 2008). As principais enzimas produzidas tanto por *C. albicans* quanto não *albicans* são as fosfolipases e proteinases (ÁLVARES et al., 2007; NAVES et al., 2013; RIBEIRO, 2008).

As fosfolipases são um grupo de enzimas cuja secreção, em *C. albicans*, é regulada pelo gene PLB1. Esta expressão é afetada por fatores nutricionais, condições do ambiente (temperatura e pH) e fase de crescimento da levedura. Fosfolipídios presentes na membrana das células humanas e animais são os substratos (OMBRELLA et al., 2008).

As fosfolipases são possuidoras de dupla importância na ação infecciosa de *C. albicans*, mediante participação no controle de crescimento do fungo, em decorrência da sua presença nas extremidades das formas miceliais e atuação também na danificação dos constituintes lipídicos da estrutura celular integrantes da superfície da mucosa infectada (GHANNOUM e ABU-ELTEEN 1990). Essas enzimas agem clivando os fosfolipídeos, prejudicando a estabilidade da membrana e ocasionando lise celular. A produção de fosfolipases concentra-se nas pontas das hifas e a atividade de produção é maior quando a hifa está em contato direto com a membrana, o que sugere que essas enzimas são

importantes na invasão tecidual por *C. albicans* (GHANNOUM e ABU-ELTEEN, 1990; NIEWERTH e KORTING, 2001).

Leveduras de *C. albicans* isoladas de diversos materiais biológicos de diabéticos, fumantes e indivíduos com câncer, HIV positivos e com síndrome de Down demonstraram um percentual oscilando de fosfolipases entre 73,3 e 97,9% dos isolados estudados (CÂNDIDO, 1991; QUIRINO, 1990; RIBEIRO et al., 2002; SILVEIRA, 1993; SOUZA, 1990).

Dentre as importantes enzimas de *Candida* que degradam tecidos estão as fosfolipases e aspartil proteinases secretadas (SAPs). Sete tipos de genes de fosfolipases (PLA, PLB1, PLB2, PLC1, PLC2, PLC3 e PLD1) e 10 de SAP (SAP1 a SAP10) têm sido identificados em *Candida albicans*. Apesar do seu papel na patogênese da doença periodontal não ter sido esclarecido, sabe-se que as fosfolipases podem estar envolvidas na invasão tecidual por degradar fosfolipídios, causando lise na membrana da célula do hospedeiro (SAMARANAYAKE et al., 2006).

As proteinases são classificadas em 4 classes, com base no mecanismo catalítico: cisteínas, serinas, aspárticas e metaproteinases. As proteinases aspárticas são isoladas de várias espécies fúngicas e algumas leveduras, como *C. albicans*, adaptaram essa propriedade bioquímica para realizar funções especializadas durante o processo de infecção em humanos e animais (NAGLIK et al., 2004).

As proteinases são reguladas por uma família de genes SAP. Possuem atividade proteolítica, ou seja, usam proteínas como substrato. Degradam colágeno, queratina, peptídeos localizados na superfície de mucosas e podem, ainda, atuar sobre componentes do sistema imunológico, como imunoglobulinas, complemento e citocinas, facilitando a invasão das leveduras aos tecidos do hospedeiro (KUMAR G; KUMAR S; MENON, 2006).

A produção de proteinases aspárticas está relacionada à habilidade para aderir e colonizar tecidos do hospedeiro e está envolvida na invasão e destruição celular (YANG, 2003). De acordo com Oksuz et al. (2007), a capacidade de *Candida* spp. causar infecção é devido à produção de numerosas enzimas, entre elas as proteinases e as fosfolipases.

Diversos estudos têm demonstrado a relação entre o aumento na síntese e a atividade das enzimas extracelulares fosfolipases e proteinases, com a elevação do

potencial patogênico das leveduras, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves (CORREA et al., 2010).

Numa avaliação da frequência e da atividade enzimática de *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes diabéticos atendidos no Serviço de Endocrinologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC/UFC), foram coletadas amostras de 48 pacientes diabéticos, de ambos os sexos, com situações variáveis de controle glicêmico, tendo como resultado 15 amostras (31,25%) do gênero *Candida*. A espécie mais frequente foi a *C. albicans*, com 80%, seguida de *C. tropicalis* (13,3%) e *C. guilliermondii* (6,7%). Quanto à pesquisa da atividade enzimática de *Candida* spp., foi observado que 86,6% delas apresentaram atividade de proteinase e 80% de fosfolipase (MENEZES et al., 2007).

### **3.1.4 Tubo germinativo e polimorfismo em *Candida albicans***

A capacidade da levedura em alterar sua morfologia dependendo das condições de temperatura e do pH é denominada polimorfismo celular. Isso ocorre em *C. albicans*, que pode apresentar-se sob a forma arredondada denominada blastoconídeo, ou formando pseudo-hifas ou hifas e micélios verdadeiros.

Estudos relatam que a produção das estruturas micelianas (hifas) eleva a capacidade de aderência da levedura aos tecidos do hospedeiro devido ao aumento da superfície de contato do mesmo, conseqüentemente facilitando a invasão tecidual e levando à disseminação das leveduras a órgãos internos do corpo humano. Portanto, as hifas têm sido relacionadas com as formas mais virulentas, que possivelmente ocorrem devido à resposta de *C. albicans* ao estresse ambiental (CALDERONI, 2001; ODDS, 1994).

Pseudo-hifa é outra estrutura morfológica observada em *C. albicans*, produzida durante sua reprodução por brotamento, na qual os brotos não se destacam da célula-mãe, ocorrendo, então, um encadeamento de células, cuja forma lembra uma hifa (ALMEIDA e SCULLY, 2002). O tubo germinativo é um prolongamento contínuo da célula-mãe leveduriforme produzido no início do processo de filamentação, sendo considerado uma forma de transição entre a levedura e o micélio verdadeiro.

Estudos sugerem que cada uma dessas formas contribui de alguma maneira para a virulência de *C. albicans* sobre os tecidos do hospedeiro (KUMAMOTO e VINCES,

2005). A capacidade de alteração fenotípica morfológica é um dos mais importantes mecanismos encontrados na patogênese da candidíase.

CONSOLARO et al., (2005) demonstraram que na candidíase vulvovaginal a produção de tubo germinativo foi significativamente maior no grupo das mulheres sintomáticas do que no das assintomáticas.

DAMBROSO et al., (2009) também comprovaram o aumento da porcentagem de formação de tubo germinativo e do tamanho desta estrutura em *C. albicans* isoladas de um grupo de pacientes submetidos a tratamento de radioterapia.

Num estudo realizado para investigar a produção de tubo germinativo e atividade das enzimas fosfolipase e proteinase de isolados de *C. albicans* na corrente sanguínea de 153 pacientes imunocomprometidos, quantidades detectáveis de proteinase foram produzidas por 97% dos isolados, e 78% dos isolados produziram fosfolipase. Tubos germinativos foram produzidos por 95% dos isolados, concluindo-se que os isolados de *C. albicans* podem causar infecção em condições favoráveis (MATTEI et al., 2013).

Num estudo sobre a invasão de *C. albicans* nos tecidos periodontais de pacientes com periodontite, Jarvensivu et al. (2004) observaram que alterações ambientais podem favorecer a germinação de hifas possibilitando maior capacidade de aderir e penetrar nos tecidos do hospedeiro. Além disso, *C. albicans* poderia ter um papel na infra-estrutura do biofilme subgengival e na sua adesão aos tecidos periodontais, pois são mais resistentes aos mecanismos imunes do que os demais microrganismos.

### **3.1.5 Capacidade de adesão a células epiteliais**

A capacidade dos microrganismos de aderirem a células, tecidos ou outro tipo de superfície, é um pré-requisito para a colonização de um determinado sítio e causa de uma subsequente infecção. Nesse contexto, de acordo com Calderoni & Fonzi (2001), a adesão parece ter papel inicial e fundamental no estabelecimento e desencadeamento do processo infeccioso.

Para que ocorra adesão, o primeiro estágio depende da aproximação ou do contato inicial entre a parede celular da levedura e a superfície da célula do hospedeiro ou de materiais médico-hospitalares. Esse processo está condicionado à interferência de fatores biológicos e não biológicos.

Entre os principais fatores não biológicos são reconhecidas as interações químicas que ocorrem entre as macromoléculas, como as forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e pontes de hidrogênio (DUNNE, 2003). Em relação aos fatores biológicos, a adesão é mediada por mecanismos moleculares específicos, principalmente por meio de proteínas chamadas de adesinas. Essas estruturas aumentam a capacidade do fungo em aderir a superfícies inanimadas ou células/tecidos animais (NOBILE, 2008).

Adesinas são biomoléculas que promovem a aderência de *Candida* às células ou ligantes do hospedeiro. Incluem proteínas da família Als, Hwp1p, Eap1p, Csh1p e outros receptores de superfície celular (KARKOWSKA-KULETA; KOZIC, 2009).

A aderência é o início do estabelecimento de uma infecção, e os patógenos fúngicos são capazes de aderirem a diversos tipos celulares e interagirem com componentes da matriz extracelular do hospedeiro (LYON; RESENDE, 2006; NIKAWA et al., 2006).

A aderência de *Candida* spp. às células do hospedeiro é obtida pela combinação de mecanismos específicos representados pela interação entre o ligante e o receptor e não específicos pela agregação, hidrofobicidade da superfície celular e interações eletrostáticas. Além disso, parece ser modulada por uma ampla variedade de adesinas que são expressas na superfície da parede celular (MANFREDI et al., 2006).

A adesão parece ter papel inicial importante e fundamental no processo de infecção. Resende & Lyon (2006) avaliaram a capacidade de adesão de vinte isolados de *C. tropicalis*, catorze de *C. glabrata* e oito de *C. parapsilosis* obtidas da cavidade bucal de pacientes usuários de prótese com e sem sinais de candidíase. O estudo revelou os isolados dos pacientes com candidíase aderiram intensamente a estas células em relação aos pacientes sem a doença. *C. albicans* foi a espécie com maior capacidade de adesão, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*.

Quanto à interação de *Candida* spp. com as células epiteliais, acredita-se que a produção de pseudo-hifas aumente o poder de aderência e de invasão tecidual, permitindo às leveduras o acesso a estruturas e órgãos na profundidade do corpo (CALDERONI e FONZI, 2001). A forma de blastósporos também tem sido encontrada na superfície celular, bem como entre as células do hospedeiro (PARK et al., 2005).

PIZZO et al. (2002) sugeriram que a heterogeneidade de cepas de *Candida* na bolsa subgengival não é apenas resultado do seu espalhamento na saliva ou no biofilme, mas também da sua capacidade de adaptação à bolsa, desenvolvendo diferentes propriedades de virulência para sua sobrevivência em ambientes hostis.

Após a levedura aderir à superfície, novos microrganismos costumam interagir, promovendo a formação de uma comunidade plural de seres microscópicos, em que há dependência metabólica de grau variável entre seus constituintes, caracterizando, assim, a estrutura conhecida como biofilme (RAMAGE et al., 2001).

### **3.1.6 Biofilme dental**

O biofilme é constituído por um conjunto de microrganismos distintos que convivem em associação. Nas últimas décadas, bacteriologistas e, mais recentemente, micologistas têm observado que os micro-organismos praticamente não existem na sua forma livre, planctônica nos tecidos do hospedeiro, mas se agrupam formando uma comunidade multicelular e plural, tanto sob os tecidos quanto em próteses, cateteres e outras superfícies (SOLL, 2008).

O primeiro evento imprescindível no processo de formação de biofilme é a adesão microbiana, à qual se segue o processo de maturação do biofilme (RAMAGE et al., 2001). Após a aproximação da levedura com o substrato, inúmeros acontecimentos físico-químicos tornam possível a adesão inicial do micro-organismo a esta superfície. Finda a etapa de adesão, o biofilme sofre um processo de maturação.

Em um biofilme maduro coexistem muitas microcolônias constituídas por distintas espécies de leveduras, que são envolvidas por uma matriz extracelular na qual ocorre a passagem de água e nutrientes. Segundo Douglas (2004), os biofilmes maduros com um crescimento de 24 a 48 horas consistem em uma rede densa de células sob a forma de leveduras e pseudo-hifas, além da presença facultativa de bactérias.

Em suma, essa tendência natural dos microrganismos conviverem em comunidade formando biofilme ocorre devido às vantagens conferidas quando estão em associação. Entre os benefícios da comunidade destacam-se a maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e a ação de antimicrobianos, favorecendo o estabelecimento do processo patogênico. Pádua et al. (2008) mostraram que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

tiveram maior capacidade de aderência a cateter urinário quando na presença de *C. albicans*, mostrando que a interação entre espécies fornece benefícios mútuos.

### 3.2 DIABETES MELLITUS

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA, 2013), o diabetes é um termo usado para descrever um grupo de desordens metabólicas distinguidas por tolerância alterada da glicose e metabolismo de carboidrato alterado. Tem como característica principal o excesso de glicose no sangue e, quando não controlada, pode ocasionar complicações sistêmicas crônicas, como, por exemplo: problemas renais, oculares e vasculares, entre outras.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença de relato milenar, acompanhando a humanidade até os dias de hoje. É um importante problema mundial de saúde com altos custos envolvidos no controle e no tratamento de suas complicações. Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), 4,8 milhões de pessoas tiveram a morte atribuída à doença, e mais de 471 bilhões de dólares foram gastos com tratamentos para diabetes. Estima-se que metade dos indivíduos diabéticos ainda não foi diagnosticada, aumentando o número de pessoas com complicações e mortalidade decorrentes da patologia (IDF, 2012).

Em 1985, estimava-se que houvessem 30 milhões de adultos com diabetes no mundo; este número cresceu para 135 milhões em 1995 (OMS, 1999). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima uma prevalência de 387 milhões de pessoas diabéticas, representando 7% da população mundial e há projeção que ela se torne a sétima causa de morte de indivíduos portadores no ano de 2030, dos quais, dois terços estariam em países em desenvolvimento (MATHERS; LONCAR, 2006; OMS, 2014).

No Brasil, estima-se que 6,2% da população geral seja portadora de diabetes (IBGE, 2013), corroborando com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), que considerou um número de diabéticos no país estimado em 11,9 milhões em 2014. Em Manaus, estima-se 2000 pessoas com diabetes, sendo 400 portadores de diabetes tipo I e 1400 de diabetes tipo 2 (SIAB-DATASUS, 2016).

Segundo informações do Sistema Único de Saúde do Ministério da Saúde (SUS/MS, 2013), no Brasil o DM aparece como a sexta causa primária de internações hospitalares e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outros fatores causadores

de internamento, como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatia, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial. A Tabela 1 mostra os 10 maiores países em números de indivíduos com diabetes no ano de 2000 e sua projeção para 2035.

**Tabela 1** – Estimativa dos países com maior número de indivíduos com diabetes em 2000 e 2035.

Ano		2000		2035
Posição	País	Nº de indivíduos (milhões)	País	Nº de indivíduos (milhões)
1º	Índia	31,7	Índia	79,4
2º	China	20,8	China	42,3
3º	EUA	17,7	EUA	30,3
4º	Indonésia	8,4	Indonésia	21,3
5º	Japão	6,8	<b>Brasil</b>	19,2
6º	Paquistão	5,2	Paquistão	13,9
7º	Rússia	4,6	Bangladesh	11,1
8º	<b>Brasil</b>	4,6	Japão	8,9
9º	Itália	4,3	Rússia	7,8
10º	Bangladesh	3,2	Egito	6,7

Fonte: WILD et al. (2004)

### 3.2.1 Classificação do diabetes

O diabetes é classificado em dois tipos, diabetes tipo 1 (DTM1) ou insulino dependente e diabetes tipo 2 (DTM2) ou não insulino dependente. O DTM1 é causado pela destruição autoimune mediada por células que leva à incapacidade na produção de insulina. Geralmente acomete pessoas jovens e ocorrências de cetoacidose. Por outro lado, o DTM2 é resultante da combinação de um aumento na resistência das células à insulina endógena com uma secreção defeituosa dessa substância (BASCONES-MARTINEZ, 2011). O DTM2 é mais comumente ligado à obesidade, que contribui para a resistência à insulina através da elevação dos níveis de ácidos graxos livres circulantes, derivados dos adipócitos. Estes ácidos graxos livres inibem a captação de glicose, síntese de glicogênio e glicólise. Em muitos indivíduos obesos, a resistência à insulina é compensada pelo aumento na produção desta. Contudo, em um terço destes indivíduos há um aumento acentuado na apoptose de células  $\beta$ , com redução de sua quantidade,

resultando na produção inadequada de insulina (BASCONES-MARTINEZ, 2011; BRANDÃO et al., 2011).

A faixa etária inicial que acomete o DTM2 é variável pois sua detecção habitualmente ocorre tardiamente, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência aos 60 anos. Estima-se que o diagnóstico do DTM2 se faça, em média, com um atraso de aproximadamente quatro a sete anos, permitindo muitas vezes que complicações micro e macro vascular já tenham se estabelecido. Estudos que aliam a obesidade à idade superior a 40 anos indicam este ponto de corte da idade como discriminatório entre os dois tipos de diabetes. (GROSS et al., 2002).

O DTM2 tem afetado mais de 250 milhões de pessoas no mundo inteiro e sua prevalência deve aumentar ainda mais futuramente (NELSON, 2008). Segundo a OMS (2014), o DTM2 representa aproximadamente 90% das pessoas com diabetes no mundo.

Segundo Maia (2005) a ADA no ano 2000 removeu a classificação do Diabetes Mellitus baseada no tratamento e na idade (insulino-dependente e não insulino-dependente) e introduziu um sistema baseado na etiologia da doença, classificando a DM em quatro tipos (Tabela 2).

**Tabela 2** – Classificação do Diabetes Mellitus de acordo com a American Diabetes Association (2010).

TIPO	CARACTERÍSTICAS
1	Destruição das células beta → deficiência absoluta de insulina, natureza autoimune ou idiopática.
2	Pode ser devido à resistência à insulina (deficiência) ou defeito secretório predominante (pequena resistência à insulina).
	<p>Outros tipos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Defeitos genéticos na função das células beta, caracterizados por mutação,</li> <li>• Defeitos genéticos na ação de insulina,</li> <li>• Endocrinopatias,</li> <li>• Doenças do pâncreas exócrino,</li> <li>• Diabetes induzida por drogas ou produtos químicos,</li> <li>• Diabetes relacionada a infecções,</li> <li>• Outras síndromes genéticas associadas com diabetes: síndrome de Down, síndrome de Turner,</li> <li>• Formas incomuns de diabetes imunologicamente mediadas de anticorpos anti-receptor insulínico.</li> </ul>
	Gestacional- hiperglicemia diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez. Quadro revertido para níveis normais de glicose após o parto, mas com risco de desenvolver diabetes posteriormente.

### 3.2.2 Diagnóstico do diabetes

De acordo com a ADA (2010), há três formas de diagnosticar o diabetes:

- através dos sintomas, como polidipsia, poliúria, perda de peso inexplicável,
- glicemia em jejum >126mg/dl, sendo que entende-se por jejum ausência de ingestão calórica por no mínimo 8 horas.
- teste de tolerância à glicose oral, sendo realizado através da determinação da glicemia 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose anidra dissolvida em água;

Os valores de referência para diagnóstico de diabetes estão na Tabela 3.

**Tabela 3** – Valores de glicose plasmática (mg/dl) para diagnóstico de DM e seus estágios clínicos

Valores de glicose plasmática (mg/dl)			
Categoria	Jejum*	2hs após ingestão de 75g de glicose	Casual**
Glicemia normal	< 100	<140	
Tolerância diminuída à glicose	>100< 200	≥ 140 < 200	
Glicemia de jejum alterada	>100<126	<140	
Diabetes Melittus	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos) ***

Fonte: (adaptado da Associação brasileira de diabetes, 2010).

Algumas pessoas podem ainda apresentar níveis de glicose que não obedecem aos valores adotados como critérios para o diabetes, mas ainda assim, esses valores são considerados demasiadamente altos para serem considerados normais. As pessoas que se inserem neste grupo, são classificadas em uma condição chamada “pré-diabetes”, esse termo abrange tanto a glicemia em jejum alterada (GJA) com a intolerância à glicose (IG) (ADA, 2010).

No quadro evolutivo para o DM, podem ocorrer estágios intermediários denominados tolerância diminuída à glicose e glicemia de jejum alterada. A presença de uma dessas condições estabelece maior risco de progressão não só para o desenvolvimento do diabetes, mas também de doenças cardiovasculares (DAVIES et al., 2005). Os critérios diagnóstico desses estágios estão no quadro 3. Vale ressaltar que ambos os estágios pré-diabéticos podem ter três possíveis evoluções: mantém-se o quadro indefinidamente, evolui para diabetes ou retorna para a normalidade glicêmica.

Outro teste bem utilizado é de hemoglobina glicosilada (HbA1c), que indica o controle do açúcar no sangue de um paciente nos últimos 2-3 meses. HbA1c é formada quando a glicose no sangue se liga irreversivelmente à hemoglobina, para formar um complexo estável de hemoglobina glicosilada. Como a envergadura normal de vida das células vermelhas no sangue é de 90-120 dias, a HbA1c somente será eliminada quando as células vermelhas forem substituídas. A relação da HbA1c pela média dos níveis de glicose no sangue estão na Tabela 4.

**Tabela 4** - Relação da HbA1c pelos níveis médios de glicose no sangue

HbA1c%	Média de glicose no sangue (mg/dl)	Interpretação
4	61	Não-diabéticos
5	92	
6	124	
6 < 7	156	Alvo para diabetes
8	188	Ação sugerida de acordo com a ADA
9	219	
10	251	
11	283	
12	314	

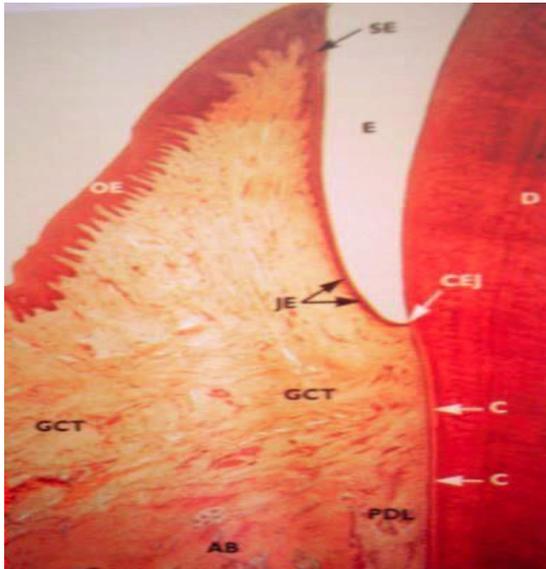
fonte: *American Diabetes Association, Diabetes Care*, 2010.

A ADA recomenda a HbA1c como o melhor teste para saber se o açúcar no sangue de um paciente está sob controle todo o tempo (HbA1c < 6%). O teste deve ser realizado a cada 3 meses em pacientes insulino-dependentes, durante mudanças de tratamento ou quando a glicose no sangue está elevada. Para pacientes tratados com drogas orais e estáveis, a frequência recomendada é de duas vezes ao ano (ADA, 2010).

Khaw et al. (2001) avaliaram 4662 homens com idade entre 45 e 79 anos e verificou a importância da hemoglobina glicosilada como preditor do risco de morte por todas as causas. Um aumento de 1% da HbA1c esteve associado a elevação de 28% do risco de morte, independente da idade, pressão, lipídemia, IMC ou fumo.

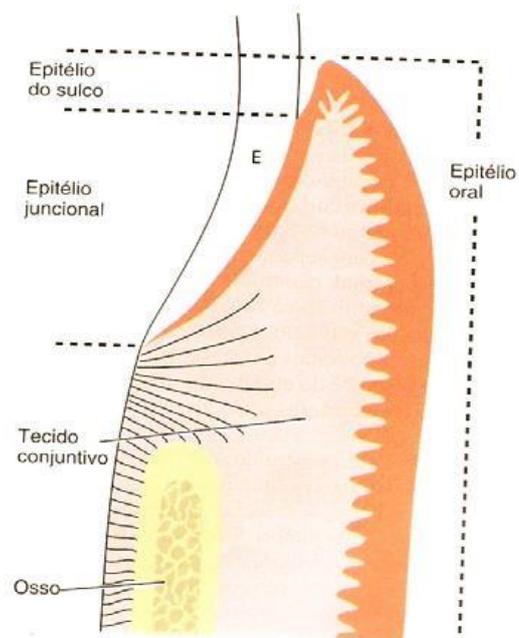
### 3.3 PERIODONTO

A inserção do dente no alvéolo só é possível devido à presença de numerosas fibras colágenas (fibras principais), com arranjo em feixes, outros componentes da matriz de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Este sistema serve como mecanismo de revestimento e suporte do dente (Figura 1 e 3) (TEN CATE, 2008).



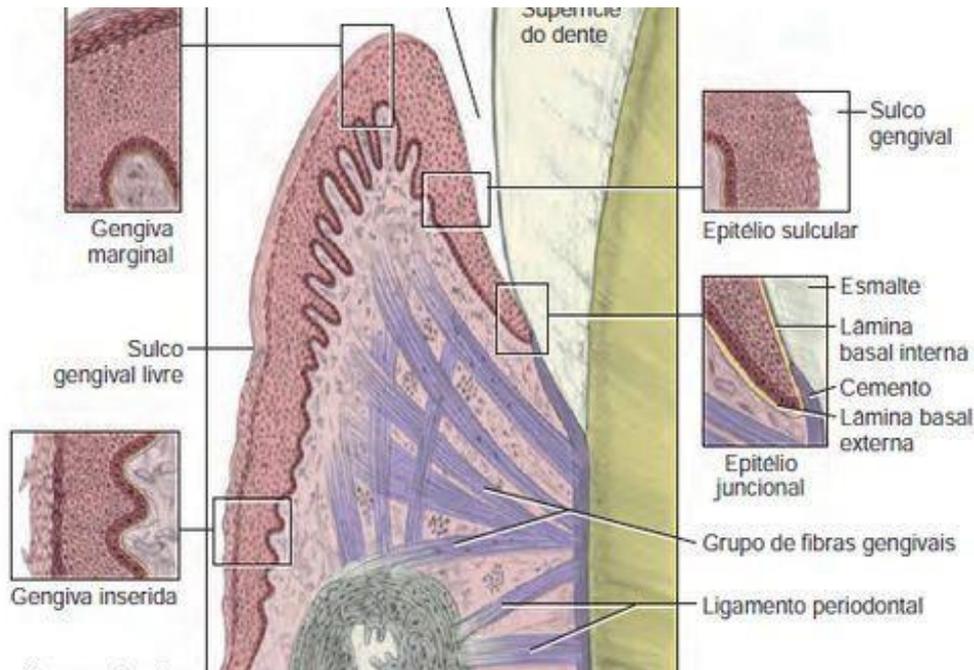
**Figura 1**–Histologia do periodonto sadio. E= esmalte; C=cemento; D=dentina; OE= epitélío bucal; SE= epitélío sulcular; JE= epitélío juncional GCT=tecido conjuntivo gengival; AB= osso alveolar; PDL= ligamento periodontal. Fonte: Rose et al., 2002.

O periodonto pode ser dividido em periodonto de proteção (mucosa alveolar, gengiva ou mucosa ceratinizada, sulco gengival, epitélío juncional e inserções conjuntivas) e periodonto de sustentação (cemento, ligamento periodontal e osso alveolar) (FIGUEIREDO; PARRA, 2002).



**Figura 2**– Dimensões fisiológicas do periodonto proteção.

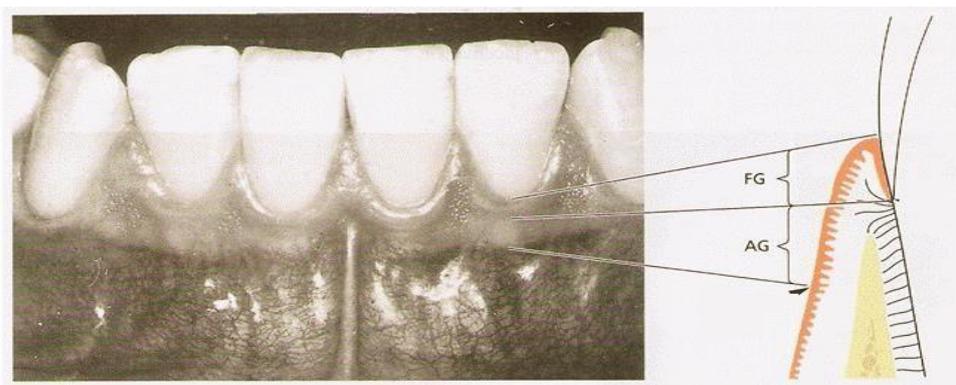
Fonte: Lindhe, (2005)



**Figura 3-** Periodonto de sustentação.

Fonte: Ten Cate (2008)

A mucosa alveolar ou mucosa de revestimento apresenta-se de cor vermelha, flexível e fina, permitindo maior agressão dos microrganismos. A gengiva ou mucosa ceratinizada é dividida em gengiva livre e inserida (Figura 4). Além disso, a gengiva inserida com frequência apresenta um pontilhado delicado, que lhe confere um aspecto de casca de laranja. O sulco gengival promove uma distância entre a cavidade bucal e o epitélio juncional. O epitélio juncional é mais permeável que o epitélio bucal ou sulcular, e sofre uma renovação celular contínua a partir da camada basal, servindo de passagem para os produtos bacterianos do sulco para o tecido conjuntivo. As inserções conjuntivas representam um conjunto de fibras colágenas localizadas apicalmente ao epitélio juncional, garantindo uma firme inserção da gengiva ao dente (LINDHE, KARRING, LANG, 2005).



**Figura 4** – As duas partes da gengiva: a gengiva livre (FG) e a gengiva inserida (AG).

Fonte: Lindhe, Karring, Lang, 2005.

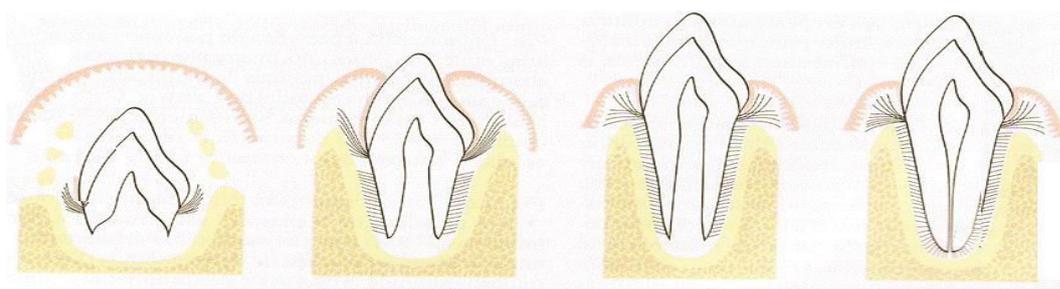
O cemento radicular, por sua vez, é um tecido calcificado que recobre as superfícies radiculares e, ocasionalmente, pequenas porções das coroas dos dentes. É essencial para fixação normal dos dentes. Por servir como junção para as fibras de Sharpey ao tecido conjuntivo gengival, assim como ao ligamento periodontal e ao osso alveolar. Além disso, possui função protetora aos dentes, por ser menos suscetível a reabsorção que o osso (TEN CATE, 1994).

Cada dente é unido e separado do osso alveolar adjacente por uma estrutura de suporte maciça de colágeno, o ligamento periodontal. Esse arranjo, é claro, resiste ao deslocamento dental esperado durante a função normal. Forma-se na medida em que o dente se desenvolve e irrompe na cavidade bucal (Figura 6). A forma estrutural não se esboça até que o dente entre em oclusão e seja aplicada a força funcional (FIGUEIREDO; PARRA, 2002).



**Figura 5** – Visualização da linha mucogengival (setas).

Fonte: Lindhe, karring, Lang (2005)



**Figura 6** – As várias fases da organização do ligamento periodontal que se formam com o desenvolvimento da raiz e a erupção do dente.

Fonte: Figueiredo, Parra, (2002).

O processo alveolar é a parte da maxila e da mandíbula que forma e sustenta os alvéolos dos dentes. Desenvolvem-se em conjunto com o desenvolvimento e erupção dos dentes e são gradativamente reabsorvidos com a perda dos dentes, pois a condição de sua existência é a presença da raiz dentária. Em conjunto com o cemento e o ligamento periodontal, o osso alveolar constitui os tecidos de sustentação dos dentes e são responsáveis pela distribuição das forças geradas durante a mastigação e outras formas de contato entre os dentes (FIGUEIREDO; PARRA, 2002).

### 3.3.1 Doença Periodontal

A doença periodontal (DP) é o comprometimento dos tecidos periodontais pelo processo inflamatório, que leva à reabsorção do osso, ou seja, a destruição do mesmo que está ao redor das raízes dos dentes (MATIELLO, 2008). A DP divide-se em gengivite e periodontite. A gengivite inicia-se, frequentemente, pela inadequada higiene bucal, que leva à inflamação gengival pelo acúmulo de placa bacteriana na superfície dentária, formando biofilme, o que torna a gengiva hiperemiada, edemaciada e com sangramento, podendo evoluir para uma inflamação crônica, em que o tecido de suporte é destruído e separa-se do dente, formando a bolsa periodontal com alteração óssea caracterizada como periodontite, podendo causar a perda dentária (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2008).

A característica que difere a periodontite da gengivite é a perda de inserção do ligamento periodontal clinicamente detectável. Essa característica é acompanhada pela formação de bolsa periodontal, retração gengival e mudanças na densidade e altura do osso alveolar (Figuras 7 e 8). Apesar do caráter multifatorial, a periodontite apresenta

como fator etiológico primário o acúmulo de biofilme dentário. Este processo infeccioso desencadeará um processo inflamatório, em resposta aos antígenos dos micro-organismos do biofilme dentário, que se acumulam ao longo da margem gengival (CARRANZA et al., 2004; EICK et al., 2012).



**Figura 7:** Formação da bolsa periodontal.

Fonte: [www.odontologiaonline.com.br](http://www.odontologiaonline.com.br)



Periodonto sadio

Periodontite moderada

Periodontite grave

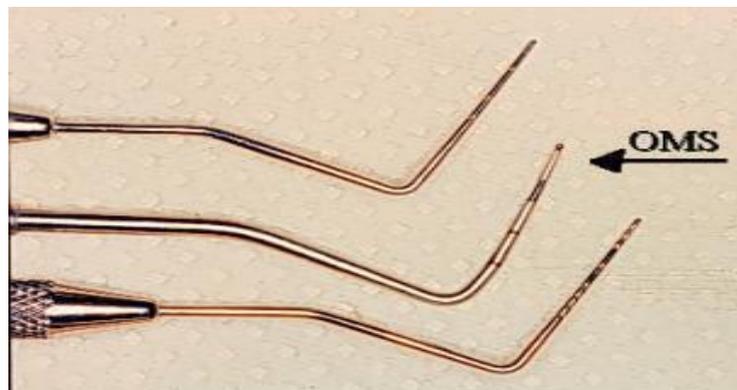
**Figura 8** – Progressão da doença periodontal.

Fonte: Lindhe, (2005).

A DP causa desconforto, reduz a habilidade mastigatória e, nos casos mais severos, causa abscessos orais e perdas dentárias. Além destas ocorrências, a DP constitui fator de risco para condições sistêmicas, incluindo doença cardiovascular, baixo peso ao nascer e partos prematuros (TANNER et al., 2005). Fatores de risco não modificáveis (idade, gênero, raça, etnia) e fatores ambientais e comportamentais (socioeconômicos, microbiota específica, diabetes, tabagismo) estão envolvidos na prevalência e na severidade da doença periodontal (OPPERMAN, 2007).

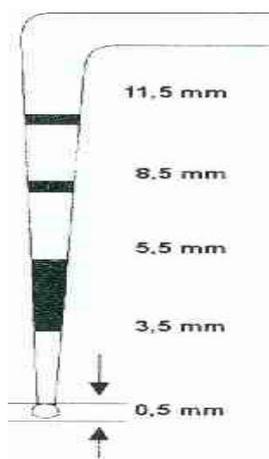
O diagnóstico clínico de saúde periodontal baseia-se na avaliação de alguns parâmetros clínicos (profundidade de sondagem, sangramento, nível de inserção periodontal e posição da margem gengival) coletados por meio de processo de sondagem, utilizando-se um instrumento denominado se sonda periodontal (VIDIGAL JÚNIOR, 1997).

O Índice periodontal comunitário (CPI) foi desenvolvido pela OMS com o propósito de ser o índice que avaliasse de forma rápida e simples a condição periodontal de populações em pesquisas epidemiológicas. Contempla três indicadores da condição periodontal: sangramento gengival, presença de cálculo e bolsas periodontais. Para a realização do exame a boca é dividida em sextantes (18-14, 13-23, 24-28, 38-34, 33-43, 44-48) e utilizando-se a sonda periodontal desenvolvida pela OMS (Figuras 9 e 10), toda extensão do sulco ou bolsa gengival do dente é examinada. As maiores vantagens do CPI são simplicidade, rapidez, fácil utilização e uniformidade internacional (CHALUB; PÉRET, 2010).



**Figura 9-** Diferentes sondas periodontais e a recomendada pela OMS.

Fonte: Lindhe (2005)



**Figura 10-** Sonda OMS.

Fonte: Organização Mundial de Saúde - OMS, 2012.

Dez dentes-índices são utilizados no exame parcial de adultos a partir de 20 anos (17, 16, 11, 26, 27, 37, 36, 31, 46, 47). De acordo com as condições clínicas encontradas nas faces examinadas, o dente é classificado por códigos que variam de zero a quatro (Tabela 5). Esta classificação é baseada na sondagem periodontal. O resultado do exame é registrado em um quadro no qual um único código é atribuído para cada sextante, de acordo com o dente que apresentar a maior severidade (Tabela 6).

**Tabela 5-** Codificação de acordo com o Índice Periodontal Comunitário.

<b>CIP</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>
<b>0</b>	Saudável
<b>1</b>	sangramento à sondagem
<b>2</b>	presença de cálculo
<b>3</b>	bolsas de 4-5mm
<b>4</b>	bolsas $\geq$ 6mm
<b>X</b>	(sextante excluído - presença de menos de 2 dentes funcionais no sextante)
<b>9</b>	não examinado

. Fonte: Organização Mundial de Saúde – OMS, (2012).

**Tabela 6-** Tabela de registro do Índice Periodontal Comunitário.

<b>17/16</b>	<b>11</b>	<b>26/27</b>
<b>46/47</b>	31	36/37

Fonte: Organização Mundial de Saúde - OMS, (2012).

O Índice de perda de inserção periodontal (PIP) permite avaliar a condição da inserção periodontal, tomando como base a visibilidade da junção cimento-esmalte nos mesmos sextantes e dentes índices do CPI, sob as mesmas condições. O PIP é basicamente um complemento do CPI (Tabela 7).

**Tabela 7-** Codificação do Índice de Perda de Inserção Periodontal (PIP).

<b>PIP</b>	<b>CLASSIFICAÇÃO</b>
<b>0</b>	Perda de inserção entre 0 e 3mm/CPI<3
<b>1</b>	Perda de inserção entre 4 e 5mm
<b>2</b>	Perda de inserção entre 6 e 8 mm
<b>3</b>	Perda de inserção entre 9 e 11mm
<b>4</b>	Perda de inserção entre 12mm ou mais
<b>X</b>	Sextante excluído
<b>9</b>	Sem informação (JCE não visível ou detectada)

Fonte: Organização Mundial de Saúde - OMS, (2012).

O Índice periodontal comunitário (CPI) e o Índice de perda periodontal (PIP) têm sido empregados para definir caso de DP em diferentes estudos (CELESTE et al., 2011;

PERES et al., 2007; SABBAH et al., 2010). Duas definições de DP a partir da combinação desses índices foram consideradas. DP “moderada a grave”: presença de pelo menos um sextante com profundidade de bolsa periodontal (PBS)  $\geq 4$  mm (CPI  $> 2$ ) e pelo menos um sextante com perda de inserção  $\geq 4$  mm (PIP  $> 0$ ). DP “grave”: presença de pelo menos um sextante com PBS  $\geq 4$  mm (CPI  $> 2$ ) e pelo menos um sextante com perda de inserção  $\geq 6$  mm (PIP  $> 1$ ) (PERES et al., 2007). Em ambas as definições os sextantes com CPI e PIP não necessitavam ser os mesmos.

De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal da população brasileira realizado em 2013, a prevalência da doença periodontal “moderada a grave” em adultos no Brasil foi de 15,3% (Figura 10). Entre as capitais, variou de 5,7% em Maceió a 34,9% em Macapá. Nos municípios do interior, a menor prevalência foi observada na região Sul (8,4%), enquanto a maior foi na Centro-Oeste (20,0%). Para a doença periodontal “grave”, a estimativa de prevalência para o Brasil foi de 5,8%. Belém foi a capital com menor prevalência (0,9%) e a maior prevalência foi observada em Manaus (15,5%). A prevalência nos municípios do interior variou de 1,6% para a região Norte a 7,8% para a região Sudeste (IBGE, 2013).

### **3.4 Diabetes e doença periodontal**

Além das complicações crônicas, como nefropatia, neuropatia e retinopatia, o DM também está relacionado a complicações bucais. A doença periodontal (DP) é a complicação oral mais importante, sendo considerada a sexta complicação clássica do diabetes (KAWAMURA, 2002). Essas doenças apresentam uma associação bidirecional na qual o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes (WEHBA, 2004).

Diversos fatores associados ao DM podem influenciar a progressão e agressividade da doença periodontal: idade do paciente (aumento do risco durante e após a puberdade), maior duração da doença e controle metabólico inadequado (WEHBA, 2004; MARIN et al. 2002).

De acordo com Duarte (2000), a maioria dos estudos mostra maior prevalência e severidade da DP em diabéticos comparados aos indivíduos não diabéticos com irritação local similar. Podem ser classificadas como evidências clínicas associadas ao diabetes o aumento da mobilidade dentária, aumento da inflamação gengival, perda óssea, migração

patológica dental, abscessos periodontais, hiperplasia gengival, cálculos dentários, sangramento à sondagem, aumento na profundidade de bolsas periodontais, recessões gengivais e perda de inserção. O autor afirma que o controle metabólico parece estar relacionado diretamente com a doença periodontal nos diabéticos, pois pacientes descompensados são mais suscetíveis a mudanças teciduais e a uma fraca resposta ao tratamento periodontal.

Yalda et al. (2000), enfatizaram o diabetes como um modificador da expressão periodontal. Foram analisados os fatores associados ao diabetes que aumentam a severidade da periodontite, entre estes: efeitos do diabetes na microbiota periodontal, função neutrofílica prejudicada, resposta inflamatória excessiva, defeitos na renovação do colágeno, prejuízo na cicatrização e efeitos do controle diabético no estado periodontal. Os autores acreditam que os diabéticos podem responder diferentemente à terapia devido aos fatores sistêmicos apresentados, entretanto quase todos os diabéticos parecem responder ao tratamento periodontal convencional.

Santana et al. (2002), avaliaram a ocorrência de manifestações bucais envolvendo tecidos moles e duros em 38 diabéticos metabolicamente descompensados. Os pacientes foram avaliados através de exames laboratoriais e clínicos, que avaliaram a presença de candidíase bucal, gengivite e periodontite. Os resultados mostraram elevados índices de perda dentária e elevada frequência de eventos clínicos sugestivos de candidíase bucal devido à alteração do fluxo salivar causada pelo diabetes, agravados pelo uso de prótese dental e diminuição vertical da abertura bucal. Em relação aos tecidos periodontais, ocorreram maiores manifestações clínicas características de doença periodontal crônica avançada nos diabéticos tipo 2.

Orbak et al. (2002), compararam a saúde periodontal de fumantes e não fumantes com diabetes tipo 2 (DTM2) e não fumantes com periodontite que não sofrem de doenças sistêmicas. A investigação foi feita em 60 indivíduos adultos, divididos em 3 grupos: 1) fumantes com DTM2, 2) não fumantes com DTM2 e 3) não fumantes sem doença sistêmica. Os achados periodontais mostraram que o índice gengival e o nível médio de inserção clínica do grupo 3 foi mais baixo do que dos grupos 1 e 2. A periodontite foi mais severa em fumantes e não fumantes com DTM2 do que em não fumantes sem DTM2 e a condição periodontal foi melhor em não fumantes com DTM2 do que em fumantes

com DTM2. Os resultados sugerem que o diabetes e o cigarro são fatores de alto risco para doença periodontal.

Em um grande estudo realizado no Iraque por Mansour & Abd-Al-Sada (2005) com 1593 indivíduos (633 diabéticos e 960 não diabéticos), houve diferença estatística significativa na prevalência de periodontite para casos moderados da doença, no entanto casos leves e avançados não mostraram o mesmo.

O diabetes, assim como outras alterações metabólicas, está associado com maior prevalência na severidade da doença periodontal. D'auto et al. (2008) analisaram a influência de diversas alterações metabólicas (obesidade central, hipertrigliceridemia, hipertensão e resistência à insulina) na periodontite. Os autores conduziram um estudo transversal representativo da população dos Estados Unidos e verificaram que a prevalência de alterações metabólicas em paciente com periodontite moderada e severa foi de 34% e 37%, respectivamente.

No Brasil um estudo de prevalência foi realizado com 71 pacientes diabéticos tipo 2 atendidos numa clínica de estomatologia e num hospital. Concluiu-se que pacientes diabéticos, a maioria acima dos 40 anos, possuíam percentualmente maior perda de inserção e bolsas periodontais profundas (GUIMARÃES et al., 2007).

Uma vez que a microbiota periodontal em pacientes com DM é similar à de não diabéticos, outros fatores, tais como hiperglicemia e anormalidades da resposta imune do hospedeiro frente às infecções bucais, parecem ser os responsáveis pela maior prevalência desta complicação em diabéticos (HERRING; SHAH, 2006; GREGHI et al., 2002; VERNILLO, 2003).

Numa revisão da literatura, Alves et al. (2007) concluíram que o diabetes mellitus está relacionado a diversas alterações que podem predispor à doença periodontal como: alterações bioquímicas, a produção de produtos finais da glicação e oxidação não enzimática de proteínas e lipídeos (AGEs — *advanced glycation end products*), hiperglicemia intracelular, alterações na saliva, distúrbios imunológicos (redução da função dos neutrófilos) e aumento da produção de citocinas e mediadores inflamatórios, alterações genéticas que aumentam a probabilidade de desenvolvimento da doença periodontal e lesões teciduais, aumento da permeabilidade vascular e espessamento da membrana basal capilar.

Brandão et al. (2011) revisaram a literatura acerca da relação entre a doença periodontal e o diabetes mellitus e concluíram que o DM está relacionado a diversas alterações e fatores que influenciam a progressão e a agressividade da doença periodontal em pacientes diabéticos, como idade, tempo de duração, controle metabólico, microbiota oral, alterações vasculares, metabolismo do colágeno, fatores genéticos e alterações na resposta inflamatória. Nos pacientes diabéticos não controlados e com precário controle de biofilme dental, a doença periodontal é mais rápida e severa.

### **3.5 Interação entre doença periodontal, diabetes e glicemia.**

Pacientes diabéticos com menor controle de glicemia têm um maior risco de desenvolver periodontite quando comparados a diabéticos bem controlados e não diabéticos. A hiperglicemia é o principal fator complicador do diabetes, levando à formação de proteínas quimicamente irreversíveis e de difícil degradação. Consequentemente, estas proteínas se acumulam nos tecidos afetando a migração e a capacidade das células de defesa (BRONDANI, 2002). A gravidade da destruição periodontal tem demonstrado que pode estar relacionada com os efeitos diretos e indiretos do controle glicêmico, além de outros fatores que podem estar envolvidos no processo.

Um dos parâmetros sistêmicos utilizados na maioria dos estudos é o controle metabólico do diabetes, avaliado por níveis de glicose no sangue ou pela hemoglobina glicosilada (HbA1c). Para indivíduos com DM, o nível de HbA1c considerado satisfatório é menor que 6%, sendo que valores superiores a 8% são inaceitáveis e exigem alguma forma de intervenção (TAN et al., 2006).

Embora alguns estudos apontem para um relacionamento bidirecional entre o controle glicêmico e a saúde periodontal, ainda não é claro se a melhora na saúde periodontal poderia levar a um melhor controle metabólico (SANTANA et al., 2007; VERARDI et al., 2009).

Katz et al. (2000) avaliaram a relação entre a DP e níveis glicêmicos elevados após exame de 10.590 indivíduos, verificando uma forte associação entre a presença da DP e a hiperglicemia. Num estudo longitudinal, diabéticos tipo 2 com periodontite severa, apresentaram um controle glicêmico significativamente pior do que diabéticos com mínima destruição periodontal. Além disso, a presença de DP severa foi relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de complicações da diabetes, como lesões micro

e macrovasculares, proteinúria, além de um risco maior do aumento da prevalência de complicações cardiovasculares e cardiorrenais do que as encontradas nos diabéticos sem DP.

Mattson e Cerutis (2001) fizeram uma revisão na literatura sobre diabetes mellitus e suas implicações odontológicas, relataram a respeito dos sinais, sintomas e complicações bucais como: xerostomia, queimação na boca e língua, aumento da glândula parótida, infecções por *Candida albicans*, queilite e doença periodontal. Observaram que a literatura evidencia uma relação entre DP e DM, indicando que diabéticos com pobre controle glicêmico têm maior incidência e severidade de periodontite, além de maior perda de inserção de tecido conjuntivo e de perda óssea, quando comparados com diabéticos bem controlados.

Madeiro et al., (2005) realizaram um trabalho de revisão da literatura pertinente no que concerne às possíveis associações entre diabetes e doença periodontal, podendo afirmar que nos pacientes diabéticos não controlados, a instalação da DP é mais rápida e severa. Além disso, o tratamento periodontal é uma opção para o controle glicêmico do diabetes e pacientes controlados podem ser tratados como pacientes não portadores de diabetes.

Verardi et al. (2009) realizaram uma revisão de literatura em relação à influência da DP no fator sistêmico do paciente diabético, e por sua vez, a influência do diabetes no desenvolvimento e progressão da DP. Concluíram que o diabetes é um fator de importância na incidência e prevalência da doença periodontal, assim como a doença periodontal pode ter influência sobre o controle metabólico do diabetes. O tratamento periodontal parece contribuir para a melhoria do controle glicêmico de indivíduos diabéticos e com DP.

Bascones-Martinez et al. (2011) fizeram uma revisão da literatura com o objetivo de atualizar a relação entre a DP e diabetes a partir de uma perspectiva oral de saúde. Reuniram artigos sobre as doenças publicados ao longo de 10 anos. Os resultados da pesquisa mostram que o diabetes pode aumentar o risco de DP e tem sido proposto que a DP crônica pode influenciar o curso natural do diabetes. O controle da DP pode melhorar o controle glicêmico em pacientes com diabetes tipo 2, e a melhora do controle glicêmico pode contribuir para um melhor controle da DP.

Borgnakke et al. (2013) revisaram sistematicamente a evidência epidemiológica dos efeitos da DP no controle do diabetes, complicações e incidência. Utilizaram como critério de elegibilidade estudos longitudinais e transversais, encontrando 114 textos completos, dos quais 17 foram incluídos na revisão. Concluíram que há um pequeno conjunto de evidências que contribuem para os efeitos adversos da DP sobre o controle glicêmico, as complicações do diabetes, e o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (e possivelmente diabetes gestacional). A evidência atual sugere que a DP afeta negativamente os resultados do diabetes.

### **3.6 Doença periodontal e *Candida* spp.**

A DP destrutiva depende da natureza compatível do hospedeiro ou espécies benéficas colonizando a margem gengival, formando biofilme que favorece a colonização de outras espécies. A presença de espécies consideradas patógenos periodontais, em sítios sem evidências de destruição periodontal torna claro que, para a ocorrência da doença periodontal, os patógenos são necessários, mas não suficientes, dependendo também dos fatores de risco (bolsas profundas, retenção de placa, restaurações defeituosas), fatores genéticos e resposta imunológica do hospedeiro (SOCRANSKY et al., 1988, OLIVEIRA et al., 2006).

Pelo lado microbiológico, a DP está associada a uma microbiota complexa, sendo que aproximadamente 500 espécies bacterianas já foram encontradas colonizando bolsas periodontais (VAN WINKELHOFF et al., 1996). *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Candida* spp. foram isolados em bolsas periodontais e cavidades orais de pacientes com periodontites crônicas (OLIVEIRA et al., 2006).

Alguns fungos são capazes de se desenvolverem à temperatura do hospedeiro (37°C) e sobreviver em baixo potencial de óxido-redução, condição essa encontrada em tecidos danificados (RICHARDSON, 1993). Dentre a microbiota micológica que contribui para o processo periodontopatogênico, as leveduras do gênero *Candida* são as que apresentam maior expressão no desenvolvimento e agravamento dos processos infecciosos periodontais. Dentre todas as espécies do gênero, o *C. albicans* é a mais prejudicial ao ser humano, expressando sua habilidade patogênica diretamente relacionada com a condição imunológica do hospedeiro. Sendo um fungo oportunista, sua presença na cavidade bucal de pacientes imunocomprometidos é na maioria das vezes

patogênciã, uma vez que nesse tipo de hospedeiro há o desequilíbrio necessário para instalação deste microorganismo (RINALDI, 1993).

A porcentagem de isolamento do gênero *Candida* a partir da cavidade bucal, segundo relatos da literatura, varia de 30 a 60%. No trabalho de Martins et al. (2002), foi observado que 31,82% dos indivíduos examinados apresentavam *Candida* na cavidade bucal. Para muitos pesquisadores, biofilmes contendo leveduras, principalmente a *Candida albicans*, poderiam estar implicados não apenas nas candidoses de mucosas, como também no desenvolvimento de cáries e na patogênese de doenças periodontais (KAMMA et al. 1999; RYDER, 2000; HANNULLA et al. 2001; JARVENSIVU et al. 2004; NIKAWA et al. 1998; STARR et al. 2002).

Alterações periodontais são resultado de uma resposta imunitária contra os tecidos do hospedeiro exacerbada. Alterações nas respostas imunes celulares e humorais podem permitir que diferentes espécies, tais como *Candida*, possam colonizar o ambiente subgingival. Tem sido relatado que a proporção de leveduras em bolsas periodontais são semelhante às de algumas bactérias periodontopatogênicas, o que sugere um papel para as espécies de *Candida* na patogênese da doença. No entanto, ainda não é possível determinar o papel de *Candida* no desenvolvimento ou a progressão da DP, porque poucos estudos investigaram a presença de leveduras em pacientes com periodontite e eles não indicam se os pacientes sofreram a forma crônica ou agressiva da doença (BARROS et al., 2008; SHOHAM; LEVITZ, 2005).

Na cavidade oral, os fungos geralmente povoam a língua, o palato e a mucosa, mas também podem colonizar as bolsas periodontais (SLOTS, 1988). Rams (1991) detectou a presença de *Candida* nas bolsas periodontais de pacientes portadores de periodontite crônica, sugerindo a interação deste microrganismo na patogênese desta doença. Contudo, Reynaud (2001) também relatou a presença de *Candida* em sítios periodontais saudáveis.

A utilização de antibacterianos de amplo espectro como auxiliares no tratamento periodontal tem sido um dos mais relevantes fatores para o desenvolvimento de superinfecções por bactérias resistentes e por leveduras do gênero *Candida*, inclusive em pacientes portadores do HIV, que além de terem sua imunidade comprometida, são submetidos a tratamentos prolongados com antibacterianos (RYDER, 2000).

Numa pesquisa realizada visando a detecção de *Candida* spp. em bolsas periodontais, com o objetivo de verificar a capacidade dessas espécies de sobreviverem nesses microambientes e esclarecer seu papel na patogênese da doença periodontal, *C. albicans* foi isolada em 20% das bolsas periodontais dos pacientes com periodontite (REYNAUD et al., 2001).

De acordo com Hannula et al. (2001), as doenças periodontais são causadas principalmente por bactérias anaeróbias gram-negativas, mas que, aproximadamente 20% dos pacientes adultos, com periodontite também abrigam leveduras subgingivais, a maioria pertencentes à espécie *Candida albicans*. Tais autores avaliaram a existência de uma possível correlação entre o isolamento subgingival de *C. albicans* e a ocorrência de determinadas espécies periodontopatogênicas, e observaram que *P. gingivalis* foi menos frequentemente isolada em amostras positivas para *C. albicans*, enquanto que, ao contrário, a proporção média de *Actinomyces actinomycetemcomitans* era maior nos indivíduos positivos do que naqueles em que tais leveduras não foram encontradas nas bolsas periodontais. Para esses autores, são necessários estudos adicionais para verificar se outras bactérias subgingivais podem favorecer a colonização e a persistência subgingival desses fungos.

Martins et al. (2002) verificaram a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal e bolsas periodontais de indivíduos portadores de periodontite crônica e correlacionaram as cepas isoladas da cavidade bucal com as da bolsa periodontal. Foram coletadas amostras de 88 indivíduos e leveduras do gênero *Candida* foram isoladas da cavidade bucal em 31,82% e da bolsa periodontal em 7,96% dos indivíduos examinados, sendo que 6,82% apresentaram leveduras tanto na cavidade bucal quanto na bolsa periodontal. *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente encontrada.

A prevalência de indivíduos com leveduras nas bolsas periodontais varia, em média, de 7,1 a 15,6% e espécies de *Candida* encontradas em bolsas periodontais têm sido semelhantes à de alguns agentes patogênicos bacterianos, sugerindo um papel dessas espécies na progressão ou desenvolvimento da doença periodontal (SARDI et al., 2012).

Segundo Jarvensivu (2004) e Jabra-Rizk (2001), a inter-relação entre a DP e a presença de espécimes fúngicas ainda está um tanto obscura, mas acredita-se que ocorra devido à capacidade destes microorganismos em aderir a células epiteliais *in vitro* e penetrar no tecido epitelial e conjuntivo provocando uma reação inflamatória.

Canabarro et al. (2009) promoveram uma revisão de literatura sobre a participação dos fungos na etiologia e patogênese da periodontite crônica comprovando que a *Candida* pode ser encontrada em grande número (7 a 57,8% das bolsas periodontais) em pacientes com periodontite crônica. Num estudo brasileiro, a *Candida* foi isolada na bolsa periodontal em 7,96% dos indivíduos examinados.

Senciatti et al. (2012) avaliaram a presença de fungos em pacientes com periodontite crônica, quais são os tipos de fungos presentes, e se os mesmos são encontrados também em pacientes periodontalmente saudáveis. Foram coletadas amostras de biofilme das bolsas periodontais de 20 pacientes com DP crônica e dos sulcos gengivais de 20 pacientes periodontalmente saudáveis. A espécie mais comum foi de *Candida tropicalis*, seguida pela *Candida albicans*. Não houve diferença significativa quanto ao gênero ou faixa etária para a presença de fungos. Concluíram que se pode encontrar fungos em cerca de um a cada três indivíduos com DP, independente do gênero ou idade.

Popova et al. (2014), avaliaram a microbiota subgengival de 20 pacientes saudáveis com periodontite crônica avançada através da Reação em cadeia da polimerase (PCR) e detectaram a presença dos patógenos periodontais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, bem como *Candida spp.*: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*.

### **3.7 Doença Periodontal, Diabetes e *Candida***

A relação entre Diabetes e infecção por *Candida* tem sido estudada na literatura, particularmente porque os indivíduos diabéticos são mais susceptíveis à infecção fúngica do que aqueles sem diabetes. A aderência de levedura à superfície de células epiteliais é reconhecida como fator essencial no processo de colonização e subsequente infecção (BELAZI et al., 2005). Os níveis de glicose em pacientes diabéticos favorecem o crescimento da levedura devido ao aumento do número de receptores disponíveis para *Candida*. A degeneração microvascular encontrada em exames histológicos de pacientes diabéticos podem predispor à colonização por *Candida*, tornando-os mais susceptíveis às infecções (BROWNLEE et al., 1988).

Diferentes espécies de *Candida* têm sido frequentemente isoladas da cavidade bucal dos pacientes com diabetes. *Candida albicans* é a espécie mais encontrada em pacientes diabéticos, com uma prevalência de até 80%. Este patógeno fúngico oral é a mais virulenta das espécies (CALDERONI; FONZI, 2001; BELAZI et al. 2005; MANFREDI et al. 2002).

Para Yuan et al. (2001), as bolsas periodontais que abrigam *C. albicans* podem representar um importante nicho desses fungos, favorecendo a ocorrência de candidose bucal. Estes pesquisadores analisaram a microbiota subgengival de indivíduos com doença periodontal, em pacientes portadores de diabetes mellitus não-insulinodependentes e de controles não-diabéticos, para a detecção de cinco espécies de micro-organismos patogênicos: *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola* e *C. albicans*, e observaram que estas espécies ocorreram mais frequentemente em sítios doentes do que em sítios saudáveis, em ambos os grupos; para os autores, mais estudos são necessários para determinar a relevância de *C. albicans* no desenvolvimento de periodontites em pacientes com diabetes mellitus.

Num estudo com reações em cadeia da polimerase (PCR), verificou-se que as quantidades de algumas espécies de *Candida* foram maiores em pacientes com doença periodontal crônica com diabetes do que naqueles sem diabetes. Entre os pacientes diabéticos, *C. albicans* foi encontrada em 57%, *C. dubliniensis* em 75%, *C. tropicalis* em 16%, e a *C. glabrata* em 5% de bolsas periodontais (NETEA et al., 2008).

Sardi et al. (2010) mostraram através de uma revisão da literatura que os pacientes diabéticos com periodontite crônica tiveram maior prevalência de *Candida* spp. quando comparados aos não diabéticos. Encontraram quatro espécies de *Candida*, sendo *C. dubliniensis* e *C. albicans* as mais prevalentes nos sítios periodontais, além de *C. glabrata* e *C. krusei*, concluindo que a alta prevalência destas leveduras em biofilmes subgengivais de bolsas periodontais podem indicar a coparticipação destes microrganismos na progressão da DP desses pacientes.

Suárez et al. (2013) determinaram a prevalência de espécies de *Candida* e estudaram fatores associados à colonização da cavidade bucal em 107 pacientes com diabetes mellitus tipo 2, classificados em controlados e não controlados de acordo com os valores de hemoglobina glicosilada. Foram encontradas leveduras em 74,8% dos pacientes, 69% dos indivíduos com diabetes controlados apresentaram leveduras e 80%

naqueles com diabetes descontrolada. O maior número de isolados correspondeu a *C. albicans*, seguido de *C. parapsilosis*. Indivíduos não controlados apresentaram uma porcentagem significativamente maior de levedura diferente de *C. albicans* ( $p = 0,049$ ).

Pallavan et al. (2014) avaliaram a colonização por *Candida* de 30 pacientes diabéticos e 30 pacientes saudáveis utilizando a técnica de citologia exfoliativa oral, mostrando um aumento da colonização por *Candida* em pacientes diabéticos em comparação aos pacientes saudáveis, concluindo que a avaliação precoce da colonização por *Candida* pode evitar a colonização destas em outras partes das mucosas orais ou na corrente sanguínea.

### **3.8 Doença periodontal e fatores de virulência de *Candida***

Espécies de *Candida* possuem fatores de patogenicidade que possibilitam o agravamento da doença periodontal como: a aderência e consequente capacidade de invadir o epitélio do sulco, dimorfismo, inibição da função de polimorfonucleares, lise de monócitos, presença de endotoxinas e produção de enzimas como a fosfolipase e proteinase, que exercem importante papel na invasão da célula do hospedeiro (MARTINS et al. 2002).

Pizzo et al. (2002) sugeriram que a heterogeneidade de cepas de *Candida* na bolsa subgingival não é apenas resultado do seu espalhamento na saliva ou no biofilme, mas também da sua capacidade de adaptação à bolsa, desenvolvendo diferentes propriedades de virulência para sua sobrevivência em ambientes hostis.

Um estudo realizado por Martins et al. (2002) conseguiu isolar 31,82% do gênero *Candida* a partir da cavidade bucal, onde 7,95% eram advindos de sítios de bolsas periodontais. Este mesmo trabalho também analisou que 75% das 28 cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal, produziram fosfolipase e 89,3% eram produtoras de proteinase. Por outro lado, 21,5% das amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal e 28,6% da bolsa periodontal apresentaram forte atividade fosfolipásica e proteinásica. Concluíram que a produção destas enzimas no sulco gengival pode atuar como fator secundário na patogenicidade da doença periodontal.

Lorenzo (2004) estudou a produção de fosfolipase e proteinase por cepas de *Candida*, concluindo que a fosfolipase é uma enzima que hidrolisa os fosfolipídeos,

principais componentes das membranas celulares que compõe os tecidos podendo fazer parte do processo de invasão de *C. albicans*, uma vez que, devido à contribuição deste fungo na destruição tecidual, as chances de penetração e disseminação de outros micro-organismos no periodonto se tornam maiores.

A liberação de proteinases pelos fungos parece promover a degradação de colágeno e de fibronectina resultando na destruição da matriz extracelular e da membrana basal. Além disso, os fungos são mais resistentes, ou menos suscetíveis às defesas do hospedeiro (inata e adaptativa) e, desta forma, podem perpetuar o processo inflamatório, ainda que, em alguns casos, tenha sido detectado um infiltrado inflamatório mínimo adjacente a hifas (JÄRVENSIVU et al. 2004).

Rosa et al. (2008), descobriram que cepas periodontais de *C. albicans* aumentam a produção de determinadas enzimas hidrolíticas sob condições de anaerobiose, o que indica que a baixa concentração de oxigênio nas bolsas periodontais exerce influência na virulência atribuída a *C. albicans*. A liberação de proteinases pelos fungos parece promover a degradação de colágeno e de fibronectina resultando na destruição da matriz extracelular e da membrana basal.

Peixoto et al. (2010), numa breve revisão de literatura a respeito da colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais, seus principais fatores de virulência e possível influência sobre as doenças periodontais, concluem que os fatores de virulência de *Candida* spp. associados à suscetibilidade do hospedeiro poderiam desempenhar um papel importante nas alterações inflamatórias associadas com as doenças periodontais destrutivas.

Portanto, a presença de *Candida* spp. pode ser considerada um fator importante para o processo de colonização de bolsas periodontais. Possui vários fatores de virulência relevantes na patogênese da doença periodontal, tais como a capacidade de aderir ao epitélio e invadir o tecido conjuntivo gengival (HAYNES, 2001; JÄRVENSIVU et al. 2004). Além disso, podem inibir a função de neutrófilos polimorfonucleares, e produzirem enzimas como fosfolipases e proteinases capazes de degradarem imunoglobulinas. Os fatores de virulência de *Candida* spp. associados à suscetibilidade do hospedeiro poderiam desempenhar um papel importante nas alterações inflamatórias associadas com as doenças periodontais destrutivas (MACCARINELLI et al. 2001; HÄGEWALD et al. 2002; BARROS et al. 2008).

## **4 METODOLOGIA**

Trata-se de um Estudo de Caso-controle, e teve início após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos sob número CAAE: 46940315.7.0000.5020 (ANEXO 1).

### **4.1 Termo de Consentimento livre e esclarecido (TCLE).**

Os pacientes foram informados sobre a finalidade da pesquisa, bem como sobre os métodos de coleta das amostras e os usuários do Centro de Especialidades Odontológicas que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

### **4.2 Seleção das amostras**

Para este estudo foram selecionados 30 pacientes com DP e diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (grupo teste), e 30 indivíduos com DP e sem diabetes tipo 2 (grupo controle), sem paridade de gêneros, maiores de 18 anos de idade, dentre aqueles que procuraram o Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) no período de junho a dezembro de 2015. Foram solicitados exames sorológicos (validade de 6 meses) de glicemia e hemoglobina glicada a todos os participantes.

### **4.3 Critérios de inclusão**

Ter assinado o TCLE, apresentar quadro de DP moderada a grave (mínimo de dois sítios em dentes diferentes com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm e perda de inserção maior que 3 mm); ter diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (pacientes do grupo teste), apresentar exames de glicemia e hemoglobina glicada.

### **4.4 Critérios de exclusão**

Tabagistas, uso de antibióticos, antifúngicos e tratamento periodontal nos últimos 6 meses, portadores de aparelhos ortodônticos e prótese total, gravidez, doença sistêmica, outras imunodeficiências (excluindo-se DM).

#### **4.5 Coleta de dados**

Após anamnese, foi realizado exame clínico periodontal por um único examinador, devidamente calibrado, com espelho clínico nº 5 e sonda periodontal preconizada pela OMS, em ambiente com boa iluminação, utilizou-se o Índice periodontal comunitário (CPI) e Índice de perda Periodontal (PIP), onde foi preenchida a ficha clínica e coleta de dados necessários ao estudo (ANEXOS 3 e 4). O reexame de 10% da amostra (N=6) fora realizado pelo padrão, em indivíduos selecionados aleatoriamente, visando assegurar a confiabilidade dos resultados.

#### **4.6 Obtenção da Amostra Clínica**

Para cada paciente do grupo teste e controle, a coleta de material da bolsa periodontal fora realizada de acordo com LOBERTO et al. (2004) após a remoção do biofilme supra gengival com compressa de gaze estéril e isolamento relativo com roletes de algodão. Foram colocados três cones de papel esterilizados nº 25 em cada bolsa periodontal, até a profundidade de sondagem, por 30 segundos. Foram coletados materiais de duas bolsas periodontais de diferentes dentes. Os cones contendo o material coletado foram colocados em tubos de vidro (tubos de ensaio) contendo 1ml de PBS. O material coletado fora mantido em gelo até ser levado ao laboratório de biodiversidade do Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane da Amazônia (CPqLMD-FIOCRUZ) para seu processamento.

#### **4.7 Obtenção dos isolados de leveduras**

As amostras de material subgengival foram processadas no laboratório da CPqLMD-FIOCRUZ. Os cones foram removidos com auxílio de pinças esterilizadas e cada amostra fora centrifugada por 10 minutos (80000 Xg) e o sobrenadante descartado. O depósito fora ressuspenso em 0,6ml de PBS e misturado em Vortex por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final (SANTOS & JORGE, 1998).

De cada amostra (suspensão de concentração final) do material subgengival, fora semeado 100ul em placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol (0,1 mg de Quemicetina Succinato, Carlo Erba, por ml de meio) e incubadas a 37°C por 48 horas e a seguir por mais cinco dias à temperatura ambiente para posterior purificação.

#### 4.8 Manutenção e preservação das leveduras isoladas

Após o período de isolamento, as amostras de leveduras foram semeadas na forma de estrias central em tubos de ensaio contendo ágar Saboraud e ágar malte, de maneira a obter culturas puras e isoladas.

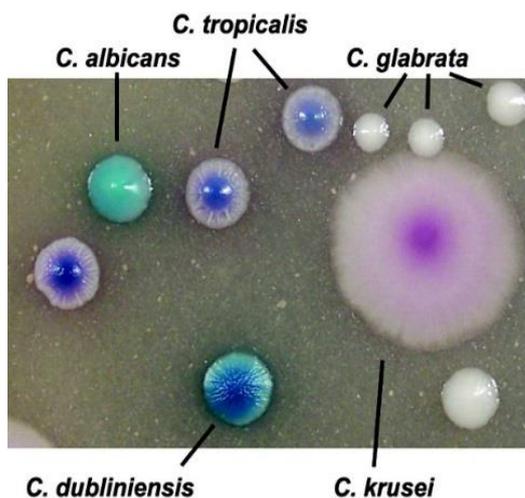


**Figura 11** : Preservação das amostras em tubos de ensaio contendo ASD.

Fonte: dados da pesquisa

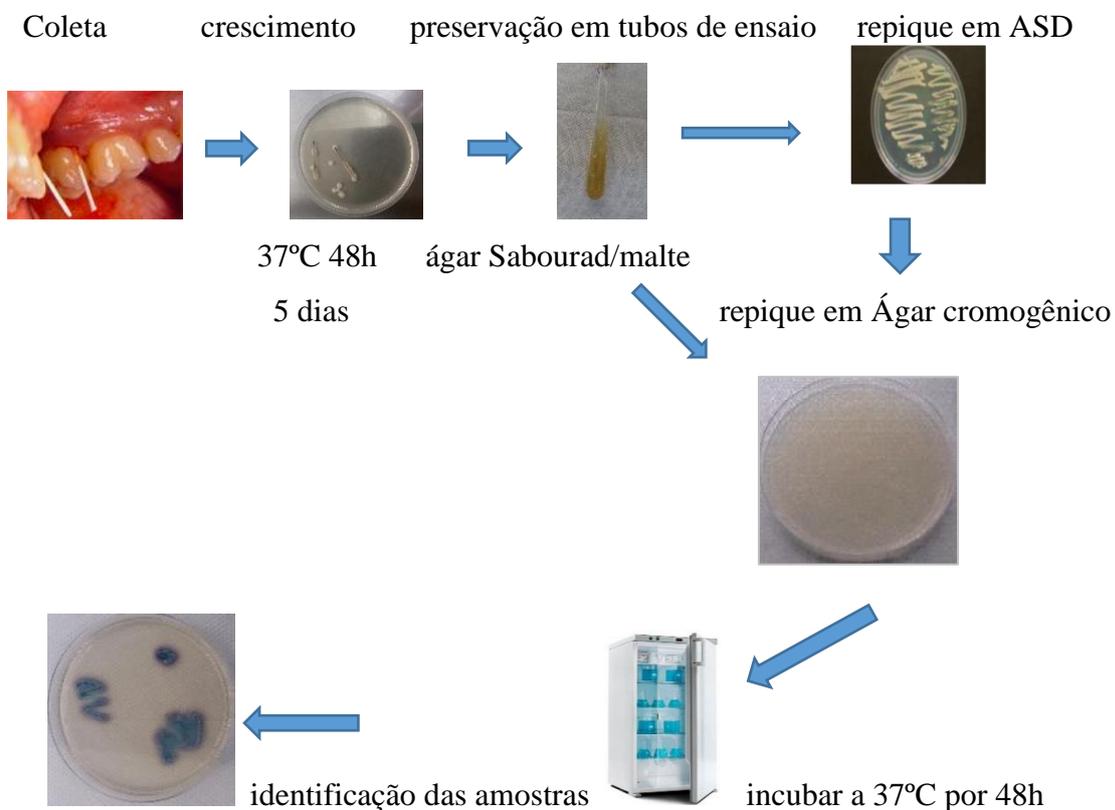
#### 4.9 Identificação através de CHROMagar *Candida*

O CHROMagar *Candida* (Microbiology, France) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e as placas estocadas a 4°C. Cada isolado foi subcultivado neste meio e incubado a 37°C por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia da colônia e da pigmentação das colônias (GARCÍA-MARTOS et al., 1998).



**Figura 12.** Identificação presuntiva da espécie de *Candida* spp. de acordo com a variação da coloração da colônia pelo método cromógeno.

Fonte: CHROMagar™ *Candida*



**Figura 13:** Fluxograma de isolamento e identificação dos isolados de *Candida* spp.

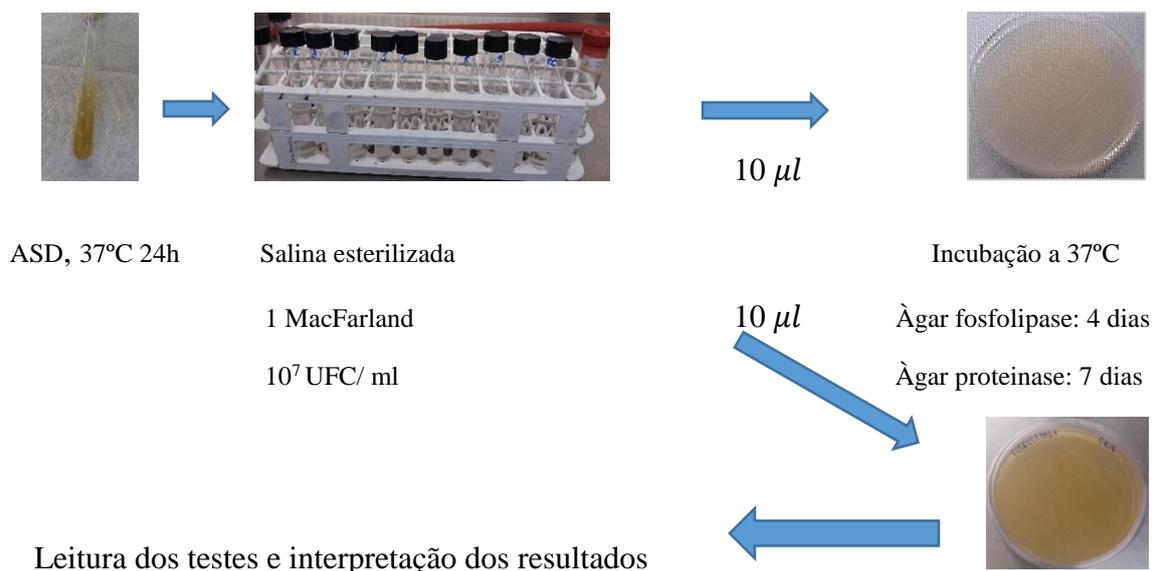
#### 4.10 Atividade de fosfolipase

A produção de fosfolipase foi verificada segundo Price *et al.*, (1982). Culturas com crescimento de 48 horas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose foram inoculadas em pontos equidistantes nas placas de ágar fosfolipase com emulsão de ovo a 50% em solução fisiológica. Foram inoculados 10 $\mu$ L de uma suspensão de células ajustada na escala 1 McFarland. O ágar fosfolipase contém peptona- 10g, glicose-30g, cloreto de sódio-57,3g, cloreto de cálcio-0,55g, ágar-20,0g e água destilada- 1000ml. A leitura do teste fora realizada após 4 dias de incubação a 37°C, sendo considerado como positivo a produção de zona opaca de precipitação ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida através da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática: Pz = 1,0 (ausência de atividade enzimática), 0,64 < Pz < 1,0 (atividade enzimática positiva) e Pz  $\leq$  0,63 (atividade enzimática fortemente positiva).

#### 4.11 Atividade de proteinase

A produção de proteinase foi verificada segundo Ruchel *et al.* (1982). O fenômeno fora observado a partir de amostras de *Candida* cultivadas por 24 horas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C inoculadas em pontos equidistantes em placas de ágar proteinase. O meio indutor consiste de 0,2% de soro albumina bovina (SAB, fraction V, Sigma) e solução de vitaminas (Sigma) adicionadas de Yeast Carbon base (YCB - Difco, Detroit, MI, USA), ajustado a pH 5, esterilizado por filtração e adicionado de ágar (2%) autoclavado. A padronização do inóculo foi feita conforme descrito para o teste de produção de fosfolipase.

As placas foram incubadas durante sete dias a 37°C e a leitura da atividade enzimática (Pz) foi realizada utilizando-se o mesmo cálculo da atividade para fosfolipase.



**Figura 14:** Fluxograma do processo de realização dos testes de pesquisa enzimática.

#### 4.12 Capacidade de aderência a células epiteliais bucais.

Os testes de aderência de *Candida* spp. a células epiteliais foram realizadas de acordo com SOBEL et al., (1981) e KIMURA e PEARSALL (1997), adaptado por LIMA NETO (2007).

As células de leveduras foram crescidas em ágar malte (Difco) por 36 h a 37°C e ressuspensas em 2 mL de tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 6,8 e 4°C, lavadas duas vezes em 2 mL de PBS sob centrifugação (2500rpm, 5 min cada) e ressuspensas em PBS a uma concentração de  $2 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> determinada por espectrofotometria.

As células epiteliais foram coletadas de um voluntário adulto e saudável através de escarificação suave da mucosa oral com “swabs” esterilizados. Em seguida, as células foram suspensas em 5 mL PBS para liberar as células. As suspensões de células epiteliais foram lavadas duas vezes em 5 mL de PBS sob centrifugação (2500rpm, 5 min cada) para remover as bactérias que estivessem aderidas. As células foram ressuspensas em PBS a uma concentração de  $4 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> determinada por espectrofotometria. Após as lavagens, foram avaliadas morfologicamente a integridade e viabilidade das células epiteliais. O teste de aderência entre células epiteliais bucais e células de leveduras foi realizada através da união de 1 mL de cada suspensão numa proporção de 1:1 em tubos de ensaio colocados sob suave agitação durante 2 h a 37°C. Na etapa seguinte, foi

adicionado o corante azul de metileno, com pipeta de Pasteur, e preparadas as lâminas para observação microscópica na objetiva de 40x. Na determinação dos resultados foram visualizados 10 (dez) campos por lâmina e usados os seguintes parâmetros: (+) intensa aderência (quando mais do que 50% da superfície das células epiteliais estiver aderida pelas células de levedura), (-) fraca aderência (quando a superfície das células epiteliais estiver aderida pelas células de levedura em até 50%), (0) sem aderência.

#### 4.13 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada utilizando-se o programa R versão R-3.1.1, e foram aplicados os testes de Fischer para verificar se a frequência absoluta observada para a presença de *Candida* era significativamente diferente da distribuição da frequência absoluta esperada e o teste de Mann-Whitney com intervalo de confiança de 5%.

## 5- RESULTADOS

Na presente pesquisa, foram coletadas amostras de bolsas periodontais de 60 pacientes com periodontite, sendo 30 diabéticos (grupo caso) e 30 pacientes não diabéticos (grupo controle).

Deste estudo participaram 19 homens e 41 mulheres, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,579$ ) entre os grupos com relação ao sexo (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 8** - Número de indivíduos que participaram da pesquisa conforme o sexo

<b>Sexo</b>	<b>Grupo caso (C)</b>	<b>Grupo controle (CTL)</b>	<b>Total</b>
	n (%)	n (%)	N (%)
<b>Masculino</b>	8 (26,7)	11 (36,7)	19 (31,7)
<b>Feminino</b>	22 (73,3)	19 (63,3)	41 (68,3)

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 9** - Número de indivíduos grupo controle que apresentaram espécies de *Candida* na bolsa periodontal de acordo com o sexo

<b>Sexo</b>	<b>Casos positivos</b>	<b>Casos negativos</b>	<b>Total</b>
	n (%)	n (%)	N (%)
<b>Masculino</b>	1 (3,3)	10 (33,3)	11 (36,7)
<b>Feminino</b>	3 (10)	16 (53,3)	19 (63,3)

Fonte: dados da pesquisa

A média de idade dos participantes da pesquisa foi de 56 anos no grupo caso e 50 anos no grupo controle, havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,026$ ), quando se avalia a faixa etária (Tabelas 3,4,5).

**Tabela 10** - Faixa etária dos participantes da pesquisa

Idade	grupo caso	Grupo controle	N (total)	p valor	Mann Whitney
Median(IQR)	56(51.2;62)	50 (41.8;58)	53(46.8;59.5)	0,026	

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 11** - Número de indivíduos grupo controle que apresentaram espécies de *Candida* de acordo com a faixa etária

<b>Faixa etária</b>	<b>Leveduras (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>
<b>20-30</b>	1 (3,3)	1 (3,3)
<b>31-40</b>	1 (3,3)	3 (3,3)
<b>41-50</b>	-	9 (30)
<b>51-60</b>	1 (3,3)	9 (30)
<b>61-70</b>	1 (3,3)	4 (13,3)
<b>Total</b>	4 (13,3)	26 (86,7)

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 12** - Número de indivíduos diabéticos que apresentaram espécies de *Candida* de acordo com a faixa etária

Faixa etária	Leveduras (%)	Negativo (%)
20-30	-	1 (3,3)
31-40	-	2 (6,7)
41-50	1 (3,3)	2 (6,7)
<b>51-60</b>	<b>5 (16,6)</b>	9 (30)
<b>61-70</b>	<b>6 (20)</b>	4 (13,3)
<b>Total</b>	<b>12 (40)</b>	18 (60)

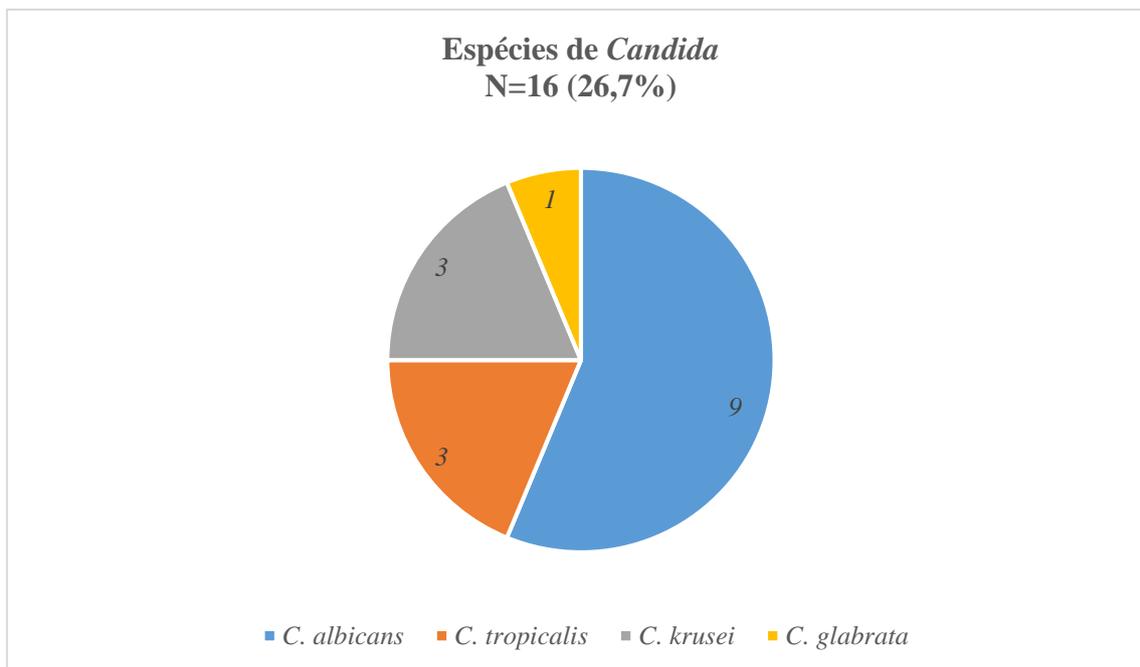
Fonte: dados da pesquisa

Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de bolsas periodontais de 12 (40%) pacientes diabéticos, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente (23,3%), seguindo-se *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%). Da bolsa periodontal de pacientes sem diabetes, foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 13,3% dos pacientes (n = 4), sendo *C. albicans* a mais prevalente (6,7%), seguido de *C. krusei*(3,3%) e *C. tropicalis* (3,3%) (Gráficos 1,2,3); (Tabela 6).

**Tabela 13** - Frequência das espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas de periodontite de indivíduos do grupo caso e controle.

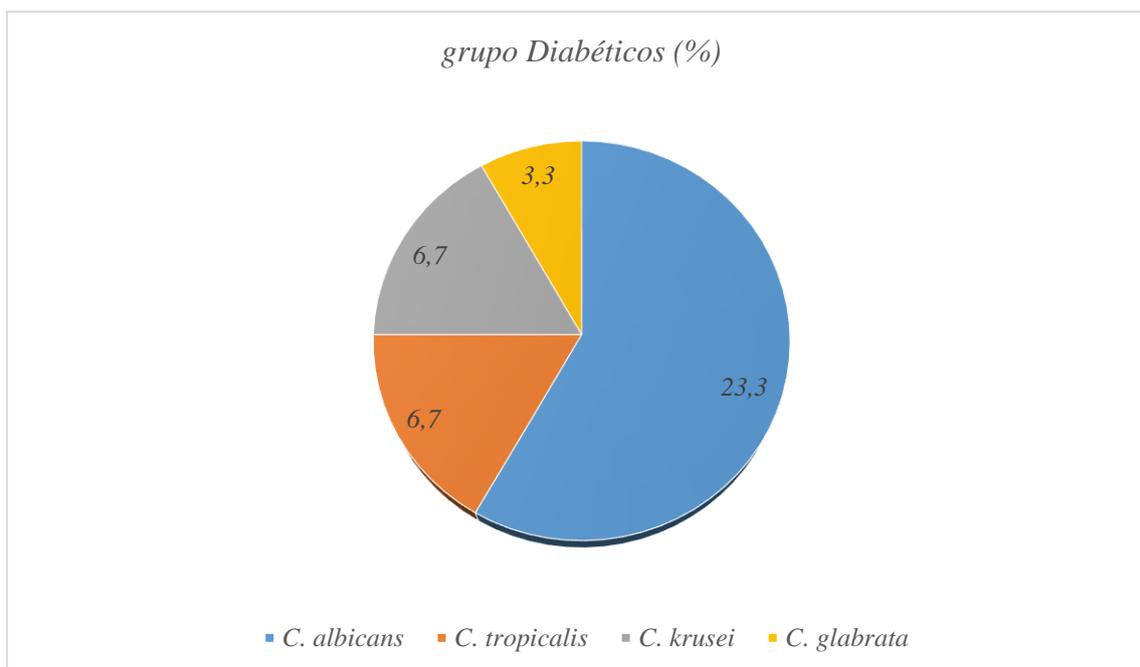
Espécies	grupo caso	grupo controle	Total
	n(%)	n (%)	N (%)
<i>C. albicans</i>	<b>7 (23,3)</b>	<b>2 (6,7)</b>	<b>9 (15)</b>
<i>C. glabrata</i>	<b>1 (3,3)</b>	-	<b>1 (1,7)</b>
<i>C. tropicalis</i>	<b>2 (6,7)</b>	<b>1 (3,3)</b>	<b>3 (5)</b>
<i>C. krusei</i>	<b>2 (6,7)</b>	<b>1 (3,3)</b>	<b>3 (5)</b>
<b>Total de espécies</b>	<b>12 (40)</b>	<b>4 (13,3)</b>	<b>16 (26,7)</b>
<b>p valor = 0,139</b>			

Fonte: dados da pesquisa



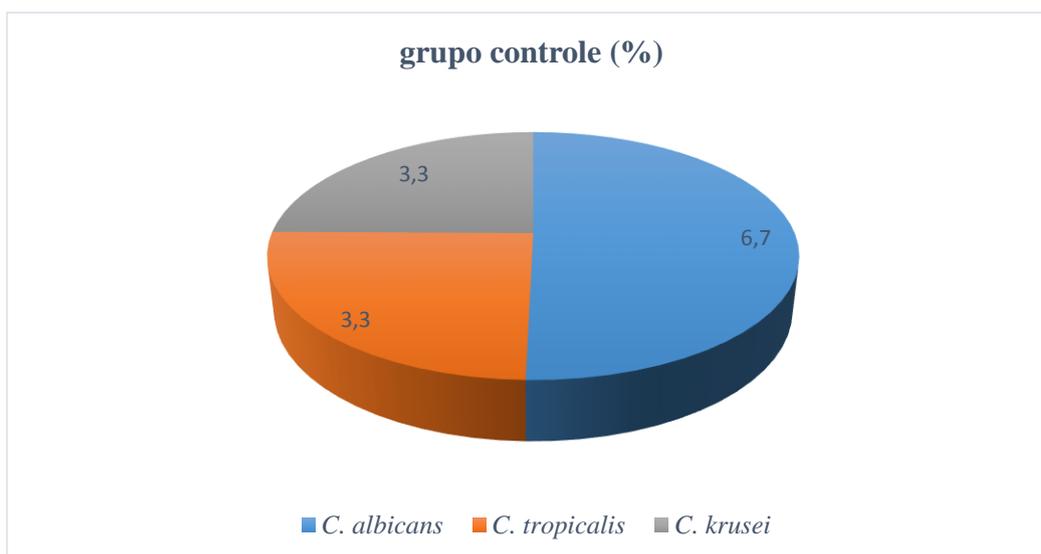
**Gráfico 1:** Espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes diabéticos e controle

Fonte: dados da pesquisa



**Gráfico 2:** Prevalência de espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes diabéticos

Fonte: dados da pesquisa



**Gráfico 3:** Prevalência de espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes sem diabetes.

Fonte: dados da pesquisa

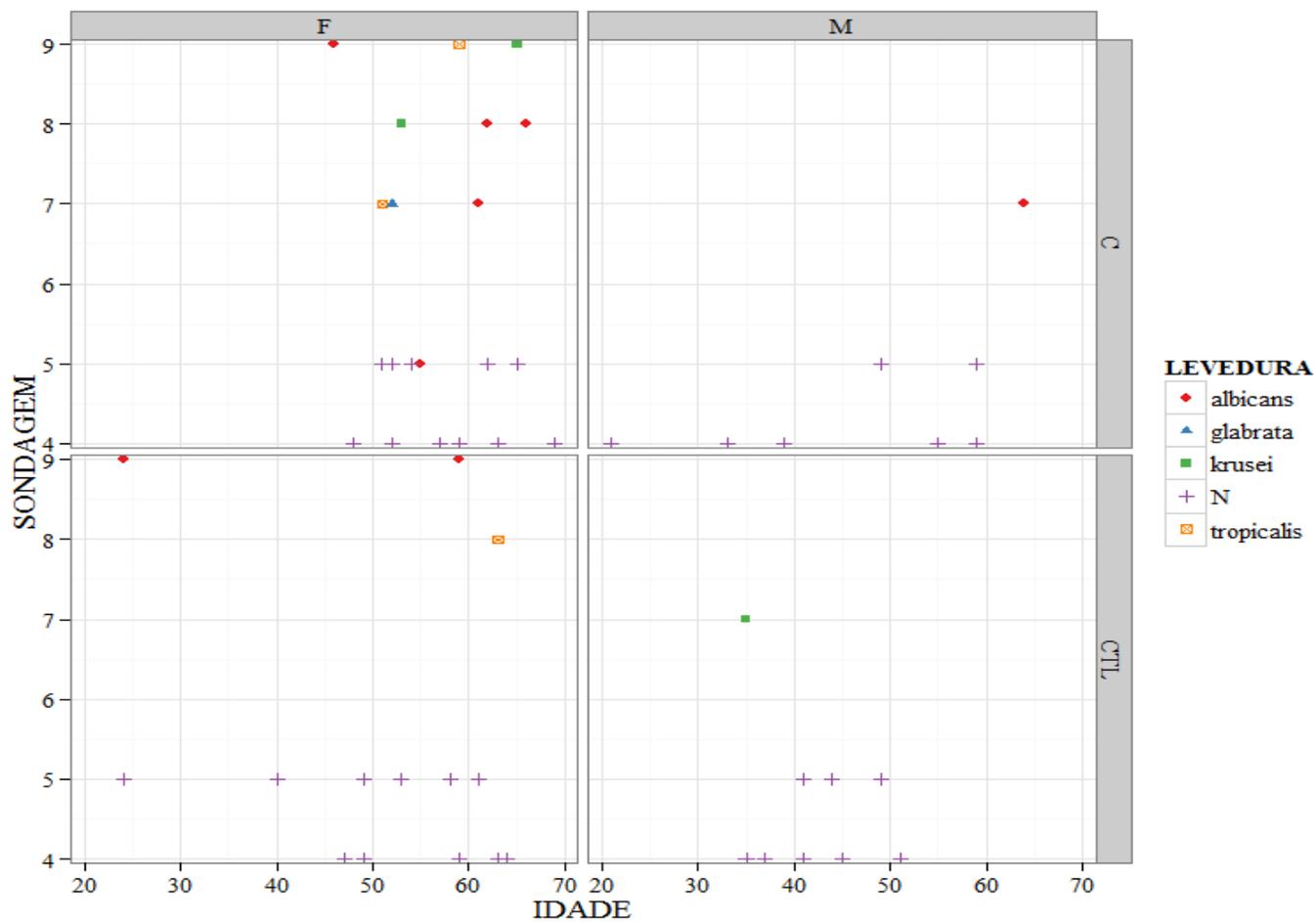
Ao avaliarmos as espécies isoladamente, houve maior predomínio de isolados de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* em pacientes diabéticos, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 6). Entretanto, o número de isolados de espécies de *Candida* coletados de bolsas periodontais de diabéticos (12 isolados) foi significativamente maior que os obtidos do grupo controle (4 isolados), havendo diferença estatística ( $p$  valor=0,041) se avaliarmos categoricamente por gênero (Tabela 7).

**Tabela 14:** Prevalência do gênero *Candida* isoladas de bolsas periodontais de diabéticos e controle.

Espécies	Nº de isolados	
	Diabéticos	Controle
	N=30	N=30
<i>C. albicans</i>	7	2
<i>C. tropicalis</i>	2	1
<i>C. krusei</i>	2	1
<i>C. glabrata</i>	1	-
<b>Total (%)</b>	<b>12 (40%)</b>	<b>4 (13,3%)</b>
<b>p valor=0,041</b>		

Fonte: dados da pesquisa.

Dos indivíduos examinados (grupo caso e controle), 16 (26,7%) apresentaram leveduras do gênero *Candida* somente em regiões onde a sondagem de profundidade foi maior que 5 mm, não havendo diferenças estatísticas entre os dois grupos. (Gráfico 4).



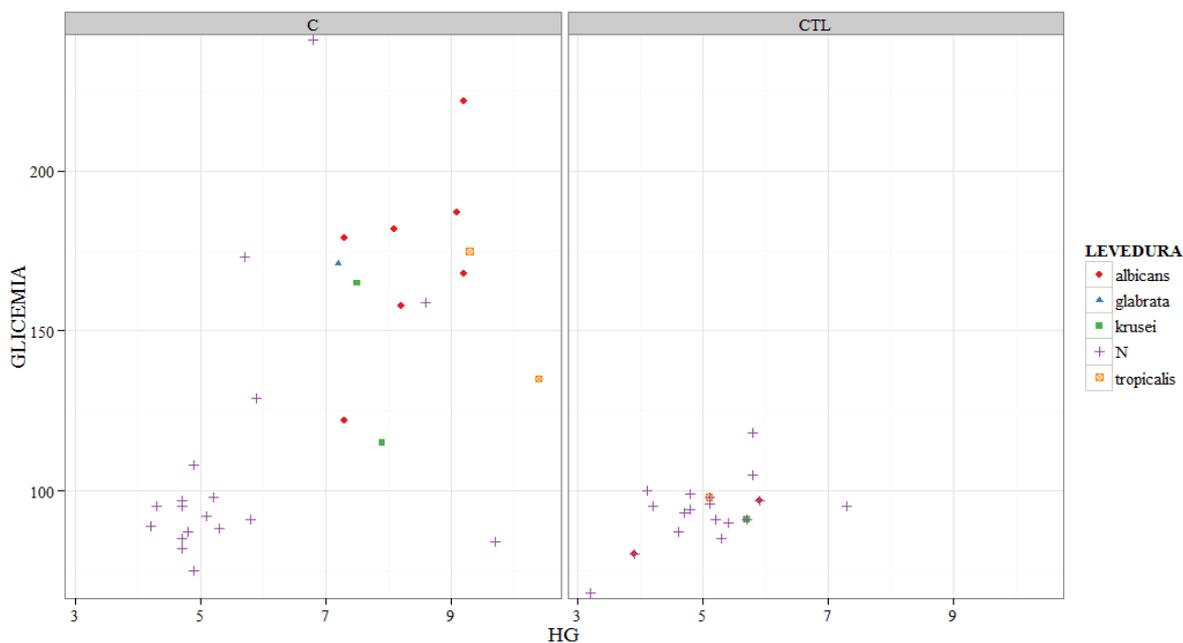
**Gráfico 4:** Presença de leveduras de acordo com profundidade de sondagem e idade dos grupos da pesquisa.

Sondagem= mm

**p valor= 0,27 Mann Whitney**

Fonte: dados da pesquisa

Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p= 0,006$  e  $0,005$  respectivamente) do que indivíduos não diabéticos (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Leveduras encontradas segundo valores de glicemia e hemoglobina glicada (HG) nos grupos caso (C) e controle (CTL).

N= negativos

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 15 -** Presença de *Candida* spp. segundo valores de glicemia e Hemoglobina glicada de pacientes diabéticos e controle.

	Diabéticos		Controle	
	Glicemia >126 HG > 7	Glicemia <126 HG < 7	Glicemia >126 HG > 7	Glicemia <126 HG < 7
<i>Candida</i> (+)	12	-	-	4
<i>Candida</i> (-)	-	18	26	-

**Teste de Mann Whitney**  
**(p valor= 0,06 e 0,05)**

Fonte: dados da pesquisa

Os resultados expressos como valores de Pz médio para cada grupo foram analisados pelo teste estatístico de Mann-Whitney, em nível de significância de 5%.

Todos os isolados (grupo caso e controle) de *C. albicans* mostraram alta atividade de proteinase e fosfolipase. Os valores de Pz para atividade de proteinase dos isolados de

*C. albicans* do grupo caso e controle variaram de 0,41-0,46 e 0,40-0,46, respectivamente, sendo os isolados fortemente positivos para a produção de proteinase, e os valores médios de Pz para atividade de fosfolipase dos grupos caso e controle variaram de 0,42-0,52 e 0,43-0,58, respectivamente, com alta atividade de fosfolipase.

Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de proteinase com valores de Pz variando de 0,61-0,69 e 0,69 nos grupos caso e controle, respectivamente, e Pz de 0,45-0,57 e 0,67 para atividade de fosfolipase nos grupos caso e controle, respectivamente. *C. krusei* tiveram atividade de proteinase com Pz valores de 0,69-0,79 e 0,77 nos grupos caso e controle, respectivamente, e não apresentaram atividade de fosfolipase. Já os isolados de *C. glabrata* apresentaram atividade de proteinase somente no grupo caso, com Pz valor de 0,63. Os isolados foram categorizados por seus níveis de produção de fosfolipase e proteinase. A atividade destas enzimas é mostrada na Tabela 6.

No presente estudo, não houve diferença estatística nas atividades de proteinase e fosfolipase dos isolados de *Candida* entre os grupos analisados (Figura 8).



**Figura 16** - *C. albicans* isoladas de pacientes diabéticos produtoras de fosfolipase em meio ASD enriquecido com gemas de ovos a 37°C após 72h

Fonte: o autor



**Figura 17** - *C. albicans* isoladas de pacientes diabéticos produtoras de proteinases em meio com albumina a 37°C após 7dias.

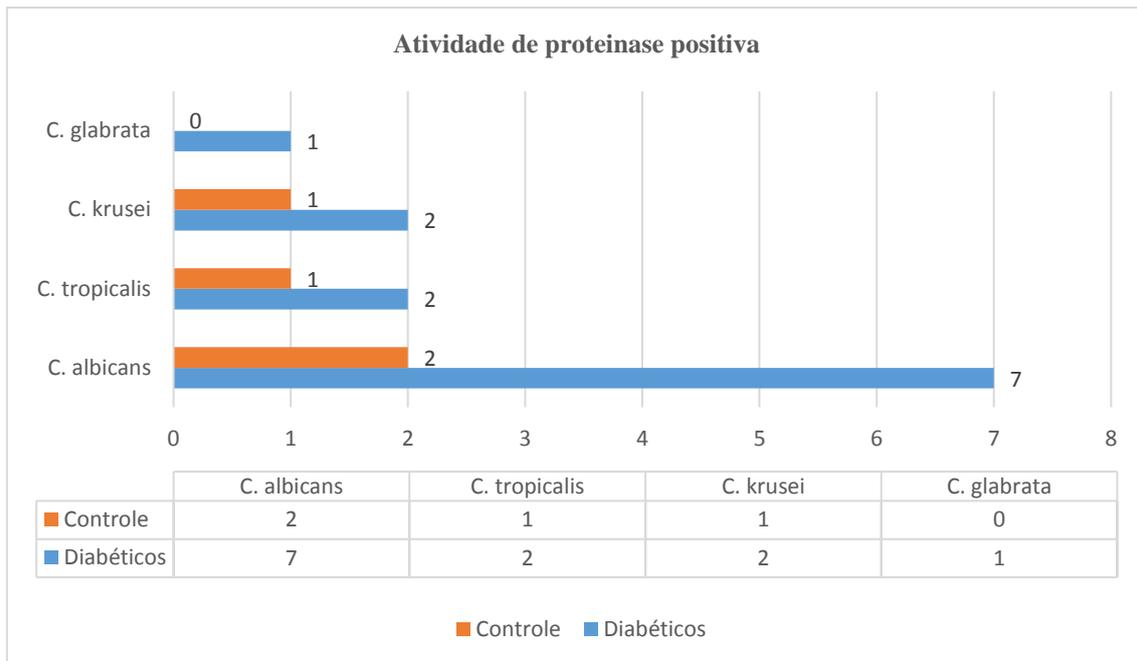
Fonte: o autor

**Tabela 16** -Valores de Pz obtidos nos testes de produção de proteinase e fosfolipase pelo isolados provenientes dos grupos diabéticos e controle

Espécies	Produção de enzimas (Pz valor)							
	Grupo caso		Grupo controle					
	n	fosfolipase	n	proteinase	n	fosfolipase	n	proteinase
<i>C. albicans</i>	7	0,42±0,10	7	0,41±0,05	2	0,43±0,15	2	0,43±0,03
<i>C. tropicalis</i>	2	0,45±0,12	2	0,61±0,05	1	0,41±0,13	1	0,69
<i>C. krusei</i>	2	1	2	0,69	1	1	1	0,77
<i>C. glabrata</i>	1	1	1	0,63	-	-	-	-

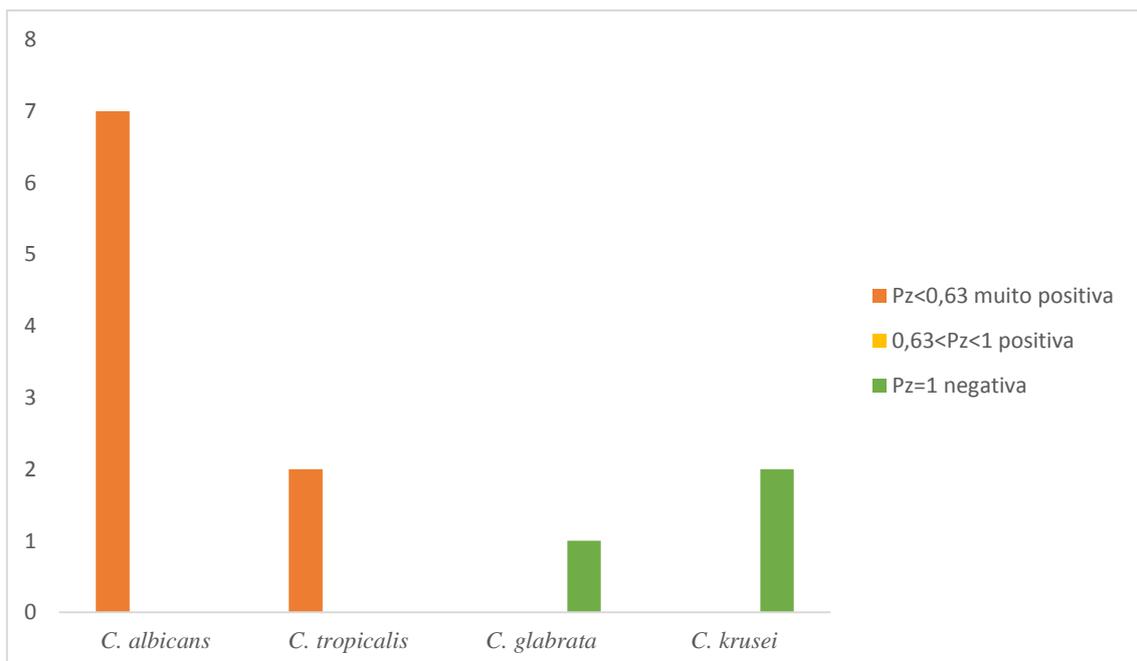
Nenhuma diferença estatisticamente significativa (p=0,269).

Fonte: dados da pesquisa



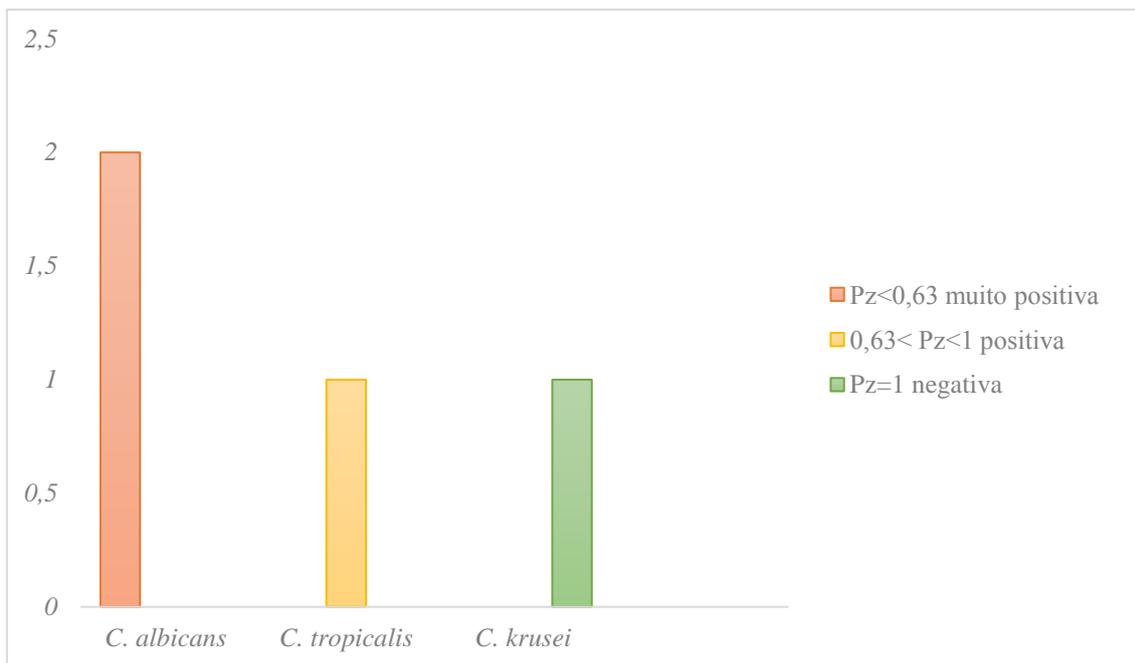
**Gráfico 6** - Distribuição das amostras de *Candida* provenientes da bolsa periodontal de pacientes diabéticos e controle segundo a atividade de proteinase.

Fonte: dados da pesquisa



**Gráfico 7** - Atividade de fosfolipase das espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de diabéticos

Fonte; dados da pesquisa



**Gráfico 8** - Atividade de fosfolipase das espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes do grupo controle.

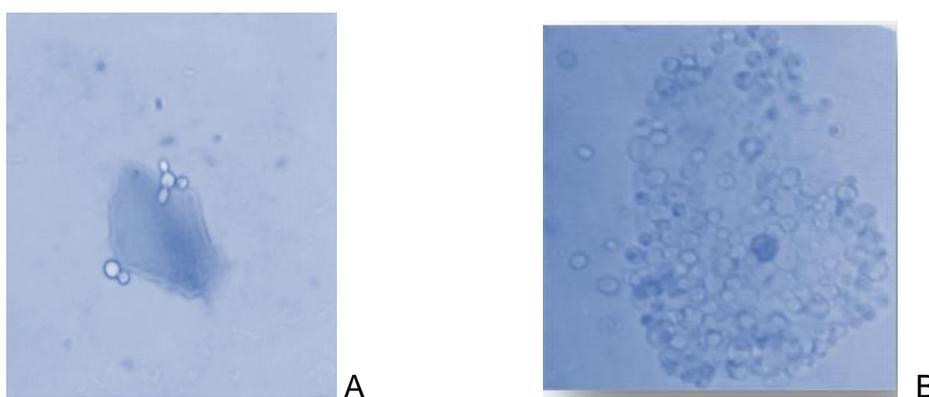
Fonte: dados da pesquisa

A capacidade de aderência dos isolados de *Candida* às células epiteliais está sumarizada na Tabela 7. Sete dos 9 (77,7%) isolados de *C. albicans* e dois dos 3 de *C. tropicalis* (66,7%) aderiram fortemente, enquanto que todos os isolados de *C. krusei* e um isolado de *C. glabrata* apresentaram fraco padrão de aderência. Não houve diferença significativa entre os grupos, apesar do maior número de isolados de espécies de *Candida* dos pacientes diabéticos apresentarem capacidade de adesão.

**Tabela 17** - Avaliação da capacidade de aderência à célula epitelial bucal (CEB) de isolados de *Candida* obtidos de bolsas periodontais de pacientes diabéticos e controle

Etiologia	Número médio de leveduras aderidas a 10 CEB + dp	
	Diabéticos	Controle
<i>C. albicans</i> <sup>xx</sup>	145±33	120±31
<i>C. tropicalis</i> <sup>xx</sup>	125±74	111
<i>C. krusei</i> <sup>0</sup>	17±11	44
<i>C. glabrata</i> <sup>0</sup>	41	SA

Alta aderência (xx), fraca aderência (0), SA= sem aderência  
dp= desvio padrão



**Figura 18** - Fraca aderência de *C. Krusei* (A) e alta aderência de *C. Albicans* (B) às células epiteliais orais. Ampliação: 40x

Fonte: dados da pesquisa

## 6- DISCUSSÃO

*Candida* spp. bucais são leveduras comensais e sua transformação em patógeno oportunista ocorre da combinação de alguns fatores que podem afetar esse equilíbrio como alterações do ambiente da cavidade bucal, do próprio fungo, e da imunidade do hospedeiro, principalmente em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência

humana (HIV), com deficiência nutricional, neoplasias ou com doença metabólica como diabetes mellitus (TEKELI et al.,2004).

Diversos estudos sobre *Candida* spp. em pacientes com periodontite e com fatores de risco para candidoses têm sido documentados, mas o papel de *Candida* spp. na cavidade bucal de indivíduos diabéticos é controverso, e a sua prevalência nesses pacientes varia de 18 a 80% (SOYSA et al.,2006), dependentes da metodologia utilizada no laboratório, ao número e as características dos indivíduos, às técnicas de amostragem, e a fatores sociais.

No presente estudo, leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de bolsas periodontais de 12 (40%) dos pacientes diabéticos, e a presença de *Candida* spp. em pacientes com periodontite e sem diabetes foi de 13,33%, corroborando com os resultados do isolamento de *Candida* em outros estudos que variaram de 7,96 a 69,2% (ALBANDAR, 2002; REYNAULD et al., 2001; JAVED et al., 2009; JARVENSIVU et al., 2004; SARDI et al., 2010; SUAREZ et al., 2014). Esses resultados sugerem que a maior prevalência destas leveduras em bolsas periodontais de diabéticos podem indicar a coparticipação destes microrganismos na progressão da doença periodontal nesses pacientes.

Nesse estudo, *C. albicans* foi a mais prevalente nas bolsas periodontais dos dois grupos, sendo 23,3% nos pacientes diabéticos e 6,7% naqueles sem diabetes. DAHLEN et al. (1995) estudaram a frequência e prevalência de hastes entéricos, estafilococos e *Candida* em amostras de placa subgengival de pacientes submetidos a tratamento periodontal, e os fungos foram recuperados a partir de 7,3% das amostras. Entretanto, Peixoto et al. (2010) em uma revisão da literatura sobre a colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais, encontrou uma média de 20% de *C. albicans* de bolsas periodontais de pacientes com periodontite, numa prevalência maior que a encontrada no nosso estudo.

Em estudo realizado por Kignel et al. (2000) analisando aspectos fúngicos do câncer bucal, verificaram que dos 33 pacientes imunossuprimidos que participaram da pesquisa, 42,4 % foram positivos para *Candida* spp. Martins et al. (2002) analisando a presença de *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. na cavidade oral, encontraram a levedura em 61,22 % dos pacientes estudados.

Numa revisão de literatura sobre a presença de *Candida* spp. na doença periodontal, Sardi et al. (2010) encontraram *C. albicans* em 57,3%, *C. tropicalis* em

15,85% e *C. glabrata* em 4,87% de bolsas periodontais de pacientes diabéticos. Num estudo que avaliou a presença de leveduras nas cavidades orais de pacientes diabéticos, Suarez et al. (2013) encontraram uma prevalência de 74,8% de *Candida* spp, confirmando uma variabilidade em relação ao nosso estudo que pode ser resultante de fatores sociais ou da técnica de amostragem. Além disso, os pacientes poderiam estar com o sistema imunológico menos atuante, o que pode ter contribuído para a colonização pelas leveduras.

Na literatura, diabetes do tipo 2 tem alta prevalência e seu acometimento aumenta de acordo com a faixa etária, principalmente em indivíduos acima dos 40 anos o que coincide com a faixa etária na qual ocorre maior prevalência de doença periodontal grave ou avançada (ALBANDAR, 2002).

O porcentual de isolamento de leveduras observado nos pacientes neste estudo foi maior na faixa etária entre 50 e 60 anos, corroborando com dados do Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil, que evidenciou a influência da idade na prevalência de Diabetes e observou incremento de 2,7% na faixa etária de 30 a 59 anos e de 17,4% na faixa etária de 60 a 69 anos. Em nosso estudo, os dois grupos estudados de diabéticos e não diabéticos diferiram estatisticamente em relação à idade ( $p=0,026$ ), em desacordo com outros estudos (DOROCKA-BOBKOWSKA et al., 1996; GARCÍA-MARTOS et al., 1998).

O maior número de participantes e de amostras positivas foram provenientes de mulheres, concordando com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) que estimou que, no Brasil, 6,2% da população com 18 anos ou mais de idade referiram diagnóstico médico de diabetes, sendo de 7,0% nas mulheres e de 5,4% nos homens. Essa maior proporção no estudo talvez possa ser justificada pelo fato do sexo feminino possuir maior assiduidade na realização de exames de rotina e dedicação aos assuntos relacionados à saúde, associados à disposição para participar da pesquisa (SCHMIDT et al., 2014; IBGE, 2013).

No nosso trabalho, houve maior colonização de *Candida* spp. nos pacientes diabéticos com glicemia e hemoglobina glicosilada elevadas, havendo diferença estatística entre os grupos, e concordando com alguns trabalhos que indicam alteração da colonização de leveduras nas cavidades orais pelos níveis de glicose no sangue pois os níveis de glicose em pacientes diabéticos favorecem o crescimento da levedura com

aumento do número de receptores disponíveis para *Candida* (KHOSRAVI et al., 2008, SARDI et al., 2012; SUAREZ et al., 2014).

Além disso, a degeneração microvascular encontrada em exames histológicos de pacientes diabéticos podem facilitar a colonização por *Candida* tornando-os mais susceptíveis a infecções associado à deficiência de neutrófilos nesses pacientes (DARRE et al., 2008). Entretanto, nossos resultados discordam com o relatório de Manfredi et al. (2002) que afirmam que a frequência de isolados de *Candida* independem do estado do portador e da hemoglobina glicada (HG), e sugerem que o crescimento das leveduras na cavidade bucal de pacientes diabéticos depende de outros fatores.

Diferentes trabalhos indicam *C. albicans* como a levedura isolada com maior frequência nas cavidades orais de pacientes diabéticos (BELAZI et al., 2005; KADIR et al., 2002; KHOSRAVI et al., 2008; TEKELI ET AL., 2004). No presente estudo, esta espécie foi a mais prevalente e encontrou-se com maior frequência tanto em indivíduos controlados quanto nos indivíduos descontrolados. Contudo, outros estudos com pacientes diabéticos e controles saudáveis constataram que as espécies de *C. albicans* não foram mais prevalentes nos indivíduos diabéticos (JAVED et al., 2009). Algo semelhante foi observada em pacientes com HIV, em que os isolados de espécies de *C. albicans* não é mais prevalente em estágios avançados da doença (CASTRO et al., 2013).

A descoberta de isolados de espécies de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* em nosso estudo corrobora outros relatórios que destacam a importância das espécies de *Candida* não-*albicans* como agentes patogênicos em seres humanos indutores de infecções sistêmicas com os seguintes fatores de risco: imunossupressão (AIDS, doentes com neutropenia), uso prolongado de dispositivos endovenosos ou dispositivos protéticos. Entretanto, são escassos os estudos exploratórios que identifiquem essas espécies de *Candida* como responsáveis pela candidíase oral nesses pacientes (NETEA et al., 2008; SARDI et al., 2012; SUAREZ et al., 2014)

As espécies de *C. albicans* têm sido relacionados com a resistência às substâncias antifúngicas (CASTRO et al., 2013). Neste trabalho, esse fator não pôde ser relacionado com a presença destas leveduras, uma vez que foram excluídos pacientes com terapia antifúngica e não foram realizados testes de susceptibilidade a estes medicamentos.

Diabetes Mellitus é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da doença periodontal, sobretudo em pacientes com mau controle da doença (SOYSA et al., 2006). Nosso estudo não encontrou associação estatística entre profundidade de sondagem das bolsas periodontais e controle glicêmico. Sondagens maiores que 5 mm, que refletem moderada gravidade periodontal, foram semelhantes para ambos os pacientes (diabéticos e não diabéticos). Estes resultados coincidem com o estudo realizado por Arrieta et al. (2003) que relataram que nenhuma relação existe entre situação periodontal e controle metabólico da doença.

A microbiota periodontal em pacientes diabéticos é similar à dos não diabéticos, e outros fatores podem estar envolvidos na maior prevalência desta complicação em diabéticos, como a anormalidade da resposta imune do hospedeiro frente às infecções bucais (GREGHI et al., 2002; HERRING; SHAH, 2006; VERNILLO, 2003).

*Candida* é o agente etiológico mais frequente de infecções fúngicas. Ela provoca infecções oportunistas principalmente em pacientes imunodeprimidos. Doenças como a diabetes mellitus, insuficiência renal, transplante de órgãos, e neutropenia são os principais fatores predisponentes para infecções por *Candida*.

A capacidade de produção de proteinase e de fosfolipase, aderência à superfície de células do hospedeiro, além de resistência aos antifúngicos são considerados importantes fatores de virulência para espécies de *Candida*, podendo desempenhar um papel essencial na capacidade de se estabelecer como um microrganismo infeccioso e colonizador (CALDERONE & FRONZI, 2001; YANG Y.L., 2003).

A produção de proteinase aumenta a capacidade de colonização e penetração no tecido hospedeiro, destruindo seu sistema imunitário. (KANTARCIOGLU e YUCEL, 2002). Enzimas lipolíticas, tais como fosfolipases, penetram na célula hospedeira aumentando a adesão às células epiteliais com conseqüente invasão do epitélio oral, favorecendo as infecções por *Candida* (TREVINO-RANGEL et al., 2013). Estudos anteriores confirmaram que a alta produção de fosfolipase está ligada a um maior grau de patogenicidade (MITROVIC et al., 1995; NIEWERT; KORTING, 2001).

Os isolados de *Candida albicans* e *C. tropicalis* produziram maior atividade de proteinase e fosfolipase que as demais espécies (Tabela 7). Esta observação concorda com os resultados de D'Eça Júnior et al. (2011) que comparando *in vitro* a produção enzimática

de isolados de *Candida* spp., observaram que a maioria dos isolados de *Candida albicans* foram produtores de proteinase e fosfolipase e 91,7% dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de fosfolipase.

Neste trabalho, embora não estatisticamente significativo, os isolados de *C. albicans* produziram mais proteinase e fosfolipase do que espécies de *Candida* não-*albicans* sendo detectados em 100% de seus isolados. Estes resultados podem ser atribuídos à característica da cepa, concordando com o resultado de outros autores que observaram que *Candida albicans* apresentou um percentual significativamente maior de isolados produtores de proteinase e fosfolipase num estudo sobre a produção de fosfolipase e proteinase em isolados clínicos de várias espécies de *Candida* (KANTARCIOGLU E YUCEL, 2002; SILVA, J.O. et al., 2007).

No presente estudo não houveram diferenças estatísticas quanto aos fatores de virulência produzidos por isolados de *Candida albicans* entre indivíduos do grupo controle e em pacientes diabéticos, concordando com resultados obtidos por outros autores que apontaram variações de atividade enzimática entre 60% a 100% para proteinase e 50 a 100% para fosfolipase (SAMARANAYAKE et al., 2002; MANFREDI et al., 2006; KOMIYAMA et al. 2007; ARSLAN et al., 2016).

Entretanto, MANFREDI et al. (2006) demonstraram que a expressão de proteinase não é significativamente mais elevada em isolados de *Candida* de pacientes com diabetes quando comparados aos pacientes saudáveis e que pacientes com diabetes tipo 2 têm maiores níveis de proteinase do que os pacientes com diabetes tipo 1. No presente estudo, não houve diferença estatística nos níveis de proteinase e fosfolipase observados entre os pacientes diabéticos e não-diabéticos, concordando com outros autores (MANFREDI et al., 2006; ARSLAN et al., 2016).

Estudos relataram que 30 a 100% dos isolados orais de *C. albicans* produzem fosfolipases com graus variáveis de atividade enzimática (HANNULA et al., 2000; BARROS et al., 2008, SARDI et al., 2012). Em nossa pesquisa, uma alta atividade de fosfolipase e proteinase foi detectada em 100% dos isolados de *Candida albicans* de diabéticos, concordando com o estudo de TSANG et al., (2007), que encontraram uma alta atividade de proteinase em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

No nosso estudo, isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de proteinase e fosfolipase, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle. *C. krusei* apresentou positividade para proteinase e nenhuma atividade de fosfolipase entre os dois grupos de pacientes, e *C. glabrata* isolada do grupo de diabéticos apresentou somente atividade de proteinase.

Estas observações são em desacordo com os resultados obtidos por Rorig et al., (2009), que determinou que isolados de *C. albicans* apresentaram a maior produção enzimática e que as espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não revelaram atividade de fosfolipase e proteinase. Da mesma forma, um estudo realizado por Negri et al., (2010) observaram que apenas um isolado de *C. tropicalis* dos sete obtidos a partir de um cateter venoso central foi positivo para atividade de fosfolipase.

Neste trabalho, todos os isolados de *C. albicans* das bolsas periodontais dos dois grupos apresentaram uma atividade muito forte de fosfolipase e proteinase. As espécies de *Candida* não-*albicans* mostraram atividade de proteinase e média ou nenhuma atividade de fosfolipase. Contrariando esses resultados, Oksuz et al., (2007) estudaram amostras de *Candida* e verificaram que a maioria de espécies de *C. albicans* desenvolveram fortes atividades de enzimas. Dentre as espécies não-*albicans*, os isolados desenvolveram alta atividade de fosfolipase e baixa de proteinase.

*Candida tropicalis* é um patógeno conhecido por ser importante nas infecções nosocomiais (KOTHAVADE et al., 2011; NEGRI et al., 2010). Todos os isolados de *C. tropicalis* analisados no nosso estudo apresentaram atividade de proteinase e fosfolipase, enzimas consideradas como importante fator de virulência e que podem estar envolvidas na patogênese de espécies de *Candida albicans* (YAMAMOTO et al., 1992).

Os resultados para a *C. glabrata* indicam que esta espécie pode produzir proteinase, o que poderia estar relacionado à virulência dessa espécie. Estes dados são importantes e diferentes da maioria dos encontrados na literatura que afirmam que *C. glabrata* não produz níveis significativos de atividade de proteinase (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; KAUR et al. 2005).

MANE et al. (2011) avaliaram a produção de enzimas de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* e os resultados foram 89,7% e 59,0%, respectivamente. No nosso estudo, 100% dos isolados de *C. albicans* apresentaram atividade proteolítica e de fosfolipase, o

mesmo sendo observado por outros autores (OLIVEIRA et al,1998; BOSCO et al, 2003; LYON e RESENDE, 2006). Todos esses fatores de virulência aumentam a patogenicidade da *Candida*, que poderia colaborar na progressão da doença periodontal, principalmente em pacientes imunodeficientes.

A adesão das células de *Candida* às células epiteliais bucais (CEB) é um fenômeno complexo e multifatorial que se baseia na expressão de diversos tipos de adesinas nas superfícies de células modificadas morfológicamente. Além disso, possuem a habilidade em formar biofilme sobre as células do hospedeiro resultando na estabilidade da aderência do fungo aos tecidos (KHAN, 2010).

No presente estudo, os isolados de *C. albicans* apresentaram maior adesão à célula epitelial bucal do que espécies de *Candida* não-*albicans*, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos analisados, concordando com estudo feito por Costa, (2009), que avaliou fatores de virulência e características moleculares de leveduras do gênero *Candida* isoladas de amostras do sangue, de cateter de pacientes nosocomiais e da cavidade bucal de pacientes HIV positivos, verificando que a capacidade de aderência à célula epitelial foi maior em *C. albicans* que *Candida* não-*albicans*, no entanto não houve diferença de comportamento entre os isolados obtidos dos diferentes locais estudados.

A alta habilidade de aderência apresentada por *C. albicans* pode indicar maior virulência quando comparadas às espécies de *Candida* não-*albicans*. A aderência pode ser considerada como processo multifatorial específico envolvendo vários tipos de adesinas na superfície das células de *Candida* além da variedade de sítios de ligação às células do hospedeiro (KENNEDY, 1988).

Outros estudos também demonstraram que espécies de *C. albicans* são mais aderentes às células epiteliais bucais que outras espécies de *Candida* (BIASOLI; TOSELLO; MAGARÓ, 2002; LYON; RESENDE, 2007; COSTA et al., 2010, DINIZ, 2011), entretanto há pouca informação sobre espécies menos patogênicas como *C. krusei* (SAMARANAYAKE et al., 1998). Em nossa pesquisa, isolados de *C. albicans* apresentaram maior mediana de adesão à célula epitelial bucal que os isolados de *Candida* não-*albicans*, entretanto não houve diferença estatística entre eles ( $p= 0,269$ ) provavelmente ao reduzido número de amostras. *Candida albicans* foi a que apresentou

maior capacidade de adesão seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, corroborando com resultados de Lyon e Resende (2006). *C. krusei* é uma espécie pouco patogênica e com baixa capacidade de aderência (SAMARANAYAKE et al., 1998).

A baixa patogenicidade de *C. krusei* verificada em nossa pesquisa reflete uma habilidade reduzida em se aderir às células epiteliais bucais. Estudos realizados por Samaranayake et al. (1994) demonstraram que a aderência de *C. krusei* às células epiteliais bucais de indivíduos saudáveis foi 10 vezes menor que para *C. albicans*.

Samaranayake et al. (1998) avaliou a patogenicidade, colonização e infectividade de *C. krusei* e *C. albicans* na mucosa oral de ratos normais e imunocomprometidos, demonstrando que *C. albicans* foi capaz de colonizar línguas dos dois grupos de animais. *C. krusei* não foi capaz de infectar animais normais, entretanto provocou lesões extensas em ratos imunocomprometidos.

Uma revisão da literatura discutiu os avanços recentes no conhecimento de fatores de virulência de *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, especificamente os de adesão e formação de biofilme, que são componentes-chave na patogenicidade de espécies de *Candida*. Todas as espécies analisadas foram capazes de formarem biofilme, sendo menos extensos para *C. glabrata* em comparação com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O estudo demonstrou que a capacidade de formação do biofilme, a estrutura e composição da matriz são altamente dependentes das espécies (SILVA, S. et al., 2011).

Apesar dos resultados desse trabalho não indicarem diferenças estatisticamente significativas na maior produção de fosfolipase e proteinase por cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes diabéticos com periodontite, tais enzimas são consideradas importantes na invasão tecidual (GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990; NIEWERTH e KORTING, 2001), e este pode ser um dado importante para o entendimento do papel das leveduras do gênero *Candida* na patogênese da doença periodontal em diabéticos. .

## CONCLUSÕES

- *Candida* spp foi encontrada na periodontite de pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis, porém em proporções distintas.
- *Candida albicans* foi a espécie isolada mais prevalente em diabéticos (23,3%), seguida de *C. tropicalis* (6,75%), *C. krusei* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%).
- Encontrou-se maior prevalência de espécies de *Candida* em indivíduos diabéticos com periodontite, glicemia e hemoglobina glicada elevadas (40%) comparados aos indivíduos com periodontite e sem diabetes (13,3%), sugerindo que a imunossupressão e descontrole glicêmico desses pacientes podem contribuir para a colonização de leveduras nas bolsas periodontais e consequente progressão da doença periodontal.
- Todos os isolados (grupo caso e controle) de *C. albicans* mostraram atividade de proteinase, fosfolipase e aderência às células epiteliais.
- Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de proteinase e fosfolipase e moderada aderência nos dois grupos, *C. krusei* apresentou positividade para proteinase somente nos diabéticos, pouca aderência e nenhuma atividade de fosfolipase entre os dois grupos, e *C. glabrata* apresentou somente atividade de proteinase no grupo de diabéticos.

Considerando-se a colonização e o desenvolvimento de fatores de virulência das cepas de *C. albicans* e *não-albicans* isoladas, poderíamos sugerir uma correlação entre a produção desses fatores e sua patogenia, principalmente se isoladas de indivíduos diabéticos considerados clinicamente imunocomprometidos. A presença de fatores de virulência nas amostras isoladas de bolsas periodontais de pacientes diabéticos sugere a importância do estudo sistemático desses fatores, visto que a periodontite pode ser o foco de disseminação de infecções profundas.

### Considerações Finais

Estudos posteriores serão necessários para determinar o real impacto desses achados sobre a disseminação da infecção periodontal em diabéticos.

## REFERÊNCIAS

1. ALBANDAR, JM. *Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. Periodontol 2000*. 2002; 29: 177-206.
2. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. J Periodontol*, v.71, n. 5, suppl., p. 853-5, May 2000.
3. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Parameter on “refractory” periodontitis. *J Periodontol*, v.71, n. 5, suppl., p. 859-60, May 2000.
4. ARRIETA, JJ; BARTOLOMÉ, B; JIMÉNEZ, E; SAAVEDRA, P; ARRIETA, FJ. Problemas bucodentales en pacientes con diabetes mellitus (II): Índice gingival y enfermedad periodontal. *Med Oral*. 2003; 8: 233-47.
5. BANNO, Y; YAMADA, T; NOZAWA, Y. *Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, Candida albicans separation of three enzymes and some biological properties. Sabouraudia: J Med Vet Mycol*, v.23, n.1, p.47-54, Feb. 1985.
6. BARRETT-BEE, K. et al. *A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol*, v.131, p. 1217-21, 1985.
7. BELAZI, M; VELEGRAKI, A; FLEVA, A; GIDARAKOU, I; PAPANAU, L; BAKA, D. et al. *Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. Mycoses*. 2005; 48: 192-6.
8. BENDOVIÁ, O. The *killer* phenomenon in yeasts. *Folia Microbiol*, v.31, n.5, p.422-33, 1986.
9. BORG, M; RÜCHEL, R. *Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of Candida albicans and Candida tropicalis. J Med Vet Mycol*, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1990.
10. BORG, M; RÜCHEL, R. *Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic Candida spp. during experimental infection of oral mucosa. Infect Immun*, v. 56, n. 3, p. 626-31, 1988.
11. BRASIL- Estudo multicêntrico sobre a prevalência do diabetes mellitus no Brasil. Brasília- Ministério da Saúde - 1991.

12. BROWNLEE, M. *Glycation and diabetic complications*. **Diabetes**, 43: 836-841, 1994.
13. BROWNLEE, M; CERAMI, A; VLASSARA, H. *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. **N Engl J Med** 1988; 318:1315-21.
13. CASTRO, LA; ÁLVAREZ, MI; MARTINEZ E. *Pseudomembranous candidiasis HIV/AIDS patients in Cali, Colombia*, **Mycopathol**. 2013; 175: 95-8.
14. CUTLER, JE. *Putative virulence factors of Candida albicans*. **Ann Rev Microbiol**, v. 45, p. 187-218, 1991.
15. DAHLEN, G; WILKSTRÖN, M. *Occurrence of enteric rods, staphylococci and Candida in subgingival samples*. **Oral Microbiol Immun**, v. 10, n. 1, p. 42-6, 1995.
16. DARRE, L; VERGNES, JN; GOURDY, P; SIXOU, M: *Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies*. **Diabetes & metabolism** 2008; 34:497-506
17. DOROCCA-BOBKOWSKA, B; BUDTZ-JORGENSEN, E; WLOCH, S. *Non-insulindependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis*. **J Oral Pathol Med**.1996; 25:411-5.
18. FROST, G.I; CSÓKA, T; STERN, R. *The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview*. **Trends Glycosc Glycolechnol**, 1996. v. 8, n. 44, p.419-34.
19. GARCÍA-MARTOS, P; GARCÍA-AGUDO, R; HERNÁNDES-MOLINA, JM; MARÍN, P; TARELLO, E; MIRA, J. *Identificación de leveduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida*. **Rev Iberoam Micol**. 1998. 15 : 131-135.
19. GOLDENBERG P, SCHENKMAN S, FRANCO LJ. Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos. **Rev Bras Epidemiol**.2003; 6(1):18-28.
- IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, IBGE, 2014, 180p.
20. SARDI, J; DUQUE, C; MARIANO, F; PEIXOTO, I; HOFLINGER, J; GONCALVES, R. *Candida spp. in periodontal disease: a brief review*. **J Oral Sci**. 2010 Jun; 52(2):177-185.

21. JÄRVENSIVU, A; HIETANEN, J; RAUTEMAA, R; SORSA, T; RICHARDSON, M. *Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo* **Oral Diseases** 2004,10,106-12.
22. JAVED, F; KLINGSPOR, L; SUNDIN, U; ALTAMASH, M; KLINGE, B; ENGSTROM, PE. *Periodontal conditions, oral Candida albicans and salivary proteins in type2 diabetic subjects with emphasis on gender.* **BMC Oral Health**. 2009 May12; 9:12.
23. KADIR, T; PISIRICILER, R; AKYÜZ, S; YARAT, A; EMEKLI, N; IPBÜKER, A. *Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local and etiologic and systemic factors.* **J Oral Rehabil**. 2002; 29: 452-7.
24. KIGNEL, S; BIRMAN, EG. Aspectos fúngicos do câncer bucal. **Rev. Bras. Canc.**, v.46, n.3, p.279-282, 2000.
25. KHOSRAVI, A; YARAHMADI, S; BAIAT, M; SHOKRI, H; POURKABIREH, M. *Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus.* **J Med Mycol**. 2008; 18: 83-8.
26. LOE, H. Periodontal disease. *The sixth complication of diabetes mellitus.* **Diabetes Care** 1993; 16: 329-334.
27. MCCOURTIE, J; DOUGLAS, LJ. *Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources.* **Infect Immun** 1981; 32(3):1234-41.
28. MANFREDI, M; AL-KARAAWI, Z; MCCULLOUGH, M; HUREL, S; PORTER, S. *The isolation, identification and molecular analysis of candida spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus.* **Oral Microbiol Immunol**. 2002; 17: 181-5.
29. MARTINS, CAP; SANTOS, SSF; LOBERTO, JCS; KOGA-ITO, CY; JORGE, A.O.C. Presença de Candida spp em pacientes com periodontite crônica. **Cienc. Odontol. Bras**, v. 5, n. 3, p. 75-83, 2002.
30. ODDS, MWJ; YEH, CK. *Johnson Salivary alterations in type2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension.* **Community Dentistry and Oral Epidemiology** 2000; 28: 373-81.

31. PEIXOTO, ITA; SARDI, JCO; ANÍBAL, PC; GONÇALVES, RB; HÖFLING, JF. Evidências científicas da colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais. **RFO**, Passo Fundo, maio/ago2010. v. 15, n. 2, p. 177-182.
32. PIZZO, G; BARCHIESI, F; FALCONI, DI; FRANCESCO, L; GIULIANA, G; ARZENI, D; MILICI ME, et al. *Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival Candida albicans isolates*. **Arch Oral Biol** 2002; 47:189-96.
33. RAMS, TE; SLOTS, J. *Candida biotypes in human adult periodontitis*. **Oral Microbiol Immunol**. 1991; 6(3):191-2.
34. REYNAUD, AH; NYGAARD-OSTBY, B; BOYGARD, GK; ERIBE, ER. *Yeast in periodontal pockets*. **J. Clin Periodontal** 2001; 28:860-64.
35. SAMARANAYAKE, LP; MACFARLANE, TW. *The adhesion of the yeast Candida albicans to epithelial cells of human origin in vitro*. **Arch Oral Biol** 1981; 26(10):815-20.
36. SANDBERG, GE; SUNDBERG, HE; FJELLSTROM, CA; WIKBLAD, KF. *Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects*. **Diabetes Res Clin Pract** 2000; 50: 27-34.
- SCHMIDT, MI; HOFFMANN, JF; DINIZ, MFS et al. *High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia – The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil)*. **Diabetol Metab Syndr**. 2014 nov; 6(123):1-9.
37. SINGI, G. *Fisiologia para odontologia: um guia prático para o cirurgião-dentista atender seus pacientes com segurança*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005; p. 106-108.
38. SLOTS, J; RAMS, TE; LISTGARTEN, MA. *Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis*. **Oral Microbiol Immunol**. 1988;3: 47-52.
39. SOUSA, MG; COSTA, A DE L, RONCALLI, AG. *Clinical study of the oral manifestations and related factor in type 2 diabetics patients*. **Braz J Otorhinolaryngol**. 2011; 77: 145-52
40. SOYSA, N; SAMARANAYAKE, L; ELLEPOLA A. *Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidiasis*. **Diabet Med**. 2006; 23: 455-9.

41. SUAREZ, BL; ALVAREZ, MI; DE BERNAL, Matilde and COLLAZOS, Andrés. *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. *Colomb. Med.* [online]. 2014, vol.44, n.1, pp.26-30. ISSN 1657-9534.
42. TEKELI A, DOLAPCI I, EMRAL R, CESUR S. *Candida carriage and Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. **Mycoses**. 2004; 47: 315-8.
43. URZÚA, B; HERMOSILLA, G; GAMONAL, J; MORALES-BOZO, I; CANALS, M; BARAHONA, S. et al. *Yeast diversity in the oral microbiota of subjects bwith periodontitis. Candida albicans and Candida dubliniensis colonize the periodontal pockets.* **Med Mycol**. 2008;46:783-93.
44. VARELLIS, MLZ. O paciente com necessidades especiais na odontologia: manual prático. São Paulo: Editora Santos; 2005. 13, 239-52.
45. WEHBA, C; RODRIGUES, AS; SOARES, FP. Diabetes e doença periodontal: uma relação bidirecional. In: Brunette CM. **Periodontia Médica: Uma abordagem integrada.** São Paulo: Senac, 2004. pp. 172-95.
46. WILSON, RM; REEVES, WG. *Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes.* **Clin Exp Immunol** 1986; 63:478-84.

ALMEIDA, OP; SCULLY, P. *Fungal infections of the mouth.* **Braz J Oral Sci**, v. 1, p. 19-26, 2002.

ALVES, C; ANDION, J; BRANDAO, M; MENEZES, R. Mecanismos patogênicos da doença periodontal associada ao diabetes melito. *Arq Bras Endocrinol Metab* [online]. 2007, vol.51, n.7, pp. 1050-1057. ISSN 0004-2730.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *Types of Gum Disease.* Disponível em: <http://www.perio.org/consumer/2a.html> Acesso em: 27 fevereiro de 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. *Position statement*. **Diabetes Care**. Alexandria, v. 33, suppl. 1, p. 62-69, Jan. 2010.Suppl. 1

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis e classification of *Diabetes Mellitus*. **Diabetes care**. 2013; 36(1): S67-74.

ANGIOLELLA, L; STRINGARO, AR; DE BERNARDI,SF; POSTERARO, B; BONITO, M; TOCCACIELI, L. et al. *Increase of virulence and its phenotypic traits in drugresistant strains of Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3):927-36.

ARSLAN, S; KOÇ, AN; ŞEKERCI, AE; TANRIVERDI, F; SAV, H; AYDEMIR, G; DIRI, H. Genotypes and virulence factors of *Candida* species isolated from oralcavities of patients with type 2 diabetes mellitus.**Turk J Med Sci** (2016) 46(1):18-27.  
<http://dx.doi.org/10.3906/sag-1405-73>

BARBOSA, VS; GOMES, VP; PETILLO, CR; CANABARRO, A. Presença de *Candida sp.* em sítios doentes e saudáveis em pacientes com Periodontite Crônica. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** 2014,vol.68, n.2, pp. 160-164. ISSN 0004-5276.

BARRETO DE OLIVEIRA, MT. Leveduras isoladas da mucosa bucal de portadores sadios, pacientes com SIDA e neoplasias. Produção de exoenzimas e tipagem de amostras de *C. albicans*. S. Paulo, 1993.107f. ICB-USP. S. Paulo, 1993.

BARROS, LM et al. *Genetic diversity and exoenzyme activities of C. albicans and C. dubliniensis isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients*. **Arch Oral Biol** 2008; 53:1172-8.

BARROS, LM. Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases. / Letizia Monteiro de Barros. -- Piracicaba, SP. [s.n.], 2005.

BASCONES-MARTÍNEZ, A. et al. *Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms*. **Med Oral. Patol Oral. Cir Bucal**. Madri, v. 14, n. 12, p. 680-5, Dec. 2009.

BASCONES-MARTINEZ, A. et al. *Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature*. **Med Oral. Patol Oral. Cir Bucal**. Madrid, v. 16, n. 6, p. 722-9, Jan. 2011.

BELAZI, M; VELEGRAKI, A; FLEVA, A; GIDARAKOU, I; PAPANAU, L; BAKA, D. et al. *Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors*. **Mycoses**; 48:192-6, 2005

BORGNAKKE, WS; YLCOSTALO, PV; TAYLOR, GW; GENCO, RJ. *Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence*. **Journal of Periodontology** April 2013, Vol. 84, No. 4-s, pages S135-S152 <http://doi:10.1902/jop.2013.1340013>

BRANDÃO, DFLMO; SILVA, APG; PENTEADO, LAM. Relação Bidirecional entre Doença Periodontal e Diabetes mellitus. **Odontol. Clín-Cient**. Recife, v. 10, n. 2, p. 117120, jun. 2011.

BRASIL- Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002 – 2003: resultados principais/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção a saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.

BREMENKAMP, RM et al. *Prevalence and antifungal resistance profile of Candida spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus*. **Arch Oral Biol**. 2011;56:549-55.PMid:21183157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.11.018>

BRONDANI, MA; BRONDANI, AR; BÓS, AJG. Diabete e periodontite: a hora e a vez da medicina periodontal, **J Bras Med**, v. 82, n. 1 e 2, p. 32-4, jan/fev. 2002.

BROWNLEE, M. *Glycation and diabetic complications*. **Diabetes**, 43: 836-841, 1994.

BROWNLEE, M; CERAMI, A; VLASSARA, H. *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. **N Engl J Med** 1988;318:1315 21.

CALDERONI, RA; FONZI, WA. *Virulence factors of Candida albicans*. **Trends in Microbiology** 2001; 9(7):327-35.

CANDIDO, RC. *C. albicans: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos*. SãoPaulo, 1991, 167f. EPM. S. Paulo, 1991.

CARLSTEDT, K; KREKMANOVA, L; DAHLLOF, G; ERICSSON, B; BRAATHEN, G; MODEER, T. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. **Int J Pediatr Dent** 1996; 6(2):95-100.

CARRANZA: Periodontia Clínica. 10.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007

CASARIN, RC. et al. *Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis*. **J Periodontal Res.** 2013 Feb;48(1):30-6. <http://doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01498.x> Epub 2012 Jul 4.

CELESTE, RK; FRITZELL, J; NADANOVSKY, P. *The relationship between levels of income inequality and dental caries and periodontal diseases*. **Cad Saúde Publica.** 2011;27(6):1111-20. <http://doi:10.1590/S0102-311X2011000600008> ISSN 2178-0595

CHADEGANIPOUR, M; SHADZI, S; DEGHAN, P; BIJARY, J. The incidence of opportunistic fungi in patients suspected of tuberculosis. **Mycoses** 43: 269-272, 2000.

CHALUB, LLF; PÉRET, ACA. *Performance of the community periodontal index (CPI) on periodontal status determination: focus on partial recording*. **Arqu bras odontol** 2010;6(3):155-62

COLOMBO, AL; GUIMARAES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 36: 599-607, 2003.

CONSOLARO, MEL. et al. *Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 501-7, 2005.

CORREA, FOB. et al. *Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes*. **J. Clin Periodontol. Malden**, v. 37, n. 1, p. 53-58, Jan. 2010.

COSTA, CR. Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos: caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. Tese de Doutorado, Goiânia, 2009.

9. COSTA, KRC; FERREIRA, JC; KOMESU, MC; CANDIDO, RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia** 167: 73-79, 2009.

DAHLÉN, G; WIKSTRÖM, M. *Occurrence of enteric rods, staphylococci and Candida in subgingival samples.* **Oral Microbiol Immunol.** 1995 Feb;10(1):42-6.

DAMBROSO, D. et al. *Radiotherapy effect on frequency of Candida spp. and on virulence of C. albicans isolated from the oral cavity of head and neck cancer patients.* **Rev Ciênc Farm Básica e Apl,** 2009; v. 30, p. 25-32.

DARBY, I; CURTIS, M. *Microbiology of periodontal disease in children and young adults.* **Periodontol 2000.** 2001;26(1):33-53

DARWAZEH, AMG; LAMEY, PJ; SAMARANAYAKE, LP; MAC-FARLANE, TW; FISHER, BM; MACRURY, SM. et al. *The relationship between colonisation, secretor status and in vitro adhesion of Candida albicans to buccal epithelial cells from diabetics.* **J Med Microbiol** 1990;33:43-9.

D'AUTIO, F; SABBAH, W; NETUVELI, G; DONOS, N; HINGONARI, AD; DEANFIELD, J; TSAKOS, G. *Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey.* **J Clin Endocrinol Metab** 2008; 93(10):3989-94. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2007-2522>

DAVIES, AN; BRAILSFORD, S; BROADLEY, K; BEIGHTON, D. *Oral yeast carriage in patients with advanced cancer.* **Oral Microbiol Immunol** 2002; 17(2):79-84.

DAVIES, M; STORMS, F; SHUTLER, S; BIANCHI-BISCAY, M; GOMIS, R; ATLANTUS STUDY GROUP. *Improvement of glycemic control in subjects with poorly controlled type 2 diabetes: comparison of two treatment algorithms using insulin glargine.* **Diabetes Care.** 2005 Jun;28(6):1282-8.

DE BERNARDIS, F; SULLIVAN, PA; CASSONI, A. *Aspartyl proteinases of Candida albicans and their role in pathogenicity.* **Med Mycol** 39: 303-313, 2001.

D'EÇA JUNIOR, A. et al. *In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of Candida.* **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online]. 2011, vol.44, n.3, pp.334-338. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037->

DIGNANI, MC; SOLOMKIN, JS; ANAISSIE, E. *Candida.* In: ANAISSIE, E; MCGINNIS, MR; PFALLER, MA. (Ed.). **Med mycology.** 1. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. p. 195-239.

DINIZ, MG. Identificação e fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de transplantados renais do Hospital Universitário Onofre Lopes em Natal, Rio Grande do Norte. Tese de mestrado, Natal, 2011.

DOROCCA-BOBKOWSKA, B; BUDTZ-JORGENSEN, E; WLOCH, S. *Noninsulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis*. **J Oral Pathol Med** 1996;25:411-5.

DOUGLAS, CR. Patofisiologia oral: fisiologia normal e patológica aplicada à Odontologia e Fonoaudiologia. São Paulo: Pancast; 1988. 288 p.

DOUGLAS, JL. *Candida biofilms and their role in infection*. **Trends in Microbiol**, v. 11, p. 30-6, 2004.

DUARTE, MT. Diabetes aumenta risco de doença periodontal. **Rev. Abo Nac.** 2000 ago/set 8 (4).

DUNNE, WM. *Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?* **Clin Microbiol**, v. 15, p. 155-66, 2003.

EICK, S; PIETKIEWICZ, M; SCULEAN, A. *Oral microbiota in Swiss adolescents*. **Clin Oral Invest.** 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-012-0696-2>

ENGBRETSON, SP; HEY-HADAVI, J; EHRHARDT, FJ. et al. *Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 $\beta$  and glycem control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes*. **J Periodontol** 2004 Sept; 75(9): 1203-8.

FAVERO, D. Fator hemolítico em *Candida tropicalis*. Londrina, 2008. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

FIELD, CA; GIDLEY, MD; PRESHAW, PM; JAKUBOVICS, N. *Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes*. **J. Periodontal Res.** 2012 Aug;47(4):470-8. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01455.x.Epub2012Jan3

FIGUEIREDO, MC; PARRA, SLN. Aspectos normais da membrana periodontal e osso alveolar. 2002. Disponível em: URL: <http://www.odontologia.com.br/>

FOTEDAR, R; AL-HEDAITHY, SSA. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. **Mycoses**, 48: 62–67 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01057.x>

FURLANETO-MAIA, L. et al. *In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of Candida spp. obtained from elderly healthy individuals.* **Mycopathologia**, v. 166, p. 209-17, 2008.

GARCÍA-MARTOS, P; GARCÍA-AGUDO, R; HERNÁNDEZ-MOLINA, JM; MARÍN, P; TARELLO, E; MIRA, J. *Identificación de leveduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida.* **Rev Iberoam Micol** 15 : 131-135, 1998.

GARCÍA, SM. et al. *"Secular Trends of Candidemia in a Large Tertiary-Care Hospital From 1988 to 2000: Emergence of Candida Parapsilosis."* **Infection Control and Hospital Epidemiology** 26.6 (2005): 548-52.

GHANNOUM, MA; ABU-ELTEEN, KH. *Pathogenicity determinants of Candida.* **Mycoses**, 33: 265-282, 1990.

GIOLO, MP; SVIDZINSKI, TI. *Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.* **J. Bras. Patol. Med. Lab.** [online]. 2010, vol.46, n.3, pp. 225-234. ISSN 1676-2444.

GOMES-FILHO, IS. et al. *Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal.* **Rev. Odonto. Ciênc.** Porto Alegre, v. 21, n. 51, p. 77-81, Mar. 2006.

GOMES-FILHO, IS. et al. *Exposure measurement in the association between periodontal disease and prematurity/low birth weight.* **J. Clin. Periodontol.** Malden, v. 34, n. 11, p. 957- 963, Oct. 2007.

LIMA NETO, RG; NEVES, RP. *Capacidade de aderência às células epiteliais da cavidade oral e perfil histoquímico de culturas de Candida estocadas na Micoteca URM.* Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

GREGHI, SLA; BRITO, MCT; OLIVEIRA, MR; GUIMARÃES, MCM. *Relação entre diabetes mellitus e doença periodontal.* **Rev. APCD** 2002;56(4):265-9.

GROSS, JL. et al. *Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico.* **Arq Bras Endocrinol Metab.** [online]. 2002, vol.46, n.1, pp. 16-26. ISSN 0004-2730.

GUIMARÃES, GK; MEIRELES, SS; MARQUES, MS; COSTA, LJ. Condições periodontais em portadores de diabetes melittus tipo 2 atendidos na Universidade Federal da Paraíba. **Odonto Ciência** 2007;22(56):124-30.

HÄGEWALD, S; BERNIMOULIN, JP; KÖTTGEN, E; KAGE, A. *Salivary IgA subclasses and bacteria-reactive IgA in patients with aggressive periodontitis.* **J. Periodontol Res.** 2002; (37):333-9.

HAKKI, M; STAAB, JF; MARR, KA. “*Emergence of a Candida Krusei Isolate with Reduced Susceptibility to Caspofungin during Therapy.*” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 50.7 (2006): 2522–2524. <http://doi.org/10.1128/AAC.00148-06>

HAMZA, OJM; MATEE, MIN; MOSHI, MJ; SIMON, ENM; MUGUSI, F; MIKX, FHM; HELDERMAN, WHP; RIJS, AJMM; VEM, AJAM; VERWEIJ, PE. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility of oral yeast isolates from Tanzanian HIV-infected patients with primary and recurrent oropharyngeal candidiasis. **BMC Microbiology** 8: 135-144, 2008.

HANNULA, J; SAARELA, M; DOGAN, B; PAATSAMA, J; KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P; PIRINEN, S. et al. *Comparison of virulence factors of oral Candida dubliniensis and Candida albicans isolates in healthy people and patients with chronic candidosis.* **Oral Microbiol Immunol** 2000; 15(4):238-44.

HANNULA, J; DOGAN, B; SLOTS, J; OKTE, E; ASIKAINEN, S. *Subgingival strains of Candida albicans in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria.* **Oral Microbiol Immunol.** 2001 Apr;16(2):113-8.

HAYNES, K. *Virulence in Candida species.* **Trends in Microbiol** 2001; 9(12):591- 6.

HERRING, ME; SHAH, SK. *Periodontal disease and control of diabetes mellitus.* **J Am Osteopath Assoc.** 2006;106:416-21.

HOLMES, AR; NIIMI, M; GIRGIS, JM; BOYD, DH; CANNON, RD. Antifungal drug susceptibilities of commensal *Candida* isolates. **N Z Dent J.** 2002 Jun;98(432):36-9.

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

IBGE- Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, IBGE, 2014, 180p.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Diabetes Atlas. 5th edition. Brussels: *International Diabetes Federation*; 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas [Internet]. 6a ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2014. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas> Acesso em: 19/09/2016.

JABRA-RIZK, MA; FERREIRA, SM; SABET, M; FALKLER, WA; MERZ, WG; MEILLER, TF. *Recovery of Candida dubliniensis and other yeasts from human immunodeficiency virus associated periodontal lesions*. **J. Clin. Microbiol.** 2001;39(12):4520-2.

JANKET, SJ. et al. *Does periodontal treatment improve glycemic control in diabetic patients? A meta-analysis of intervention studies*. **J. Dent. Res.** Alexandria, v. 84, n. 12, p. 1154-1159, Dec. 2005.

JÄRVENSIVU, A; HIETANEN, J; RAUTEMAA, R; SORSA, T; RICHARDSON, M. *Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo*. **Oral Dis.** 2004;10(2):106-12

JAVED, F; KLINGSPOR, L; SUNDIN, U; ALTAMASH, M; KLINGE, B; ENGSTROM, PE. *Periodontal conditions, oral Candidaalbicans and salivary proteins in type2 diabetic subjects with emphasis on gender*. **BMC Oral Health.** 2009 May12;9:12.

JONES, DS; MCGOVERN, JG; ADAIR, CG; WOOLFSON, AD; GORMAN, SP. *Conditioning film and environmental effects on the adherence of Candida spp. to silicone and poly (vinylchloride) biomaterials*. **J Mater Sci Mater Med.** 2001 May;12(5):399-405.

KAMMA, JJ; NAKOU, M; BAEHNI, PC. *Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis*. **J Periodontal Res.** 1999; 34(1):25-33.

KANTARCIOGLU, AS; YUCEL, A. *Phospholipase and protease activity in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains*. **Mycoses** 5: 160-165, 2002.

KAPP, JM; BOREN, SA; YUN, S; LEMASTER, J. *Diabetes and tooth in a national sample of dentate adults reporting annual dental visits*. **Center for disease Control and Prevention** 2007;4(3):1-8.

KATZ, J; CHAUSHU, G; SGAN-COHEN, HD. *Relationship of blood glucose level to community periodontal index of treatment needs and body mass index in a permanent israeli military population*, **J Periodontol.** 2000; 71: 1521-1527.

KAWAMURA, JY. Avaliação clínica, radiográfica e imunohistoquímica da doença periodontal em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002.

KAWECKI, D. et al. *Enzymatic variability of Candida krusei isolates in a course of fungal infection in a liver transplant recipient*. *Transplant Proc.* 39(1), 250-2, jan./fev., United States, 2006

KARKOWSKA-KULETA, J; RAPALA-KOZIK, M; KOZIK, A. *Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Pol.** 2009;56(2):211-24. Epub 2009 Jun 18.

KHAN, MSA. et al. *Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to Candida albicans. Combating Fungal Infections*. In: AHMAD, I., et al. **Combating Fungal Infection: problems and remedy**. Berlin: Springer, 2010. p.21 - 45.

KHAW, K; WAREHAM, N; LUBEN, R; BINGHAM, S; OAKES, S; WELCH, A; NICHOLAS DAY, N. *Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk)* **BMJ** 2001;322:1-6

KHOSRAVI, AR; YARAHMADI, S; BAIAT, M; SHOKRI, H; POURKABIREH, M. *Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus*. **J Mycol Med.** 2008; 18:83-8.

KIMURA, HL; PEARSALL, NN. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Infect Immun.** 1978; 21:64-68.

KLOTZ, SA; SMITH, RL. *A fibronectin receptor on C. albicans mediates adherence of the fungus to extracellular matrix*. **J. Infect. Dis.**, 163: 604-610, 1991.

KOMIYAMA, EY; SANTOS, SSF; JORGE, AOC; MARTINS, CAP; KOGA-ITO, CY. Produção de exoenzimas por amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com periodontite crônica e indivíduos-controle. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo** 2007 set-dez; 19(3):288-92.

KREGEN-VAN, RIJ. *The yeast: a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1984.1082p.

KUMAMOTO, CA; VINCES, MD. *Contributions of hyphae and hyphae-co-regulated genes to Candida albicans virulence*. **Cell Microbiol.**, v. 7, p. 1546-54, 2005.

KUMAR, G; KUMAR, SJ; MENON, T. *Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of Candida from immunocompromised patients*. **Mycopathologia**, v. 161, p. 213-8, 2006.

KUMAR, PS; GRIFFEN, AL; MOESCHBERGER, ML; LEYS, EJ. *Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis*. **J Clin Microbiol**. 2006 Aug;43(8):3944-55.

LACAZ, CS; PORTO, E; MARTINS, JEC. *Micologia Médica – Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: Sarvier, 1991. 695p.

LACAZ, CS. et al. *Tratado de micologia médica*: LACAZ. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 34, 125.

LIMA, AFM. et al. *Therapy with adjunctive doxycycline local delivery in patients with type 1 diabetes mellitus and periodontitis*. **J. Clin. Periodontol**. Chicago, v. 31, n. 5, p. 648- 653. May 2004.

LINDHE, J; KARRING, T; LANG, NP. *Tratado de periodontia clinica e implantologia oral*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

LIU, D; COLOE, S; JONES, SL; BAIRD, R; PEDERSEN, J. *Genetic speciation of Candida isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction*. **J Fems Microbiol Lettbb** 1996; 145(1):23- 6.

LORENZO, JL. *Microbiologia para o estudante de Odontologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

LUO, G; SAMARANAYAKE, LP; YAU, JYY. *Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities.* **J Clin Microbiol**, v. 1, p. 2971-4, 2001.

LUO, G. et al. *Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HPL gene expression in Candida glabrata and its possible role in in vitro haemolysin production.* **APMIS**, v.112, p. 283-90, 2004.

LYON, JP; RESENDE, MA. *Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in Candida albicans obtained from denture wearers.* **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.** V.102, n.5, p.632-638, 2006.

LYON, JP; DE RESENDE, MA. *Evaluation of adhesion to buccal epithelial cells in Candida species obtained from denture wearers after exposure to fluconazole.* **Mycoses.** 2007 Jan; 50 (1):21-4. PMID: 17302743.

MACCARINELLI, G; BELOTTI, R; SAVOLDI, E; GERVASONI, M; COCCHI, D. *Phagocytosis and killing of C. albicans of polymorphonuclear cells in patients with organ transplant or periodontal disease.* **Minerva Stomatol** 2001; 50(11/12): 345-9.

MACEDO, DPC; FARIAS, AMA; NETO, RGL; SILVA, VKA; ANDRÉ FERRAZ GOIANA LEAL, AGG; NEVES, RP. *Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(2):188-191, mar-abr, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000200019>.

MACHADO, AG; KOMIYAMA, EY; SANTOS, SS; JORGE, AO; BRIGHENTI, FL; KOGA-ITO, CY. *In vitro adherence of Candida albicans isolated from patients with chronic periodontitis.* **J Appl OralSci.** 2011 Aug;19(4):384-387

MADEIRO, AT; BANDEIRA, FB; FIGUEIREDO, CRLV. *A estreita relação entre diabetes e doença periodontal inflamatória.* **Odontologia Clín.-Científ., Recife**, 4 (1): 07-12, jan/abr., 2005.

MANFREDI, M; AL-KARAAWI, Z; MCCULLOUGH, MJ; HUREL, S; PORTER, SR. *The isolation, identification and molecular analysis of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus.* **Oral Microbiol Immunol:** 17: p.181–185. @ Blackwell Munksgaard, 2002.

MANGAN, D; SELWITZ, RH; GENCO, R. *Infections associated with diabetes mellitus*. **N Engl J Med**, v.342, p.896, 2000.

MANNES JM; MOSSER DM; BUCKLEY HR. *Production of a hemolytic factor by Candida albicans*. **Infect and Immun**, v. 62, p. 5154-6, 1994.

MANSOUR AA, ABD-AL-SADA N. *Periodontal disease among diabetics in Iraq*. **Med Gen Med**. 2005;7(3):2. ClipeOdonto -UNITAU 2013;5(1):65-- 71. Disponível em [periodicos.unitau.br](http://periodicos.unitau.br)

MARASCHIN JF; MURUSSI N; WITTER V; SILVEIRO SP. Classificação do diabetes melito. *Arq. Bras. Cardiol.* [online]. 2010, vol.95, n.2, pp. 40-46. ISSN 0066-782X.

MARDEGAN RC; FOGGIO MA; GONÇALVES RB; HÖFLING JF. *Candida albicans proteinases*. **Braz J Oral Sci**. 5(16), 944-952, jan-mar, 2006.

MARIANO, FS. et al. *The role of immune system in the development of periodontal disease: a brief review*. **R. Odonto. Ciênc.**, Porto Alegre, v. 25, n. 3, p. 300-305, Aug. 2010.

MARIN PN, RODRIGUEZ LJ, GUILLÉN PJA, CASTILLO VJF, SIERRA HFG. *Efecto del control metabólico en pacientes diabéticos tipo 1 y su asociación con enfermedad periodontal*. **Rev Invest Clin**. 2002;54(3):218-25.

MARTINS CAP, SANTOS SSF, LOBERTO JCS, KOGA-ITO CY, JORGE AOC. *Presença Candida spp. em pacientes com periodontite crônica*. **Cienc Odontol Brás**. 2002;5(1):75-83

MASUOKA J, WU G, GLEE PM, HAZEN KC. *Inhibition of Candida albicans attachment to extracellular matrix by antibodies which recognize hydrophobic cell wall proteins*. **FEMS Immunol Med Microbiol**. 1999; 24:421-9.

MATTEI AS, ALVES SH, SEVERO CB, GUAZZELLI LS, FLÁVIO DE MATTOS OLIVEIRA FM, SEVERO LC. *Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of Candida albicans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(3):340-342, May-Jun, 2013 <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0045-2013>

MATHERS CD, LONCAR D. *Projeções da mortalidade mundial e carga da doença de 2002 a 2030*. **PLoS Med** 2006, 3 (11): E442.

MATIELLO, AN. Doença Periodontal. 1998. Disponível em: URL: <http://www.saudevidaonline.com.br/odontonline/gengi1.htm>

MATIELLO-ROSA, GONÇALVES SM; CINTRA, PFA.; LIMA, GEG.; PINTO, K NZ; COHEN, M; PIMENTEL, ER. *Glycosaminoglycan loss from cartilage after Anterior Cruciate Ligament rupture: influence of time since rupture and chondral injury*, 03/2008, **Revista Brasileira de Fisioterapia**, Vol. 12, Fac. OnLine, pp.64-69, São Carlos, SP, Brasil, 2008.

MATTHEWS RC. *Pathogenicity determinants of C. albicans: potencial targets for immunotherapy?* **Microbiology**, v.140, p. 1505-1511, 1994.

MATTSON JS, CERUTIS DR. *Diabetes mellitus: a review of the literature and dental implications*. *Compend Contin Educ Dent*. 2001 Sep;22(9):757-60, 762, 764 passim; quiz 773

MEALEY, B. L. *Diabetes and periodontal disease: two sides of a coin*. *Compend. Contin. Educ. Dent., Texas*, v.21, n. 11, p. 943-946, Nov. 2000.

MEALEY, BL.; OATES, TW. *American Academy of Periodontology. Diabetes mellitus and periodontal diseases*. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 77, n. 8, p. 1289-303, Aug. 2006.

MENEZES, EA et al. *Frequência e atividade enzimática de Candida spp. na cavidade oral de pacientes diabéticos do serviço de endocrinologia de um hospital de Fortaleza-CE*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** [online]. 2007, vol.43, n.4, pp. 241-244. ISSN 1676-2444

MENEZES RP. *Avaliação da frequência, atividade enzimática e sensibilidade a antifúngicos de leveduras do gênero Candida isoladas da cavidade bucal de pacientes portadores do HIV*. Universidade Federal De Uberlândia, 2014.

MERKEL GJ, SCOFIELD BA.(1997). *The in vitro interaction of Cryptococcus neoformans with human lung epithelial cells*. **FEMS Immunol.Med.Microbiol.** 19, 203–213.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. <http://hiperdia.datasus.gov.br/hiperelhiperrisco.asp>

MIRZA BA, SYED A, IZHAR F, ALI KHAN A. *Bidirectional relationship between diabetes and periodontal disease: review of evidence*. **J Pak Med Assoc.** 2010; 60:766-8. PMID:21381588.

NAGLIK J, ALBRECHT A, BADER O. & HUBE B. (2004). *Candida albicans* proteinases and host/ pathogen interactions. **Cell Microbiol.** 6, 915–926.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67(3), 400–428, 2003. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>

NASSAR, H.; KANTARCI, A.; VAN DYKE, T. E. *Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation.* **Periodontol.** 2000., Malden, v. 43, n. 1, p. 233-244, Feb. 2007.

NEGRI, M. et al. *Examination of potential virulence factors of Candida tropicalis clinical isolates from hospitalized patients.* **Mycopathologia**, v. 169, p. 175-82, 2010.

NELSON RG. *Periodontal disease and diabetes.* **Oral Dis.** 2008; 14:204-5. PMID:18336371 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01443.x>

NETEA, M. G.; BROWN, G. D.; KULLBERG, B. J.; GOW, N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 1, p. 67–78, 2008.

NIEWERTH M, KORTING HC. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses**, 2001 Nov; 44(9-10): 361-7.

NIKAWA H, HAMADA T, YAMAMOTO T. *Denture plaque-past and recent concerns.* **J Dent.** 1998; 26(4):299-304.

NIKAWA H, EGUSA H, MAKIHIRA S, OKAMOTO T, KURIHARA H, SHIBA H, et al. *An in vitro evaluation of the adhesion of Candida species to oral and lung tissue cells.* **Mycoses** 2006; 49:14-7.

NOBILE JC. et al. *Complementary adhesin function in C. albicans biofilm formation.* **Curr Biol**, v. 18, p. 1017-24, 2008.

NOEL, THIERRY et al. “*Flucytosine-Fluconazole Cross-Resistance in Purine-Cytosine Permease-Deficient Candida Lusitaniae Clinical Isolates: Indirect Evidence of a*

*Fluconazole Uptake Transporter.*” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47.4 (2003): 1275–1284. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1275-1284.2003>

O’CONNELL, P. A. A. et al. *Effects of Periodontal Therapy on Glycemic Control and Inflammatory Markers.* **J. Periodontol.** Chicago, v. 79, n. 5, p. 774-783, May 2008.

ODDS, FC, ABBOT, AB. *A simple system for the presumptive identification of Candida albicans and differentiation of strains within the species.* *Sabouraudia*, v.18, p.301-17, 1980.

ODDS FC. *Pathogenesis of Candida infection.* **J American Academic Dermatol**, v. 31, p. 2-5, 1994.

OKSUZ S, SAHIN I, YILDIRIM M ET AL. *Phospholipase and proteinase activities in different Candida species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults.* **Jpn J Infect Dis.** 60: 280-283, 2007.

OLIVEIRA EE, SILVA SC, SOARES AJ, ATTUX C, CRUVINEL B, SILVA MRR *Toxinas killer e produção de enzimas por Candida albicans isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer.* *Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31(6):523527, nov-dez, 1998.

OLIVEIRA, LF, SANTOS JAOC, FERREIRA SS. *In vitro minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients.* **Braz. oral res.** [online]. 2006, vol.20, n.3, pp. 202-206. ISSN 1807-3107

OMBRELLA AM; RACCA L; RAMOS L. *Actividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de Candida albicans provenientes de secreciones vaginales com distintos valores de pH.* **Rev Iberoam Micol**, v. 25, p. 12-6, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Relatório Mundial sobre doenças não transmissíveis 2014.* Genebra, OMS, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Saúde Global Estimativas: Mortes por causas, idade, sexo e país, 2000-2012.* Genebra, OMS, de 2014.

ORBAK R, et al. *The influence of smoking and non-insulin-dependent diabetes mellitus on periodontal disease.* **J Int Med Res.** 2002 Mar-Apr; 30(2): 116-25.

OPPERMANN RV. *An overview of the epidemiology of periodontal diseases in Latin America.* **Braz Oral Res.** 2007; 21 (Spec Issue 1):8-15.

19. HANNULA J, SAARELA M, DOGAN B, PAATSAMA J, KOUKILA-KÄHKÖLÄ P, PIRINEN S, et al. *Comparison of virulence factors of oral Candida dubliniensis and Candida albicans isolates in healthy people and patients with chronic candidosis.* **Oral Microbiol Immunol.** 2000;15:238-44.

20. BARROS LM, BORIOLLO MF, ALVES AC, KLEIN MI, GONÇALVES RB, HÖFLING JF. *Genetic diversity and exoenzyme activities of Candida albicans and Candida dubliniensis isolated from the oral cavity of Brazilian periodontal patients.* **Arch Oral Biol.** 2008;53:1172-8.

21. TSANG CS, CHU FC, LEUNG WK, JIN LJ, SAMARANAYAKE LP, SIU SC. *Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of Candida albicans isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus.* **J Med Microbiol.** 2007;56:1393-8.

22. ABACI O. *Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of Candida species isolated from individual denture wearers and genotypic distribution of Candida albicans strains.* **Curr Microbiol.** 2011;62:1308-14.

23. MANE A, PAWALE C, GAIKWAD S, BEMBALKAR S, RISBUD A. *Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of Candida isolates from HIV-infected individuals.* **Med Mycol.** 2011;49:548-51.n4jhhfg

PÁDUA RAF. et al. *Adherence of Pseudomonas aeruginosa and Candida albicans to urinary catheters.* **Rev Iber Micol,** v. 25, p. 173-5, 2008.

PALLAVAN B., VENKATAPATHY R, BALAMURALI PD, NIRIMA O. *Comparison and correlation of candida colonization in diabetic patients and normal individuals.*

**Journal of Diabetes & Metabolic Disorders** 2014, 13:66

<http://www.jdmdonline.com/content/13/1/66>

PAPPAS PG. et al. *The NIAID Mycoses Study Group: a prospective observational study of candidemia, epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients.* **Clin Infect Dis**, v. 37, p. 634-43. 2003.

PARK H, MYERS CL, SHEPPARD DC, PHAN QT, SANCHEZ AA, EDWARDS J, ET AL. *Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis.* **Cell Microbiol.** 2005; 7(4):499-510.

PAUW BE, PICAZO JJ. *Presente situation in the treatment of invasive fungal infection.* **Int J Antimicrob agents**, Amsterdam, v.32, n.2, p.S167-S171 Nov 2008.

PERES MA, ANTUNES JL, BOING AF, PERES KG, BASTOS JL. *Skin colour is associated with periodontal disease in Brazilian adults: a population-based oral health survey.* **J Clin Periodontol.** 2007;34(3):196-201. <http://doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01043.x>

PEIXOTO ITA, SARDI JCO, ANÍBAL PC, GONÇALVES RB, HÖFLING JF. *Evidências científicas da colonização de Candida spp. em bolsas periodontais.* RFO, Passo Fundo, v. 15, n. 2, p. 177-182 maio/ago. 2010.

PENHA, SS; BIRMAN, EG, SILVEIRA, FRX; PAULA, CR de. *Frequency and enzymatic (proteinase and phospholipase) of Candida albicans from edentulous patients, with and without denture stomatitis.* **Pesq Odont Bras.** 14(2), 119-222, abr./jun., 2000

PESQUISA NACIONAL DE SAÚDE BUCAL DA POPULAÇÃO BRASILEIRA (SBBrazil), 2010. Disponível em: [http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto\\_sb2010\\_relatorio\\_final.pdf](http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/projeto_sb2010_relatorio_final.pdf)

PETERSON DE; MINAH GE; OVERHOLSER CD; SUZUKI JB; DEPAOLA LG; STANSBURY, DM. et al. *Microbiology of acute periodontal infection in myelosuppressed cancer patients.* **J Clin Oncol.** 1987;5:1461-8.

PFALLER, MA. and DIEKEMA DJ. "Role of Sentinel Surveillance of Candidemia: Trends in Species Distribution and Antifungal Susceptibility." **Journal of Clinical Microbiology** 40.10 (2002): 3551–3557. <http://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3551-3557.2002>

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. *Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem*. **Clin Microbiol Rev.** 20: 133-163, 2007.

PFALLER, MA. et al. “*Candida Krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005 .” **Journal of Clinical Microbiology** 46.2 (2008): 515–521. <http://doi.org/10.1128/JCM.01915-07>

PINTO, E; RIBEIRO, IC; FERREIRA, NJ. et al. *Correlation between enzyme production, germe tube formation na susceptibility to fluconazole in Candida species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals*. **J Oral Pathol Med.** 37, 587-592, 2008.

PIRES MFC; CORREA B; GAMBALE W; PAULA CR. Experimental model of *Candida albicans* (serotypes A and B) adherence in vitro. **Brazilian Journal of Microbiology.** 32: 163-169, 2001.

PIZZO G, BARCHIESI F, FALCONI DI FRANCESCO L, GIULIANA G, ARZENI D, MILICI ME, et al. *Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival Candida albicans isolates*. Arch Oral Biol. 2002; 47:189-96.

PRESHAW, PM.; FOSTER, N; TAYLOR, JJ. *Crosssusceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective*. Periodontol. 2000. Malden, v. 45, n. 1: p. 138-157, Oct. 2007.

PRICE MF; WILKINSON ID, GENTRY LO. *Plate methods for detection of phospholipase activity in Candida albicans Sabouraudia* 20:7-14, 1982.

QI QG, HU T, ZHOU XD. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. **J Oral Med.** 34: 352-356, 2005.

RAMAGE G. et al. *Characteristics of biofilm formation by Candida albicans*. Rev **Iberoam Micol**, v. 18, p. 163-70, 2001.

RAMAGE G; SAVILLE SP; THOMAS DP; LÓPEZ-RIBOT JL. *Candida biofilms: an update*. **Eukaryot Cell.** 2005;4:633-8.

RAMAGE G; TOMSETT K; WICKES BL; LÓPEZ-RIBOT JL; REDDING SW. *Denture stomatitis: a role for Candida biofilms*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2004; 98:53-9.

RONCALLI, AG *et al*. Aspectos metodológicos do Projeto SBBrazil 2010 de interesse para inquéritos nacionais de saúde. *Cad. Saúde Pública* [online]. 2012, vol.28, suppl., pp. s40-s57. ISSN 0102-311X.

RORIG, KCO; COLACITE, J; ABEGG, MA. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online]. 2009, vol.42, n.2, pp. 225-227. ISSN 0037-8682.

RUCHEL J, TEGELER R, TROST MA. *Comparison of secretory proteinases from different strains of Candida albicans*. *Sabouraudia* 20:233-244, 1982.

QUIRINO MRS. Estudo clínico e microbiota fúngica da cavidade bucal de diabéticos controlados e não controlados. 54f. Mest. Fac. de Odontologia, Univ. de Taubaté-SP, 1990.

RIBEIRO EL *et al*. Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. **Acta Méd. Portuguesa** 15(3): 171-174, 2002.

RIBEIRO MA. Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas. 156f. Mestrado. ICB-USP. S. Paulo, 2002.

- RIBEIRO, F. V. *et al*. *Cytokines and Bone-Related Factors in Systemically-Healthy and Type 2 Diabetic Subjects With Chronic Periodontitis*. **J. Periodontol.**, Chicago v. 82, n.

2, p. 1- 12, Feb. 2011.

RICHARDSON MD, WARNOCK DW. *Fungal infection diagnosis and management*. Oxford: **Blackwell Scientific**; 1993

RINALDI, M.G. *Biology and pathogenicity of Candida species*. In: *BODEY, G.P. Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. New York: Raven Press, 1993. Cap. 3, p.1-20.

REYNAUD AH, NYGAARD-OSTBYB, BOYGARD GK, ERIBE ER, OLSEN I, GJERMO P. *Yeasts in periodontal pock-ets*. **J Clin Periodontol**. 2001 Sep;28(9):860-4.

ROSA EA; RACHED RN; IGNÁCIO AS; ROSA RT, JOSÉ DA SILVA W; YAU JY. et al. *Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of Candida albicans.* **J Med Microbiol.** 2008;57(Pt 10):1277-81

RYDER, MI. *Periodontal management of HIV-infected patients.* **Periodontology** 2000, v. 23, p. 85-93, 2000.

SABBAH W, SHEIHAM A, BERNABÉ E. *Income inequality and periodontal diseases in rich countries: an ecological cross-sectional study.* **Int Dent J.** 2010; 60(5):370-4.

SAMARANAYAKE LP, MAC FARLANE TW. *Factors affecting the in vitro adherence of fungal oral pathogen Candida albicans to epithelial cells of human origin.* **Arch Oral Biol.** 1982; 27:873-82.

SAMARANAYAKE LP, FIDEL PL, NAGLIK JR, SWETT SP, TEANPAISAN R, COOGAN MM, et al. *Fungal infections associated with HIV infection.* **Oral Dis.** 2002 Jul; 8(2):151-60.

SAMARANAYAKE YH, DASSANAYAKE RS, CHEUNG BP, JAYATILAKE JA, YEUNG KW, YAU JY, et al. *Differential phospholipase gene expression by C. albicans in artificial media and cultured human oral epithelium.* **APMIS** 2006; 114:857-66.

SANGUINETTI, MAURIZIO et al. "Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida Glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49.2 (2005): 668–679. <http://doi.org/10.1128/AAC.49.2.668-679.2005>

SANITÁ PV; VERGANI CE; GIAMPAOLO ET; PAVARINA AC; MACHADO AL. *Growth of Candida species on complete dentures: effect of microwave disinfection.* **Mycoses** 2009; 52(2):154-60. 2008 Jun 21.

SANTANA D. Manifestações orais em pacientes diabéticos metabolicamente descompensados. **RGO.** 2002 50(1):23-9.

SANTANA, TD; COSTA, FO; ZENÓBIO, EG. et al. Impacto da doença periodontal na qualidade de vida de indivíduos diabéticos dentados. **Cad Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p.637-44, 2007.

SANTOS SSF; JORGE AOC. Presença de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal humana. **Rev Odontol UNESP**, v. 27, n. 2, p. 473-84, 1998.

SANTOS VR et al. *Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type2 diabetic subjects*. **J. Clin. Periodontol.** Malden, v. 37, n. 12, p. 1049-1058, Dec. 2010.

SARDI JCO, CRUZ GA, SAITO D, HOFLING JF, DUQUE C, GONÇALVES RB. Identificação de espécies de *Candida* por PCR em bolsas periodontais de pacientes diabéticos com periodontite crônica. In: 1º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2008, Gramado - RS.

SARDI J; DUQUE C; MARIANO F; PEIXOTO I; HOFLINGER J; GONCALVES R. *Candida spp. in periodontal disease: a brief review*. **J Oral Sci.** 2010 Jun;52(2):177-185.

SAVILLE SP, LAZZELL AL, MONTEAGUDO C, LOPEZ-RIBOT JL. *Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of Candida albicans during infection*. **Eukaryot Cell.** 2003; 2(5):1053-60.

SENCIATTI MF; SILVA CDJ; SAPATA VM; SOUZA AB; MARSON FC; CORREA GO; CAMACHO DP; SILVA CO; SLOTS J; RAMS TE; LISTGARTEN. *Evaluation of fungus presence in oral cavity and periodontal pockets of healthy individual and periodontal disease subjects*. **Braz J Periodontol.** - June 2012 - volume 22 - issue 02.

SHOHAM S; LEVITZ SM. *The immune response to fungal infections*. **Br J Haematol**, 129, 2005, 569- 82.

SIDRIM JJ; ROCHA MFG. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 21, 266.

SIDRIM, JJC; ROCHA, MFG. *Candidíase*. In: *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro p. 390, 2006.

SILVA JO, FERREIRA JC, CANDIDO RC. *Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de Candida sp*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 354-355, 2007.

SILVA S, NEGRI M, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, WILLIAMS DW, AZEREDO J. *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. **FEMS Microbiology Reviews.** Mar 2012, 36 (2) 288-305. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>

SILVEIRA FRX et al. *Proteinase and phospholipase activity of C. albicans isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers)*. **Rev. Iber. Micol.** 10: 105-108, 1993.

SLOTS J, RAMS TE, LISTGARTEN M.A. *Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 1988

SOBEL JD, MYERS PG, KAYE D, LEVISON ME. *Adherence of Candida albicans to Human Vaginal and Buccal Epithelial Cells*. **J Infect Dis.** (1981) 143 (1): 76-82. doi:10.1093/infdis/143.1.76.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. O avanço do diabetes no mundo, segundo a OMS. 2012. Acesso em: 06/06/2016. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/2132-o-avanco-do-diabetes-no-mundo-segundo-a-oms>

SOLL DR. *Candida biofilms: is adhesion sexy?* Current Biology, v. 18, p. 153-5, 2008.

SOYSA, N.S.; SAMARANAYAKE, L.P.; ELLEPOLA A.N. Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis. **Diabet Med.** 2006;23:455-9.

SOUZA EMB et al. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *C.albicans*, sorotipos A e B, isoladas em S. Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.:** 21:247-253, 1990.

SOYSA NS, SAMARANAYAKE LP, ELLEPOLA AN. *Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidosis*. **Diabet Med.** 2006;23:455-9.

STARR JR, WHITE TC, LEROUX BG, LUIS HS, BERNARDO M, LEITAO J, ROBERTS MC. *Persistence of oral Candida albicans carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years*. **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17(5):304-310.

SULLIVAN D, HAYNES K, BILLE J, PATRICK BOERLIN P, RODERO L, LLOYD S, MARTIN HENMAN M, DAVID COLEMAN D. *Widespread Geographic Distribution of Oral Candida dubliniensis Strains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals*. **Journal of clinical microbiology**, 1997, p. 960–964 vol. 35, n.4.

TAN WC; TAY FBK; LIM LP. *Diabetes as a risk factor for periodontal disease: current status and future considerations. Diabetes and periodontal diseases. Ann Academy of Medicine*, v. 35, n. 8, p. 571-81, 2006.

TANNER ACR, KENT JRR, DYKET V, SONIS ST, MURRAY LA. *Clinical and other risk indicators for early periodontitis in adults. J Periodontol.* 2005; 76 (4):573-81. PMID:15857098 PMCID:1224718. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2005.76.4.573>

TAYLOR GW, BORGNAKKE WS. *Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. Oral Dis.* 2008;14:191 - 203. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-0825.2008.01442.x>

TEKELI A, DOLAPCI I, EMRAL R, CESUR S. *Candida carriage and Candida dubliniensis in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. Mycoses* 2004; 47(7):315-8.

TEN CATE AR. *Bucal Histology*. 4 ed. Toronto: Mosby, 1994.

TEN CATE'S Oral Histology: *Development, Structure, and Function*. Antonio Nanci Elsevier Health Sciences, 2008 - 411p.

TREVIÑO-RANGEL RJ, GONZÁLEZ JG, GONZÁLEZ GM. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol.* 2013; 51:331-335.

TUNES RS, FOSS-FREITAS MC, NOGUEIRA-FILHO GR. *Impact of Periodontitis on the Diabetes-Related Inflammatory Status. J. Can. Dent. Assoc. Ottawa*, v. 76, n. 35, p. 1-7, Aug. 2010.

URZUA B, HERMOSILLA G, GAMONAL J, MORALES-BOZO I, CANALS M, BARAHONA S, et al. *Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis. Candida albicans and Candida dubliniensis colonize the periodontal pockets. Med Mycol.* 2008, 46:783-93.

VARGAS KG, JOLY S. *Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus positive individuals. J Clin Microbiol.* 2002; 40(2): 341-50.

VERARDI G, LUPATINI AL, BELTRAME JC, TRENTIN MS, SILVA SO, CARLI JP, LINDEN MSS. *Doença periodontal e diabete melito tipo 2. Revista Odonto • v. 17, n.*

34, jul./dez. 2009, São Bernardo do Campo, SP, Universidade Metodista de São Paulo p: 93-99.

VERNILLO AT. *Dental considerations for the treatment of patients with diabetes mellitus*. JADA 2003;134:24S-33S.

VILLAR CC, KASHLEVA H, DONGARI-BAGTZOGLU A. *Role of Candida albicans polymorphism in interactions with oral epithelial cells*. **Oral Microbiol Immunol**. 2004; 19(4):262-9.

WATAMOTO, T; SAMARANAYAKE, LP; JAYATILAKE, JAMS; EGUSA, H. et al. *Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility*. **Int J Antimicrob Agents**. Oct;34(4):333-9. Apr 18, 2009.

WILLIS AM, COULTER WA, FULTON CR, HAYES JR, SINO PM, LAMEY PJ. Transporte Candida Oral e infecção em pacientes diabéticos tratados com insulina. **Diabet Med**. 1999; 16:675-9.

<http://dx.doi.org/10.1046/j.1464-5491.1999.00134.x>

WILSON RM, REEVES WG. *Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes*. **Clin Exp Immunol**. 1986; 63:478-84.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life*. Geneve: WHO, 2002.

VIDIGAL JÚNIOR GM. Utilização da sonda periodontal no diagnóstico clínico. **Rev Bras Odontol**. 1997; 54(4):240-3.

YALDA B, OFF ENBACHER S, COLLIN S JG. *Diabetes as a modifier of periodontal disease expression*. **Periodontol 2000** 1994 Oct; 6(10): 37-49.

YAMASHITA, JM et al. Manifestações bucais em pacientes portadores de Diabetes Mellitus: uma revisão sistemática. **Rev. odontol. UNESP** [online]. 2013, vol.42, n.3, pp. 211-220. ISSN 1807-2577.

YAN, L; YANG, C; TANG, J. *Disruption of the intestinal mucosal barrier in Candida albicans infections*. **Microbiological Research**. 2013, 168: 389–395

YANG YL. *Virulence factors of Candida species*. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**. 36: 223-228, 2003.

YIGIT N; AKTAS E. *Comparison of the efficacy of different blood médium in determining the hemolytic activity of Candida species*. **J Mycol Médical**, v. 19, p. 110-5, 2009.

WEHBA C, RODRIGUES AS, SOARES FP. Diabetes e doença periodontal: uma relação bidirecional. In: Brunette CM. *Periodontia Médica: Uma abordagem integrada*. São Paulo: Senac, 2004. pp. 172-95.

WEIDLICH, P. et al. *Association between periodontal disease and systemic diseases*. **Braz. Oral. Res.** São Paulo, v. 22, supl. 1, p. 32-43, Jun. 2008. Supl. 1.

WILLIS AM, COULTER WA, SULLIVAN DJ, COLEMAN DC, HAYES JR, BELL PM, et al. *Isolation of C. dubliniensis from insulin-using diabetes mellitus patients*. **J Oral Pathol Med**. 2000;29:86-90. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0714.2000.290206.x>

WILLIAMS DW, KURIYAMA T, SILVA S, MALIC S, LEWIS MAO. *Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention*. **Periodontol 2000**. 2011 Feb;55(1):250-65.

**ARTIGO 01**

Avaliação da prevalência de *Candida* spp. em pacientes portadores de diabetes tipo 2 e periodontite de um Centro de Especialidades Odontológicas de Manaus.

Cristiano Silva Pontes\*; Ormezinda Celeste Cristo Fernandes\*\*

\*Mestrando do Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias da Universidade Federal do Amazonas e Instituto Leônidas & Maria Deane-Fiocruz, Manaus, AM.

\*\*Orientadora e pesquisadora do Instituto Leônidas & Maria Deane-Fiocruz, Manaus, AM.

\*Autor correspondente: Cristiano Silva Pontes

Tel: +55 92 36212323

Email: [pontescs@uol.com.br](mailto:pontescs@uol.com.br)

**PONTES, CS; FERNANDES, OCCF.** Avaliação da prevalência de *Candida* spp. em pacientes portadores de diabetes tipo 2 e periodontite de um Centro de Especialidades Odontológicas de Manaus

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência de espécies de *Candida* em bolsas periodontais de pacientes com diabetes mellitus tipo 2 atendidas no Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CEO-UEA).

**Métodos:** Um total de 30 pacientes com periodontite e portadores de diabetes tipo 2 e 30 pacientes não-diabéticos portadores de periodontite foram selecionados de acordo com os valores de hemoglobina glicosilada e profundidade de bolsas periodontais. As amostras foram coletadas com ajuda de swabs e pontas de papel absorvente, e semeados em placas de Petri contendo ágar-Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas à 37°C. Os isolados foram identificados pelas provas clássicas usadas em micologia.

**Resultados:** Foram encontradas leveduras em 26,7% dos pacientes. A média de idade dos pacientes do grupo caso e controle foram 56 e 50 anos, respectivamente, havendo diferença significativa entre os grupos ( $p=0,026$ ). Um total de doze dos 30 indivíduos com diabetes apresentaram leveduras (40%) e em quatro dos 30 pacientes não-diabéticos (13,3%), havendo diferença significativa ( $p=0,041$ ) entre os grupos se considerarmos categoricamente. O maior número de isolados no grupo caso (C) corresponderam a *C. albicans* (23,3%), seguido de *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%). No grupo controle (CTL) a maior prevalência também foi de *C. albicans* (6,7%) seguido de *C. krusei* (3,3%), *C. tropicalis* (3,3%). Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p = 0,006$  e  $0,005$  respectivamente) do que indivíduos não diabéticos.

**Conclusões:** Encontrou-se maior porcentagem de espécies de *Candida* em indivíduos diabéticos com periodontite, glicemia e hemoglobina glicada elevadas (40%) comparados aos indivíduos com periodontite e sem diabetes (13,3%), sendo *C. albicans* a mais prevalente (23,3%), sugerindo que a imunossupressão e descontrole glicêmico desses pacientes podem contribuir para a colonização de leveduras nas bolsas periodontais e consequente progressão da doença periodontal.

**Palavras-chaves:** *Candida* spp.; periodontite; diabetes tipo 2.

**PONTES, CS; FERNANDES, OCCF.** The prevalence of *Candida* spp. in patients with type 2 diabetes and periodontitis of a Dental Specialty Center of Manaus.

**Abstract:** The aim of this study was to determine the prevalence of *Candida* species in periodontal pockets of patients with type 2 diabetes mellitus treated at Centre Dental Specialties of the Amazonas State University (UEA-CEO).

**Methods:** A total of 30 patients with periodontitis and type 2 diabetic patients and 30 patients non-diabetic patients with periodontitis were selected according to the glycosylated hemoglobin levels and depth of periodontal pockets. The study also determined the state of oral health through periodontal indices.

**Results:** Yeasts were found in 26,7% of patients. The average age of the case group and control patients were 56 and 50 years, respectively, with significant difference between groups ( $p = 0,026$ ). A total of 12 of the 30 individuals with diabetes had yeast (40%) and 04 of 30 non-diabetic patients (13,3%) with a significant difference ( $p = 0,041$ ) between the groups considering categorically. The greatest number of isolates in the case group (C) corresponded to *C. albicans* (23,3%), followed by *C.krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6.7%) and *C. glabrata* (3,3%). In the control group (CTL) the highest prevalence was also of *C. albicans* (6,7%) followed by *C.krusei* (3,3%), *C. tropicalis* (3,3%). Individuals with diabetes and high blood glucose glycated hemoglobin had a significantly higher percentage of yeasts in periodontal pockets ( $p = 0,006$  and  $0,005$  respectively) than non-diabetic individuals.

**Conclusions:** We found a higher percentage of *Candida* species in diabetic subjects with periodontitis, blood sugar and elevated glycated hemoglobin (40%) compared to subjects with periodontitis and without diabetes (13.3%), and *C. albicans* the most prevalent (23,3%), suggesting that immunosuppression and loss of glycemic control in these patients may contribute to the colonization of yeast in periodontal pockets and consequent progression of periodontal disease.

**Keywords:** *Candida* spp .; periodontitis; type 2 diabetes.

## INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* habitam diversos ecossistemas sendo a mucosa bucal considerada um dos principais reservatórios, onde podem se estabelecer como microbiota comensal normal sem causar danos ao hospedeiro (PIZZO *et al*, 2002; SOUZA *et al*, 2010).

O diabetes mellittus (DM) é um grupo de desordens metabólicas distinguidas por tolerância alterada da glicose e metabolismo de carboidrato alterado. Tem como característica principal o excesso de glicose no sangue e, quando não controlada, pode ocasionar complicações sistêmicas crônicas, como, por exemplo: problemas renais, oculares e vasculares, entre outras. Além disso, o diabetes mellittus também está relacionado a complicações bucais, sendo a doença periodontal a mais importante, sendo considerada a sexta complicação clássica do diabetes (LOE, 1993). Essas doenças apresentam uma associação bidirecional na qual o diabetes favorece o desenvolvimento da doença periodontal e esta, quando não tratada, piora o controle metabólico do diabetes (WEHBA, 2004).

A doença periodontal é um processo inflamatório de origem infecciosa que pode acometer os tecidos gengivais (gengivite) ou os tecidos de sustentação dos dentes (periodontite),<sup>38</sup> ocasionadas pelas reações inflamatórias e imunológicas nos tecidos periodontais induzidas pelos micro-organismos do biofilme dentário, acarretando em modificações do tecido conjuntivo e do osso alveolar (REYNAULD *et al*.,2001; JÄRVENSIVU *et al*., 2004). Dentre os organismos periodontopatogênicos, as bactérias são fundamentais para o desencadeamento da doença. Entretanto, diferentes espécies de *Candida* têm sido frequentemente isoladas de bolsas periodontais de diabéticos, indicando a coparticipação destes micro-organismos na progressão da DP desses indivíduos, sendo a *C. albicans* a mais prevalente (SARDI *et al*, 2010)

Os níveis de glicose em pacientes diabéticos favorece o crescimento da levedura devido ao aumento do número de receptores disponíveis para *Candida* (BROWNLEE *et al*., 1988). A degeneração microvascular encontrada em exame histológico de pacientes diabéticos também pode predispor à colonização por *Candida*, tornando-os mais susceptíveis às infecções.

Apesar do relevante papel que as espécies de *Candida* têm desempenhado na ecologia da cavidade bucal, há carência de estudos sobre a distribuição desses microrganismos na doença periodontal de indivíduos imunocomprometidos, principalmente em diabéticos. O presente estudo tem como objetivo determinar a prevalência de espécies de *Candida* no desenvolvimento de periodontites em pacientes com diabetes melittus.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um Estudo de Caso-controle, e teve início após a aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos e o da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), sob número 46940315.7.0000.5020. Os pacientes foram informados sobre a finalidade da pesquisa, bem como sobre os métodos de coleta das amostras e os usuários do Centro de Especialidades Odontológicas que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram selecionados 30 pacientes com DP e diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (grupo caso), e 30 indivíduos com DP e sem diabetes tipo 2 (grupo controle), sem paridade de gêneros, maiores de 18 anos de idade, dentre aqueles que procuraram o Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) no período de junho a dezembro de 2015. Foram solicitados exames sorológicos (validade de 6 meses) de glicemia e hemoglobina glicada a todos os participantes.

**Critérios de inclusão:** Aceitar participar da pesquisa e ter assinado o TCLE, apresentar quadro de DP moderada a grave (mínimo de dois sítios em dentes diferentes com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm e perda de inserção maior que 3 mm); ter diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (pacientes do grupo Caso), apresentar exames de glicemia e hemoglobina glicada (validade de 6 meses).

**Critérios de exclusão:** tabagistas, uso de antibióticos, antifúngicos e tratamento periodontal nos últimos 6 meses, portadores de aparelhos ortodônticos e prótese total, gravidez, doença sistêmica, outras imunodeficiências (excluindo-se DM).

**Coleta de dados:** Após anamnese, foi realizado exame clínico periodontal por um único examinador, devidamente calibrado, com espelho clínico nº 5 e sonda periodontal preconizada pela OMS, em ambiente com boa iluminação. Utilizou-se o Índice periodontal comunitário (CPI) e Índice de perda Periodontal (PIP), onde foi preenchida a

ficha clínica e coleta de dados necessários ao estudo. O reexame de 10% da amostra (N=6) fora realizado pelo padrão, em indivíduos selecionados aleatoriamente, visando assegurar a confiabilidade dos resultados.

**Obtenção da Amostra Clínica:** Para cada paciente do grupo teste e controle, a coleta de material da bolsa periodontal fora realizada de acordo com LOBERTO et al. (2004). Após a remoção do biofilme supragengival com compressa de gaze estéril e isolamento relativo com roletes de algodão, foram colocados três cones de papel esterilizados nº 25 em cada bolsa periodontal, até a profundidade de sondagem, por 30 segundos. Foram coletados materiais de duas bolsas periodontais de diferentes dentes. Os cones contendo o material coletado foram colocados em tubos de vidro (tubos de ensaio) contendo 1ml de PBS estéril. O material coletado fora mantido em gelo até ser levado ao laboratório de biodiversidade do Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane da Amazônia (CPqLMD-FIOCRUZ), respeitando-se período máximo de três horas até seu processamento.

#### **Obtenção dos isolados de leveduras**

As amostras de material subgengival foram processadas no laboratório da CPqLMD-FIOCRUZ, e homogeneizadas em parapeito durante 30 segundos e os cones removidos com auxílio de pinças esterilizadas. Cada amostra fora centrifugada por 10 minutos (80000 Xg) e o sobrenadante descartado. O depósito fora ressuspensionado em 0,6ml de PBS e misturado em Vortex por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final (SANTOS & JORGE, 1998).

De cada amostra (suspensão de concentração final) do enxágue bucal e material subgengival, fora semeado 100ul em placas de Petri contendo Agar Sabouraud dextrose (Difco) com cloranfenicol (0,1 mg de Quemisetina Succinato, Carlo Erba, por ml de meio) e incubadas a 37°C por 48 horas e a seguir por mais cinco dias à temperatura ambiente para posterior purificação.

#### **Purificação e identificação das leveduras isoladas**

Após o período de isolamento, as amostras de leveduras foram semeadas na forma de estrias central em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud e ágar malte, de maneira a obter culturas puras e isoladas.

## Identificação através de CHROMagar Candida

O CHROMagar Candida (Microbiology, France) fora preparado de acordo com as instruções do fabricante e as placas estocadas a 4°C. Cada isolado fora subcultivado neste meio e incubado a 37°C por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia da colônia e da pigmentação das colônias (GARCÍA-MARTOS et al., 1998).

## RESULTADOS

Na presente pesquisa, foram coletadas amostras de bolsas periodontais de 60 pacientes com periodontite, sendo 30 diabéticos (grupo caso) e 30 pacientes não diabéticos (grupo controle).

Deste estudo participaram 19 homens e 41 mulheres, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,579$ ) entre os grupos com relação ao sexo (Tabelas 1 e 2). A média de idade dos participantes da pesquisa foi de 56 anos no grupo caso e 50 anos no grupo controle, havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,026$ ), quando se avalia a faixa etária (Tabelas 4,5,6) Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de bolsas periodontais de 12 (40%) pacientes diabéticos, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente (23,3%), seguindo-se *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%). Da bolsa periodontal de pacientes sem diabetes, foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 13,3% dos pacientes ( $n = 4$ ), sendo *C. albicans* a mais prevalente (6,7%), seguido de *C. krusei*(3,3%) e *C. tropicalis* (3,3%) (Gráficos 2,3,4); (Tabelas 3 e7).

**Tabela 1** - Número de indivíduos que participaram da pesquisa conforme o sexo

Sexo	Grupo caso (C)	Grupo controle (CTL)	Total
	n (%)	n (%)	N (%)
<b>Masculino</b>	8 (26,7)	11 (36,7)	19 (31,7)
<b>Feminino</b>	22 (73,3)	19 (63,3)	41 (68,3)

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 2** - Número de indivíduos grupo controle que apresentaram espécies de *Candida* na bolsa periodontal de acordo com o sexo

<b>Sexo</b>	<b>Casos positivos</b>	<b>Casos negativos</b>	<b>Total</b>
	n (%)	n (%)	N (%)
<b>Masculino</b>	1 (3,3)	10 (33,3)	11 (36,7)
<b>Feminino</b>	3 (10)	16 (53,3)	19 (63,3)

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 3** - Frequência das espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas de periodontite de indivíduos do grupo caso e controle.

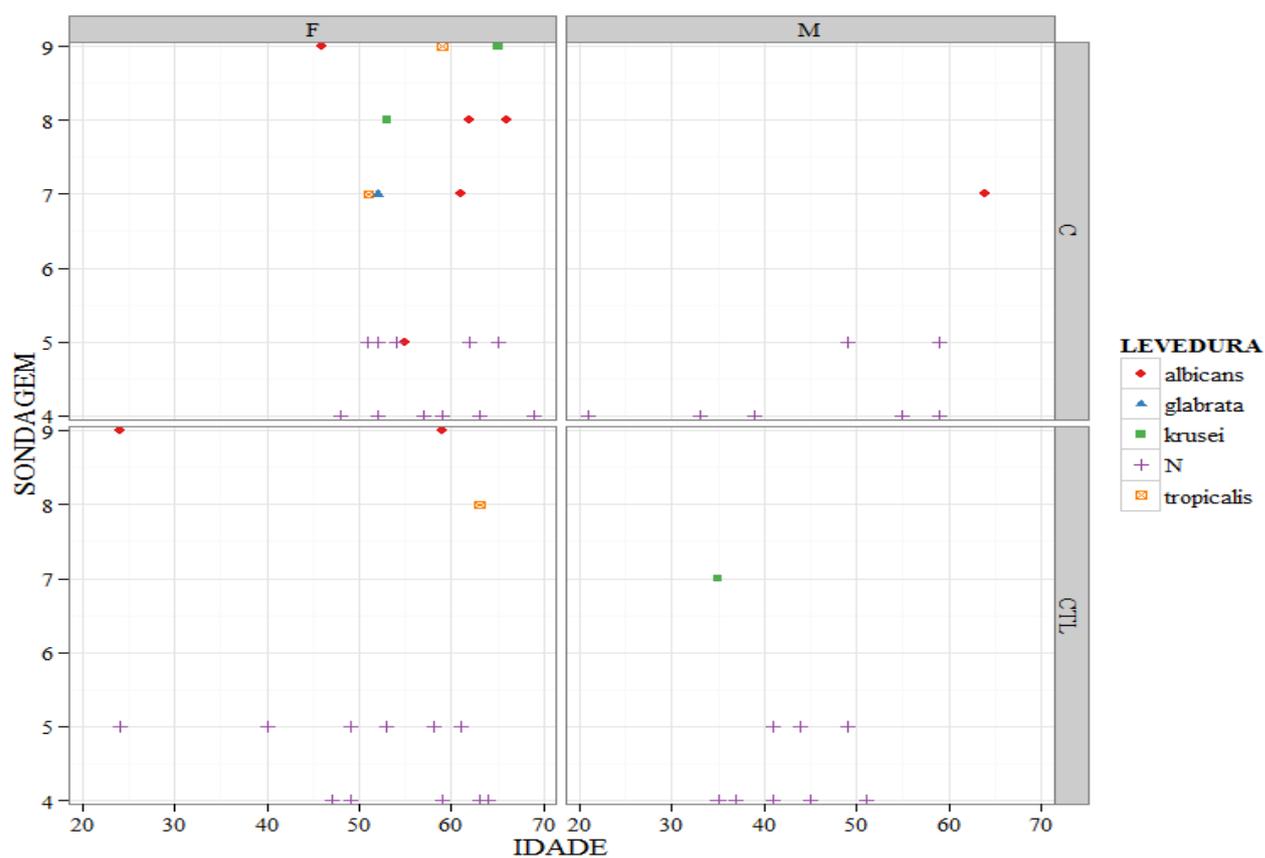
Espécies	grupo caso	grupo controle	Total
	n(%)	n (%)	N (%)
<i>C. albicans</i>	<b>7 (23,3)</b>	<b>2 (6,7)</b>	<b>9 (15)</b>
<i>C. glabrata</i>	<b>1 (3,3)</b>	<b>-</b>	<b>1 (1,7)</b>
<i>C. tropicalis</i>	<b>2 (6,7)</b>	<b>1 (3,3)</b>	<b>3 (5)</b>
<i>C. krusei</i>	<b>2 (6,7)</b>	<b>1 (3,3)</b>	<b>3 (5)</b>
<b>Total de espécies</b>	<b>12 (40)</b>	<b>4 (13,3)</b>	<b>16 (26,7)</b>
<b>p valor = 0,139</b>			

Fonte: dados da pesquisa.

O número de isolados de espécies de *Candida* coletados de bolsas periodontais de diabéticos (12 isolados) foi significativamente maior que os obtidos do grupo controle (4 isolados), havendo diferença estatística (p valor=0,041) se avaliarmos categoricamente por gênero (Tabela 7). Ao avaliarmos as espécies isoladamente, houve maior predomínio de isolados de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* em pacientes diabéticos, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 3).

Dos indivíduos examinados (grupo caso e controle), 16 (26,7%) apresentaram leveduras do gênero *Candida* somente em regiões onde a sondagem de profundidade foi

maior que 5 mm, não havendo diferenças estatísticas entre os dois grupos. (Gráfico1)



**Gráfico 1:** Presença de leveduras de acordo com profundidade de sondagem e idade dos grupos da pesquisa.

Sondagem= mm

**p valor= 0,27 Mann Whitney**

Fonte: dados da pesquisa

Houve diferença estatística significativa ( $p = 0,026$ ) entre os grupos quando se avaliou a faixa etária (Tabelas 4, 5 e 6).

**Tabela 4** - Faixa etária dos participantes da pesquisa

Idade	grupo caso	Grupo controle	N (total)	p valor	Mann Whitney
Median(IQR)	56(51.2;62)	50 (41.8;58)	53(46.8;59.5)	0,026	

Fonte: dados da pesquisa.

**Tabela 5** - Número de indivíduos grupo controle que apresentaram espécies de *Candida* de acordo com a faixa etária

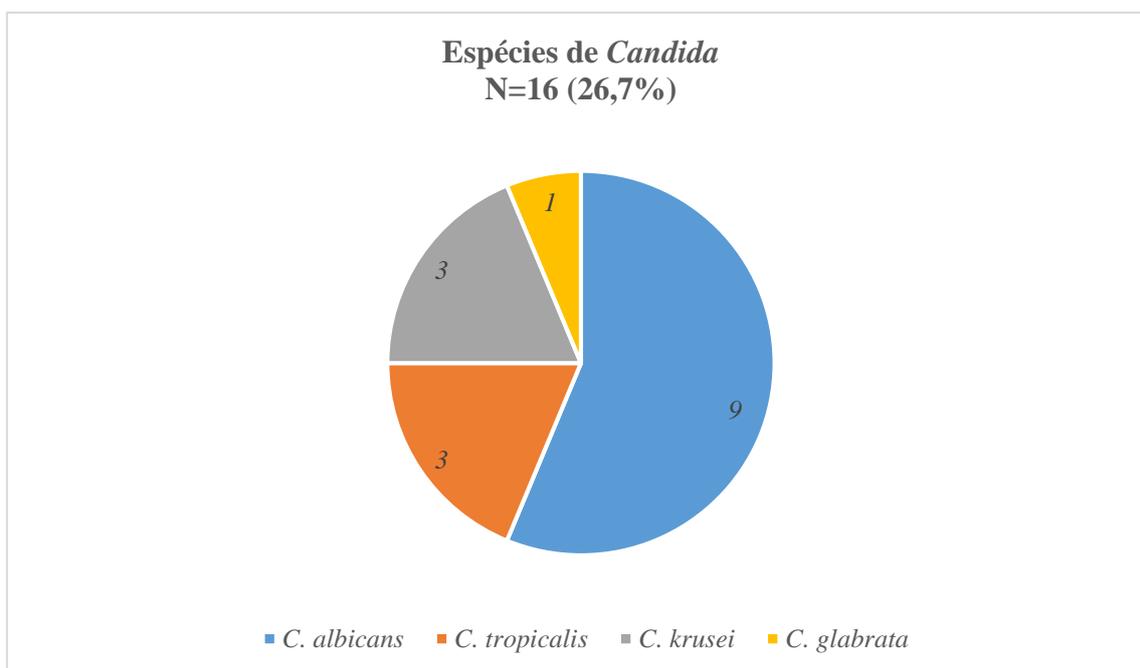
<b>Faixa etária</b>	<b>Leveduras (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>
<b>20-30</b>	1 (3,3)	1 (3,3)
<b>31-40</b>	1 (3,3)	3 (3,3)
<b>41-50</b>	-	9 (30)
<b>51-60</b>	1 (3,3)	9 (30)
<b>61-70</b>	1 (3,3)	4 (13,3)
<b>Total</b>	4 (13,3)	26 (86,7)

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 6** - Número de indivíduos diabéticos que apresentaram espécies de *Candida* de acordo com a faixa etária

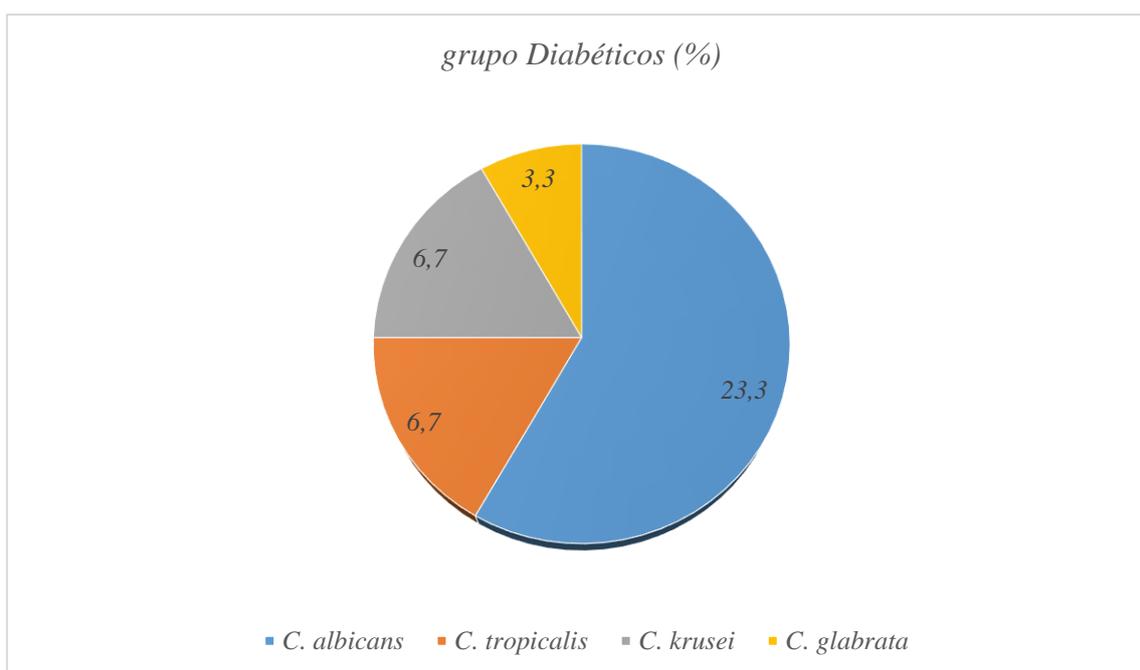
<b>Faixa etária</b>	<b>Leveduras (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>
20-30	-	1 (3,3)
31-40	-	2 (6,7)
41-50	1 (3,3)	2 (6,7)
<b>51-60</b>	<b>5 (16,6)</b>	9 (30)
<b>61-70</b>	<b>6 (20)</b>	4 (13,3)
<b>Total</b>	<b>12 (40)</b>	18 (60)

Fonte: dados da pesquisa



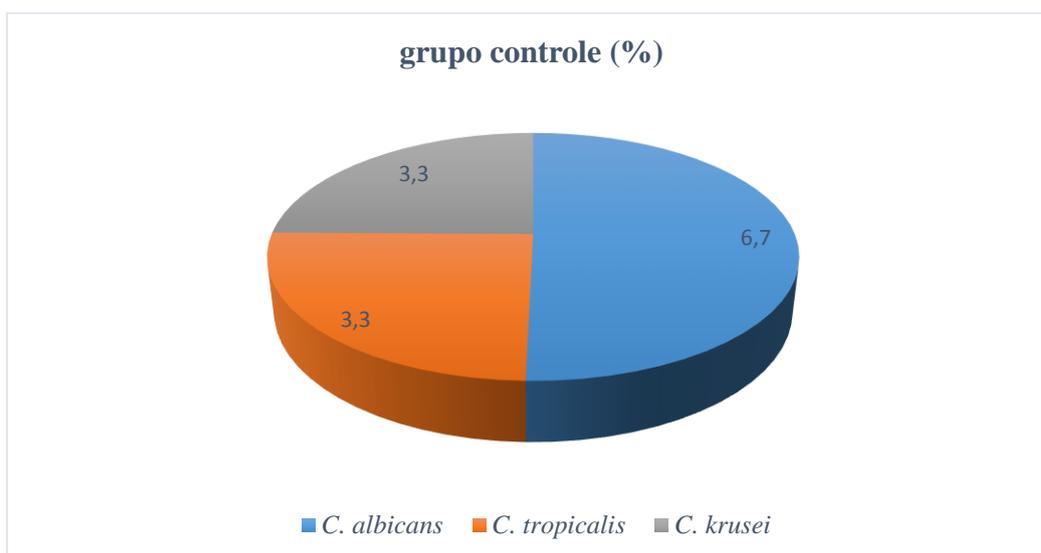
**Gráfico 2:** Espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes diabéticos e controle

Fonte: dados da pesquisa



**Gráfico 3:** Prevalência de espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes diabéticos

Fonte: dados da pesquisa



**Gráfico 4:** Prevalência de espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes sem diabetes.

Fonte: dados da pesquisa

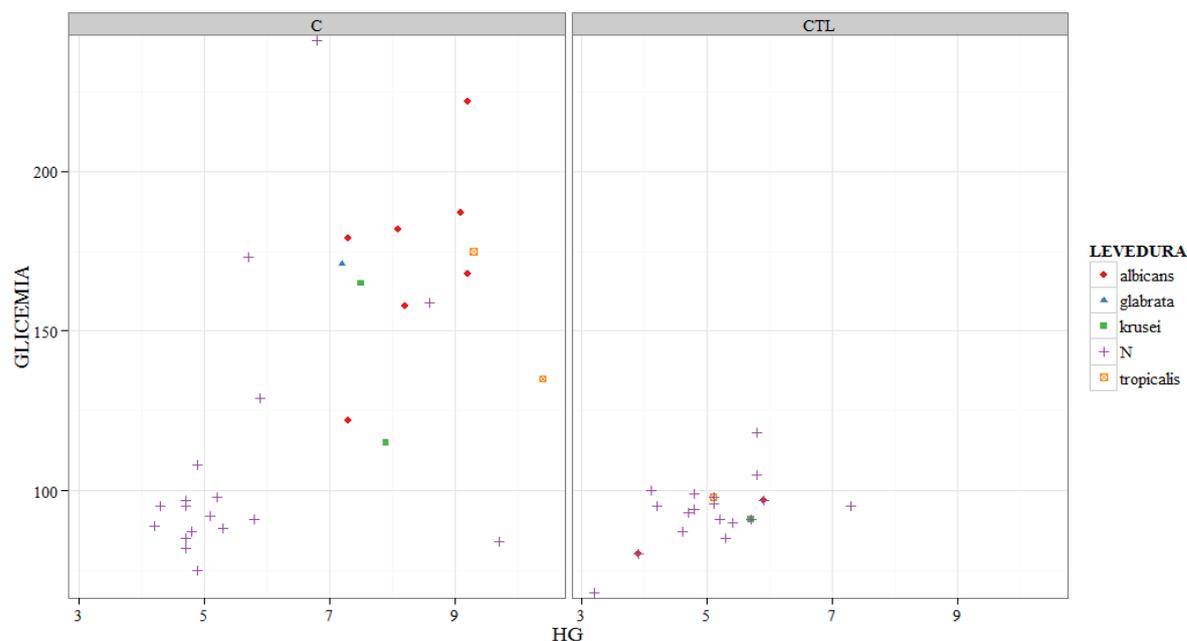
**Tabela 7:** Prevalência do gênero *Candida* isoladas de bolsas periodontais de diabéticos e controle.

Espécies	Nº de isolados	
	Diabéticos N=30	Controle N=30
<i>C. albicans</i>	7	2
<i>C. tropicalis</i>	2	1
<i>C. krusei</i>	2	1
<i>C. glabrata</i>	1	-
<b>Total (%)</b>	<b>12 (40%)</b>	<b>5 (13,3%)</b>

**p valor=0,041**

Fonte: dados da pesquisa.

Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p = 0,006$  e  $0,005$  respectivamente) do que indivíduos não diabéticos (Gráfico 5).



**Gráfico 5:** Leveduras encontradas segundo valores de glicemia e hemoglobina glicada (HG) nos grupos caso (C) e controle (CTL).

N= negativos

Fonte: dados da pesquisa.

## DISCUSSÃO

*Candida* spp. bucais são leveduras comensais e sua transformação em patógeno oportunista ocorre da combinação de alguns fatores que podem afetar esse equilíbrio como alterações do ambiente da cavidade bucal, do próprio fungo, e da imunidade do hospedeiro, principalmente em indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), com deficiência nutricional, neoplasias ou com doença metabólica como diabetes mellitus (TEKELI et al.,2004).

Diversos estudos sobre *Candida* spp. em pacientes com periodontite e com fatores de risco para candidoses têm sido documentados, mas o papel de *Candida* spp. na cavidade bucal de indivíduos diabéticos é controverso, e a sua prevalência nesses pacientes varia de

18 a 80% (SOYSA et al., 2006), dependentes da metodologia utilizada no laboratório, ao número e as características dos indivíduos, às técnicas de amostragem, e a fatores sociais.

No presente estudo, leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de bolsas periodontais de 12 (40%) dos pacientes diabéticos, e a presença de *Candida* spp. em pacientes com periodontite e sem diabetes foi de 13,33%, corroborando com os resultados do isolamento de *Candida* em outros estudos que variaram de 7,96 a 69,2% (ALBANDAR, 2002; REYNAULD et al., 2001; JAVED et al., 2009; JARVENSIVU et al., 2004; SARDI et al., 2010; SUAREZ et al., 2014). Esses resultados sugerem que a maior prevalência destas leveduras em bolsas periodontais de diabéticos podem indicar a coparticipação destes microrganismos na progressão da doença periodontal nesses pacientes.

Nesse estudo, *C. albicans* foi a mais prevalente nas bolsas periodontais dos dois grupos, sendo 23,3% nos pacientes diabéticos e 6,7% naqueles sem diabetes. DAHLEN et al. (1995) estudaram a frequência e prevalência de hastes entéricos, estafilococos e *Candida* em amostras de placa subgengival de pacientes submetidos a tratamento periodontal, e os fungos foram recuperados a partir de 7,3% das amostras. Entretanto, Peixoto et al. (2010) em uma revisão da literatura sobre a colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais, encontrou uma média de 20% de *C. albicans* de bolsas periodontais de pacientes com periodontite, numa prevalência maior que a encontrada no nosso estudo.

Em estudo realizado por Kignel et al. (2000) analisando aspectos fúngicos do câncer bucal, verificaram que dos 33 pacientes imunossuprimidos que participaram da pesquisa, 42,4 % foram positivos para *Candida* spp. Martins et al. (2002) analisando a presença de *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. na cavidade oral, encontraram a levedura em 61,22 % dos pacientes estudados.

Numa revisão de literatura sobre a presença de *Candida* spp. na doença periodontal, Sardi et al. (2010) encontraram *C. albicans* em 57,3%, *C. tropicalis* em 15,85% e *C. glabrata* em 4,87% de bolsas periodontais de pacientes diabéticos. Num estudo que avaliou a presença de leveduras nas cavidades orais de pacientes diabéticos, Suarez et al. (2013) encontraram uma prevalência de 74,8% de *Candida* spp., confirmando uma variabilidade em relação ao nosso estudo que pode ser resultante de fatores sociais

ou da técnica de amostragem. Além disso, os pacientes poderiam estar com o sistema imunológico menos atuante, o que pode ter contribuído para a colonização pelas leveduras.

Na literatura, diabetes do tipo 2 tem alta prevalência e seu acometimento aumenta de acordo com a faixa etária, principalmente em indivíduos acima dos 40 anos o que coincide com a faixa etária na qual ocorre maior prevalência de doença periodontal grave ou avançada (ALBANDAR, 2002).

O porcentual de isolamento de leveduras observado nos pacientes neste estudo foi maior na faixa etária entre 50 e 60 anos, corroborando com dados do Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil, que evidenciou a influência da idade na prevalência de Diabetes e observou incremento de 2,7% na faixa etária de 30 a 59 anos e de 17,4% na faixa etária de 60 a 69 anos. Em nosso estudo, os dois grupos estudados de diabéticos e não diabéticos diferiram estatisticamente em relação à idade ( $p=0,026$ ), em desacordo com outros estudos (DOROCCA-BOBKOWSKA et al., 1996; GARCÍA-MARTOS et al., 1998).

O maior número de participantes e de amostras positivas foram provenientes de mulheres, concordando com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) que estimou que, no Brasil, 6,2% da população com 18 anos ou mais de idade referiram diagnóstico médico de diabetes, sendo de 7,0% nas mulheres e de 5,4% nos homens. Essa maior proporção no estudo talvez possa ser justificada pelo fato do sexo feminino possuir maior assiduidade na realização de exames de rotina e dedicação aos assuntos relacionados à saúde, associados à disposição para participar da pesquisa (SCHMIDT et al., 2014; IBGE, 2013).

No nosso trabalho, houve maior colonização de *Candida* spp. nos pacientes diabéticos com glicemia e hemoglobina glicosilada elevadas, havendo diferença estatística entre os grupos, e concordando com alguns trabalhos que indicam alteração da colonização de leveduras nas cavidades orais pelos níveis de glicose no sangue pois os níveis de glicose em pacientes diabéticos favorecem o crescimento da levedura com aumento do número de receptores disponíveis para *Candida* (KHOSRAVI et al., 2008, SARDI et al., 2012; SUAREZ et al., 2014).

Além disso, a degeneração microvascular encontrada em exames histológicos de pacientes diabéticos podem facilitar a colonização por *Candida* tornando-os mais

susceptíveis a infecções associado à deficiência de neutrófilos nesses pacientes (DARRE et al., 2008). Entretanto, nossos resultados discordam com o relatório de Manfredi et al. (2002) que afirmam que a frequência de isolados de *Candida* independem do estado do portador e da hemoglobina glicada (HG), e sugerem que o crescimento das leveduras na cavidade bucal de pacientes diabéticos depende de outros fatores.

Diferentes trabalhos indicam *C. albicans* como a levedura isolada com maior frequência nas cavidades orais de pacientes diabéticos (BELAZI et al., 2005; KADIR et al., 2002; KHOSRAVI et al., 2008; TEKELI ET AL., 2004). No presente estudo, esta espécie foi a mais prevalente e encontrou-se com maior frequência tanto em indivíduos controlados quanto nos indivíduos descontrolados. Contudo, outro estudo com pacientes diabéticos e controles saudáveis constatou que as espécies de *C. albicans* não foram mais prevalentes nos indivíduos diabéticos (JAVED et al., 2009). Algo semelhante foi observada em pacientes com HIV, em que os isolados de espécies de *C. albicans* não é mais prevalente em estágios avançados da doença (CASTRO et al., 2013).

A descoberta de isolados de espécies de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* em nosso estudo corrobora outros relatórios que destacam a importância das espécies de *Candida* não-*albicans* como agentes patogênicos em seres humanos indutores de infecções sistêmicas com os seguintes fatores de risco: imunossupressão (AIDS, doentes com neutropenia), uso prolongado de dispositivos endovenosos ou dispositivos protéticos. Entretanto, são escassos os estudos exploratórios que identifiquem essas espécies de *Candida* como responsáveis pela candidíase oral nesses pacientes (NETEA et al., 2008; SARDI et al., 2012; SUAREZ et al., 2014)

As espécies de *C. albicans* têm sido relacionados com a resistência às substâncias antifúngicas (CASTRO et al., 2013). Neste trabalho, esse fator não pôde ser relacionado com a presença destas leveduras, uma vez que foram excluídos pacientes com terapia antifúngica e não foram realizados testes de susceptibilidade a estes medicamentos.

Diabetes Mellitus é considerado um fator de risco para o desenvolvimento da doença periodontal, sobretudo em pacientes com mau controle da doença (SOYSA et al., 2006). Nosso estudo não encontrou associação estatística entre profundidade de sondagem das bolsas periodontais e controle glicêmico. Sondagens maiores que 5 mm, que refletem moderada gravidade periodontal, foram semelhantes para ambos os pacientes (diabéticos

e não diabéticos). Estes resultados coincidem com o estudo realizado por Arrieta et al. (2003) que relataram que nenhuma relação existe entre situação periodontal e controle metabólico da doença.

A microbiota periodontal em pacientes diabéticos é similar à dos não diabéticos, e outros fatores podem estar envolvidos na maior prevalência desta complicação em diabéticos, como a anormalidade da resposta imune do hospedeiro frente às infecções bucais (GREGHI et al., 2002; HERRING; SHAH, 2006; VERNILLO, 2003).

## CONCLUSÕES

- *Candida* spp foi encontrada na periodontite de pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis, porém em proporções distintas.
- *Candida albicans* foi a espécie isolada mais prevalente em diabéticos (23,3%), seguida de *C. tropicalis* (6,75%), *C. krusei* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%).
- Encontrou-se maior prevalência de espécies de *Candida* em indivíduos diabéticos com periodontite, glicemia e hemoglobina glicada elevadas (40%) comparados aos indivíduos com periodontite e sem diabetes (13,3%), sugerindo que a imunossupressão e descontrole glicêmico desses pacientes podem contribuir para a colonização de leveduras nas bolsas periodontais e consequente progressão da doença periodontal.

## Considerações Finais

Estudos posteriores serão necessários para determinar o real impacto desses achados sobre a disseminação da infecção periodontal em diabéticos.

## REFERÊNCIAS

1. ALBANDAR JM. *Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. Periodontol* **2000**. 2002; 29: 177-206.
2. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. J Periodontol*, v.71, n. 5, suppl., p. 853-5, May 2000.

3. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. *Parameteron "refractory" periodontitis*. **J Periodontol.**, v.71, n. 5, suppl., p. 859-60, May 2000.
4. ARRIETA JJ, BARTOLOMÉ B, JIMÉNEZ E, SAAVEDRA P, ARRIETA FJ. Problemas bucodentales en pacientes con diabetes mellitus (II): Índice gingival y enfermedad periodontal. **Med Oral**. 2003; 8: 233-47.
5. BANNO, Y.; YAMADA, T.; NOZAWA, Y. *Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, Candida albicans separation of three enzymes and some biological properties*. **Sabouraudia: J Med Vet Mycol.**, v.23, n.1, p.47-54, Feb. 1985.
6. BARRETT-BEE, K. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, v.131, p. 1217-21, 1985.
7. BELAZI M, VELEGRAKI A, FLEVA A, GIDARAKOU I, PAPANAU L, BAKA D, et al., *Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors*. **Mycoses**. 2005; 48: 192-6.
8. BENDOVIÁ, O. *The killer phenomenon in yeasts*. **Folia Microbiol**, v.31, n.5, p.422-33, 1986.
9. BORG M; RÜCHEL R. *Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of Candida albicans and Candida tropicalis*. **J Med Vet Mycol**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1990.
10. BORG M; RÜCHEL R. *Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic Candida spp. during experimental infection of oral mucosa*. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, p. 626-31, 1988.
11. BRASIL- Estudo multicêntrico sobre a prevalência do diabetes mellitus no Brasil. Brasília- Ministério da Saúde - 1991.
12. BROWNLEE M. *Glycation and diabetic complications*. **Diabetes**, 43: 836-841, 1994. BROWNLEE M, CERAMI A, VLASSARA H. *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. **N Engl J Med**. 1988;318:1315-21.
13. CASTRO LA, ÁLVAREZ MI, MARTINEZ E. *Pseudomembranous candidiasis HIV/AIDS patients in Cali, Colombia*, **Mycopathol**. 2013; 175: 95-8.

14. CUTLER, JE. *Putative virulence factors of Candida albicans*. **Ann Rev Microbiol**, v. 45, p. 187-218, 1991.
15. DAHLEN G; WILKSTRÖN M. *Occurrence of enteric rods, staphylococci and Candida in subgingival samples*. **Oral Microbiol Immun**, v. 10, n. 1, p. 42-6, 1995.
16. DARRE L, VERGNES JN, GOURDY P, SIXOU M. *Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies*. **Diabetes & metabolism**. 2008;34:497-506
17. DOROCCA-BOBKOWSKA B, BUDTZ-JORGENSEN E, WLOCH, S. *Non-insulindependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis*. **J Oral Pathol Med**.1996;25:411-5.
18. FROST GI; CSÓKA T; STERN R. *The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview*. **Trends Glycosc Glycolechnol**, v. 8, n. 44, p.419-34, Nov. 1996.
19. GARCÍA-MARTOS P, GARCÍA-AGUDO R, HERNÁNDES-MOLINA JM, MARÍN P, TARELLO E, MIRA J. *Identificación de levaduras de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar Candida*. **Rev Iberoam Micol**. 15 : 131-135, 1998.
19. GOLDENBERG P, SCHENKMAN S, FRANCO LJ. Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos. **Rev Bras Epidemiol**.2003;6(1):18-28.
- IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, IBGE, 2014, 180p.
20. SARDI J, DUQUE C, MARIANO F, PEIXOTO I, HOFLINGER J, GONCALVES R. *Candida spp. in periodontal disease: a brief review*. **J Oral Sci**. 2010 Jun;52(2):177-185.
21. JÄRVENSIVU A, HIETANEN J, RAUTEMAA R, SORSA T, RICHARDSON M. *Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo* **Oral Diseases**. 2004,10,106-12.
22. JAVED F, KLINGSPOR L, SUNDIN U, ALTAMASH M, KLINGE B, ENGSTROM PE. *Periodontal conditions, oral Candida albicans and salivary proteins in type2 diabetic subjects with emphasis on gender*. **BMC Oral Health**. 2009 May12;9:12.

23. KADIR T, PISIRICILER R, AKYÜZ S, YARAT A, EMEKLI N, IPBÜKER A. *Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local a etiologic and systemic factors.* **J Oral Rehabil.** 2002; 29: 452-7.
24. KIGNEL, S. & BIRMAN, E.G. Aspectos fúngicos do câncer bucal. **Rev. Bras. Canc.,** v.46, n.3, p.279-282, 2000.
25. KHOSRAVI A, YARAHMADI S, BAIAT M, SHOKRI H, POURKABIREH M. *Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus.* **J Med Mycol.** 2008; 18: 83-8.
26. LOE H. Periodontal disease. *The sixth complication of diabetes mellitus.* **Diabetes Care** 1993; 16: 329-334
27. MCCOURTIE J, DOUGLAS LJ. *Relationship between cell surface composition of Candida albicans and adherence to acrylic after growth on different carbon sources.* **Infect Immun.** 1981; 32(3):1234-41.
28. MANFREDI M, AL-KARAAWI Z, MCCULLOUGH M, HUREL S, Porter S. *The isolation, identification and molecular analysis of candidaspp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus.* **Oral Microbiol Immunol.** 2002; 17: 181-5.
29. MARTINS, C.A.P.; SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.C.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Presença de Candida spp em pacientes com periodontite crônica. **Cienc. Odontol. Bras,** v. 5, n. 3, p. 75-83, 2002.
30. ODDS MW J, YEH CK, Johnson *Salivary alterations in type2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension.* **Community Dentistry and Oral Epidemiology.** 2000; 28: 373-81
31. PEIXOTO ITA, SARDI JCO, ANÍBAL PC, GONÇALVES RB, HÖFLING JF. Evidências científicas da colonização de *Candida* spp. em bolsas periodontais. **RFO,** Passo Fundo, v. 15, n. 2, p. 177-182 maio/ago. 2010.
32. PIZZO G, BARCHIESI F, FALCONI DI FRANCESCO L, GIULIANA G, ARZENI D, MILICI ME, et al. *Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival Candida albicans isolates.* **Arch Oral Biol.** 2002; 47:189-96.

33. RAMS TE, SLOTS J. *Candida biotypes in human adult periodontitis*. **Oral Microbiol Immunol**. 1991;6(3):191-2.
34. REYNAUD AH, B. NYGAARD-OSTBY, BOYGARD GK, ERIBE ER. *Yeast in periodontal pockets*. **J. Clin Periodontal**. 2001; 28:860-64.
35. SAMARANAYAKE LP, MACFARLANE TW. *The adhesion of the yeast Candida albicans to epithelial cells of human origin in vitro*. **Arch Oral Biol**. 1981; 26(10):815-20.
36. SANDBERG GE, SUNDBERG HE, FJELLSTROM CA, WIKBLAD KF. *Type 2 diabetes and oral health: a comparison between diabetic and non-diabetic subjects*. **Diabetes Res Clin Pract** 2000; 50: 27-34.
- SCHMIDT MI, HOFFMANN JF, DINIZ MFS et al. High prevalence of diabetes and intermediate hyperglycemia – The Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Diabetol Metab Syndr**. 2014 nov; 6(123):1-9.
37. SINGI G. *Fisiologia para odontologia: um guia prático para o cirurgião-dentista atender seus pacientes com segurança*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005; p. 106-108.
38. SLOTS J, RAMS TE, LISTGARTEN MA. *Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis*. **Oral Microbiol Immunol**. 1988;3: 47-52.
39. SOUSA MG, COSTA A DE L, RONCALLI AG. *Clinical study of the oral manifestations and related factor in type 2 diabetics patients*. **Braz J Otorhinolaryngol**. 2011; 77: 145-52
40. SOYSA N, SAMARANAYAKE L, ELLEPOLA A. *Diabetes mellitus as a contributory factor in oral candidiasis*. **Diabet Med**. 2006; 23: 455-9.
41. SUAREZ BL; ALVAREZ MI; DE BERNAL M; COLLAZOS A. *Candida species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia*. **Colomb. Med.** [online]. 2014, vol.44, n.1, pp.26-30. ISSN 1657-9534.

42. TEKELI A, DOLAPCI I, EMRAL R, CESUR S. *Candida carriage and Candida dubliniensis in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients*. **Mycoses**. 2004; 47: 315-8.
43. URZÚA B, HERMOSILLA G, GAMONAL J, MORALES-BOZO I, CANALS M, BARAHONA S, et al. *Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis. Candida albicans and Candida dubliniensis colonize the periodontal pockets*. **Med Mycol**. 2008;46:783-93.
44. VARELLIS MLZ. O paciente com necessidades especiais na odontologia: manual prático. São Paulo: Editora Santos; 2005. 13, 239-52.
45. WEHBA C, RODRIGUES AS, SOARES FP. Diabetes e doença periodontal: uma relação bidirecional. In: Brunette CM. Periodontia Médica: Uma abordagem integrada. São Paulo: Senac, 2004. pp. 172-95.
46. WILSON RM, REEVES WG. *Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes*. **Clin Exp Immunol** 1986; 63:478-84.

## Artigo 2

Estudo da colonização de *Candida* spp. bucais e seus fatores de virulência na Periodontite de portadores de diabetes tipo 2.

Cristiano Silva Pontes\*; Ormezinda Celeste Cristo Fernandes\*\*

\*Mestrando do Programa de Pós-graduação em Saúde, Sociedade e Endemias da Universidade Federal do Amazonas e Instituto Leônidas & Maria Deane-Fiocruz, Manaus, AM.

\*\*Orientadora e pesquisadora do Instituto Leônidas & Maria Deane-Fiocruz, Manaus, AM.

\*Autor correspondente: Cristiano Silva Pontes

Tel: +55 92 36212323

Email: [pontescs@uol.com.br](mailto:pontescs@uol.com.br)

**PONTES, CS; FERNANDES, OCCF.** Estudo de *Candida* spp. bucais e seus fatores de virulência na Periodontite de portadores de diabetes tipo 2.

**Resumo:** Diabéticos apresentam um comprometimento do sistema imunológico, o que os torna mais susceptíveis à colonização por leveduras do gênero *Candida*.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de fatores de virulência de espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes com e sem diabetes mellitus tipo 2.

**Métodos:** Um total de 30 pacientes com periodontite e portadores de diabetes tipo 2 e 30 pacientes não-diabéticos portadores de periodontite foram selecionados de acordo com os valores de hemoglobina glicosilada e profundidade de bolsas periodontais. As amostras foram coletadas com ajuda de swabs e pontas de papel absorvente, e semeados em placas de Petri contendo ágar-Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubadas à 37°C. Os isolados foram identificados pelas provas clássicas usadas em micologia. As cepas isoladas de *Candida* foram submetidas a provas de capacidade de aderência e à atividade de fosfolipase e proteinase.

**Resultados:** Foram encontradas leveduras em 26,7% dos pacientes. Um total de doze dos 30 indivíduos com diabetes apresentaram leveduras (40%) e em quatro dos 30 pacientes não-diabéticos (13,3%), havendo diferença significativa ( $p=0,041$ ) entre os grupos se considerarmos categoricamente. O maior número de isolados de diabéticos (C) corresponderam a *C. albicans* (23,3%), seguido de *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%). No grupo controle a maior prevalência também foi de *C. albicans* (6,7%) seguido de *C. krusei* (3,3%), *C. tropicalis* (3,3%). Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p = 0,006$  e  $0,005$  respectivamente) do que indivíduos não diabéticos. *Candida albicans* e *C. tropicalis* desenvolveram aderência e atividade de proteinase e fosfolipase nos dois grupos testados, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,269$ ). *Candida Krusei* apresentou fraca aderência e atividade de proteinase somente no grupo dos diabéticos, e *C. glabrata* isolada de diabéticos apresentou fraca aderência.

**Conclusões:** Encontrou-se maior porcentagem de espécies de *Candida* em indivíduos diabéticos com periodontite, glicemia e hemoglobina glicada elevadas (40%) comparados

aos indivíduos com periodontite e sem diabetes (13,3%), sendo *C. albicans* a mais prevalente (23,3%). As cepas de *Candida albicans* e *Candida não-albicans* desenvolveram fatores de virulência sugerindo que a imunossupressão, idade e descontrole glicêmico de pacientes diabéticos podem contribuir para a colonização de leveduras nas bolsas periodontais e consequente progressão da doença periodontal.

**Palavras-chaves:** *Candida* spp.; periodontite; diabetes tipo 2, fatores de virulência.

**PONTES, CS; FERNANDES, OCCF. Study of colonization of *Candida* spp. mouth and its virulence factors in periodontitis type 2 diabetes patients.**

**Abstract:** Diabetics have a compromised immune system, which makes them more susceptible to colonization by *Candida* yeasts. The objective of this study was to evaluate the colonization and development of *Candida* species of virulence factors isolated from periodontal pockets of patients with and without type 2 diabetes mellitus.

**Methods:** A total of 30 patients with periodontitis and type 2 diabetic patients and 30 non-diabetic patients with periodontitis were selected according to the glycosylated hemoglobin levels and depth of periodontal pockets. The samples were collected with swabs and absorbent paper points and seeded in Petri dishes containing agar Sabouraud dextrose with chloramphenicol and incubated at 37 ° C. The isolates were identified by classical methods used in mycology. Isolates of *Candida* were subjected to tests of adhesiveness and phospholipase and proteinase activity.

**Results:** Yeasts were found in 26.7% of patients. A total of twelve of the 30 individuals with diabetes had yeast (40%) and four of 30 non-diabetic patients (13.3%) with a significant difference ( $p = 0.041$ ) between the groups considering categorically. The greatest number of isolates from diabetic corresponded to *C. albicans* (23.3%), followed by *C.krusei* (6.7%), *C. tropicalis* (6.7%) and *C. glabrata* (3.3%). In the control group the highest prevalence was also of *C.albicans* (6.7%) followed by *C.krusei* (3.3%) and *C. tropicalis* (3.3%). Individuals with diabetes and high blood glucose glycated hemoglobin had a significantly higher percentage of yeasts in periodontal pockets ( $p = 0.006$  and  $0.005$  respectively) than non-diabetic individuals. *Candida albicans* and *C. tropicalis* developed adherence and proteinase and phospholipase activity in the two groups tested, with no statistical difference between the groups ( $p = 0.269$ ). *Candida Krusei* had a weak adherence and proteinase activity only in the diabetic group, and *C. glabrata* isolated from diabetics had a weak adherence.

**Conclusions:** We found a higher percentage of *Candida* species in diabetic subjects with periodontitis, blood sugar and elevated glycated hemoglobin (40%) compared to subjects with periodontitis and without diabetes (13.3%), and *C. albicans* the most prevalent (23.3%). The strains of *Candida albicans* and non-*albicans* developed virulence factors

suggesting that immunosuppression, age and uncontrolled blood glucose of diabetic patients may contribute to the colonization of yeast in periodontal pockets and consequent progression of periodontal disease.

**Keywords:** *Candida* spp .; periodontitis; Type 2 diabetes, virulence factors.

## INTRODUÇÃO

Diversas espécies de *Candida* são encontradas como microrganismos comensais da flora da cavidade bucal humana (BARBOSA et al., (2014). Entretanto, quando há desequilíbrio da microbiota local relacionados a fatores do hospedeiro (presença de dentaduras, uso de aparelhos ortodônticos, tabagismo, condição periodontal, terapias antimicrobianas, imunossupressão, AIDS, diabetes) e à fisiologia das leveduras, estas podem invadir os tecidos e desenvolver sua fase patogênica, podendo desencadear infecções superficiais ou processos infecciosos profundos (FONSECA, 1980). A capacidade que as leveduras do gênero *Candida* têm de colonizar, penetrar e fazer danos ao tecido do hospedeiro depende de um equilíbrio entre fatores de virulência deste microrganismo e de fatores específicos ligados ao hospedeiro (PIRES et al. 2001).

A patogenicidade de *Candida* spp. depende do desenvolvimento de seus fatores de virulência como: formação de hifas, variabilidade fenotípica, produção de enzimas hidrolíticas, principalmente fosfolipases e proteinases, adesão às células do hospedeiro (FOTEDAR, 2005). Infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são frequentes no hospedeiro imunocomprometido, com aproximadamente 20 espécies reconhecidamente patogênicas destacando-se *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* (NEVES et al., 2002; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; COSTA, 2009). Dentre as espécies, *Candida albicans* é considerada a mais virulenta, sendo capaz de resistir ao ataque de células fagocíticas, contribuindo para evasão do sistema imune (NAGLIK & HUBE, 2003; YAN L. et al., 2013).

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada por hiperglicemia provocada pela deficiência total ou relativa da secreção de insulina e/ ou na resistência metabólica que acompanha a ação da insulina nos órgãos-alvo (MANFREDI et al., 2004). Pacientes diabéticos são mais propensos a desenvolverem infecção dos tecidos periodontais, principalmente aqueles com descontrole glicêmico, podendo acarretar maior colonização por leveduras e infecções graves. A alta concentração de glicose na saliva pode servir como nutriente para as espécies de *Candida*, e a reduzida capacidade de neutrófilos na presença de concentrações elevadas de glicose podem conduzir ao aumento da colonização de *Candida* spp. (VERARDI et al. 2009).

O controle metabólico do diabetes avaliado por níveis de glicemia ou pela hemoglobina glicosada (HbA1c) são parâmetros sistêmicos utilizados na maioria dos

estudos. Para indivíduos diabéticos, o nível de HbA1c é considerado satisfatório em níveis abaixo de 6%, sendo que valores superiores a 8% são inaceitáveis e exigem alguma forma de intervenção (TAN et al., 2006).

O diabetes é classificado em dois tipos, diabetes tipo 1 (DTM1) ou insulínodépendente e diabetes tipo 2 (DTM2) ou não insulínodépendente. Segundo a OMS (2014), o DTM2 representa aproximadamente 90% das pessoas com diabetes no mundo, e sua detecção ocorre habitualmente tardiamente, embora seja mais frequente após os 40 anos de idade, com pico de incidência aos 60 anos.

As alterações periodontais ocorrem com maior prevalência no paciente com DTM2; entretanto, tanto DTM1 como DTM2 têm maior risco de desencadear doenças bucais, sendo a doença periodontal a mais frequente, levando a uma maior perda dentária (DOUGLAS, 1988; WEHBA, 2004).

Uma forte relação foi encontrada entre a prevalência de *Candida* spp. bucais e doença periodontal (DP). Entretanto, há poucos estudos que correlacionam o papel de *Candida* spp. bucais na doença periodontal em diabéticos. O objetivo desse estudo foi avaliar a virulência de espécies de *Candida* quanto à aderência, produção de fosfolipase e proteinase em bolsas periodontais de portadores de diabetes Tipo 2.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Trata-se de um Estudo de Caso-controle desenvolvido no Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade do Estado do Amazonas (CEO-UEA) e teve início após a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em seres humanos, sob número C.A. 46940315.7.0000.5020. Os pacientes foram informados sobre a finalidade da pesquisa, sobre os métodos da coleta das amostras e os usuários do CEO-UEA que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram selecionados 30 pacientes com DP e diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (grupo caso), e 30 indivíduos com DP e sem diabetes tipo 2 (grupo controle), sem paridade de gêneros, maiores de 18 anos de idade, dentre aqueles que procuraram o Centro de Especialidades Odontológicas da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) no período de junho a dezembro de 2015. Foram solicitados exames sorológicos (validade de 6 meses) de glicemia e hemoglobina glicada a todos os participantes.

**Crêterios de inclusão:** Aceitar participar da pesquisa e ter assinado o TCLE, apresentar quadro de DP moderada a grave (mínimo de dois sítios em dentes diferentes com profundidade de sondagem maior ou igual a 4mm e perda de inser o maior que 3 mm); ter diagnóstico médico de diabetes tipo 2 (pacientes do grupo Caso), apresentar exames de glicemia e hemoglobina glicada (validade de 6 meses).

**Crêterios de exclusão:** tabagistas, uso de antibióticos, antifúngicos e tratamento periodontal nos últimos 6 meses, portadores de aparelhos ortodônticos e prótese total, gravidez, doença sist mica, outras imunodeficiências (excluindo-se DM).

**Coleta de dados:** Após anamnese, foi realizado exame clínico periodontal por um único examinador, devidamente calibrado, com espelho clínico n  5 e sonda periodontal preconizada pela OMS, em ambiente com boa ilumina o. Utilizou-se o  ndice periodontal comunitário (CPI) e  ndice de perda Periodontal (PIP), onde foi preenchida a ficha clínica e coleta de dados necessários ao estudo. O reexame de 10% da amostra (N=6) fora realizado pelo padrão, em indivíduos selecionados aleatoriamente, visando assegurar a confiabilidade dos resultados.

**Obten o dos isolados de *Candida*:** Para cada paciente do grupo teste e controle, a coleta de material da bolsa periodontal fora realizada de acordo com LOBERTO et al. (2004). Após a remo o do biofilme supragengival com compressa de gaze estéril e isolamento relativo com roletes de algodão, foram colocados três cones de papel esterilizados n  25 em cada bolsa periodontal, até a profundidade de sondagem, por 30 segundos. Foram coletados materiais de duas bolsas periodontais de diferentes dentes. Os cones contendo o material coletado foram colocados em tubos de vidro (tubos de ensaio) contendo 1ml de PBS estéril. O material coletado fora mantido em gelo até ser levado ao laboratório de biodiversidade do Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane da Amazônia (CPqLMD-FIOCRUZ), respeitando-se período máximo de três horas até seu processamento.

### **Purifica o e identifica o das leveduras isoladas**

Após o período de isolamento, as amostras de leveduras foram semeadas na forma de estrias central em tubos de ensaio contendo  gar Sabraud e ágar malte, de maneira a obter culturas puras e isoladas.

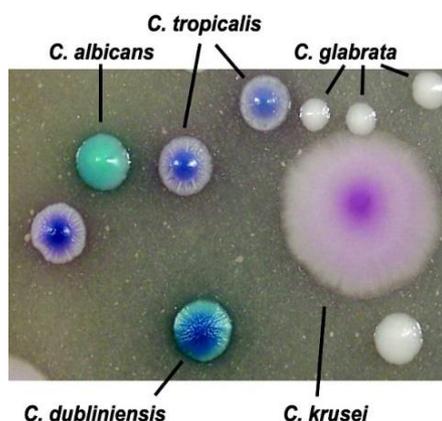


**Figura 1-** Isolamento e purificação das amostras coletadas de bolsas periodontais

Fonte: dados da pesquisa

### Identificação através de CHROMagar *Candida*

O CHROMagar *Candida* (Microbiology, France) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e as placas estocadas a 4°C. Cada isolado foi sub cultivado neste meio e incubado a 37°C por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia da colônia e da pigmentação das colônias (GARCÍA-MARTOS et al., 1998).



**Figura 2:** Identificação das espécies de *Candida* através do CHROMagar *Candida*.

Fonte: CHROMagar *Candida*

### Atividade de fosfolipase

A produção de fosfolipase foi verificada segundo Price et al. (1982). Culturas com crescimento de 48 horas em tubos contendo ágar Sabouraud dextrose foram inoculadas em pontos equidistantes nas placas de ágar fosfolipase com emulsão de ovo a 50% em solução fisiológica. Foram inoculados 10µL de uma suspensão de células ajustada na escala 1 McFarland. A leitura do teste foi realizada após 4 dias de incubação a 37°C, sendo considerado como positivo a produção de zona opaca de precipitação ao redor da colônia. A atividade enzimática (Pz) foi medida através da razão entre o diâmetro da colônia e o

diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor o valor de Pz, maior a atividade enzimática:  $Pz = 1,0$  (ausência de atividade enzimática),  $0,64 < Pz < 1,0$  (atividade enzimática positiva) e  $Pz \leq 0,63$  (atividade enzimática fortemente positiva).



**Figura 3** - Atividade positiva de fosfolipase de isolado de *C. albicans* de periodontite de diabético

Fonte: dados da pesquisa

### **Atividade de proteinase**

A produção de proteinase foi verificada segundo Ruchel et al. (1982). O fenômeno fora observado a partir de amostras de *Candida* cultivadas por 24 horas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C inoculadas em pontos equidistantes em placas de ágar proteinase. O meio indutor consiste de 0,2% de soro albumina bovina (SAB, fraction V, Sigma) e solução de vitaminas (Sigma) adicionadas de Yeast Carbon base (YCB - Difco, Detroit, MI, USA), ajustado a pH 5, esterilizado por filtração e adicionado de ágar (2%) autoclavado. A padronização do inóculo foi feita conforme descrito para o teste de produção de fosfolipase. As placas foram incubadas durante sete dias a 37°C e a leitura da atividade enzimática (Pz) será realizada utilizando-se o mesmo cálculo da atividade para fosfolipase.

### **Capacidade de aderência a células epiteliais bucais**

Os testes de aderência de *Candida* a células epiteliais foram realizadas de acordo com SOBEL et al. (1981) e KIMURA & PEARSALL, (1997), adaptado por LIMA NETO (2007).

As células de leveduras desenvolveram-se em ágar malte (Difco) por 36 h a 37°C e ressuspensas em 2 mL de tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 6,8 e 4°C, lavadas duas vezes em 2 mL de PBS sob centrifugação (2500rpm, 5 min cada) e ressuspensas em PBS a uma concentração de  $2 \times 10^7$  células.mL<sup>-1</sup> determinada por espectrofotometria.

As células epiteliais foram coletadas de um voluntário adulto e saudável através de escarificação suave da mucosa oral com “swabs” esterilizados. Em seguida, as células foram suspensas em 5 mL PBS para liberar as células. As suspensões de células epiteliais

foram lavadas duas vezes em 5 mL de PBS sob centrifugação (2500rpm, 5 min cada) para remover as bactérias que estivessem aderidas. As células foram ressuspensas em PBS a uma concentração de  $4 \times 10^4$  células.mL<sup>-1</sup> determinada por espectrofotometria. Após as lavagens, foram avaliadas morfológicamente a integridade e viabilidade das células epiteliais. O teste de aderência entre células epiteliais bucais e células de leveduras foi realizada através da união de 1 mL de cada suspensão numa proporção de 1:1 em tubos de ensaio colocados sob suave agitação durante 2 h a 37°C. Na etapa seguinte, foi adicionado o corante azul de metileno, com pipeta de Pasteur, e preparadas as lâminas para observação microscópica na objetiva de 40x. Na determinação dos resultados foram visualizados 10 (dez) campos por lâmina e usados os seguintes parâmetros: (+) intensa aderência (quando mais do que 50% da superfície das células epiteliais estiver aderida pelas células de levedura), (-) fraca aderência (quando a superfície das células epiteliais estiver aderida pelas células de levedura em até 50%), (0) sem aderência.

## **RESULTADOS**

Na presente pesquisa, foram coletadas amostras de bolsas periodontais de 60 pacientes com periodontite, sendo 30 diabéticos (grupo caso) e 30 pacientes não diabéticos (grupo controle). Deste estudo participaram 19 homens e 41 mulheres, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa ( $p=0,579$ ) entre os grupos com relação ao sexo (Tabela 1). A idade dos participantes da pesquisa variou de 24 a 69 anos, com média de 56 anos no grupo caso e 50 anos no grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 1** - Número de indivíduos que participaram da pesquisa conforme o sexo

Sexo	Grupo caso (C)	Grupo controle (CTL)	Total
	n (%)	n (%)	N (%)
<b>Masculino</b>	8 (26,7)	11 (36,7)	19 (31,7)
<b>Feminino</b>	22 (73,3)	19 (63,3)	41 (68,3)

p valor = 0,579 Mann Whitney

**Tabela 2** - Faixa etária média dos participantes da pesquisa.

Idade	Grupo caso	Grupo controle	N (total)
Mediana	56 (51,2-62)	50 (41,8-58)	53 (46,8-59,5)

Fonte: dados da pesquisa

Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de bolsas periodontais de 12 (40%) dos pacientes diabéticos, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente (23,3%), seguindo-se *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%). Da bolsa periodontal de pacientes sem diabetes, foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 13,3% dos pacientes (n = 4), sendo *C. albicans* a mais prevalente (6,7%), seguido de *C. krusei* (3,3%) e *C. tropicalis* (3,3%), havendo diferença estatística entre os grupos (p=0,041) (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3:** Espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de diabéticos.

Espécies	Nº de isolados	Frequência (%)
<i>C. albicans</i>	7	23,3
<i>C. tropicalis</i>	2	6,7
<i>C. krusei</i>	2	6,7
<i>C. glabrata</i>	1	3,3
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>40</b>

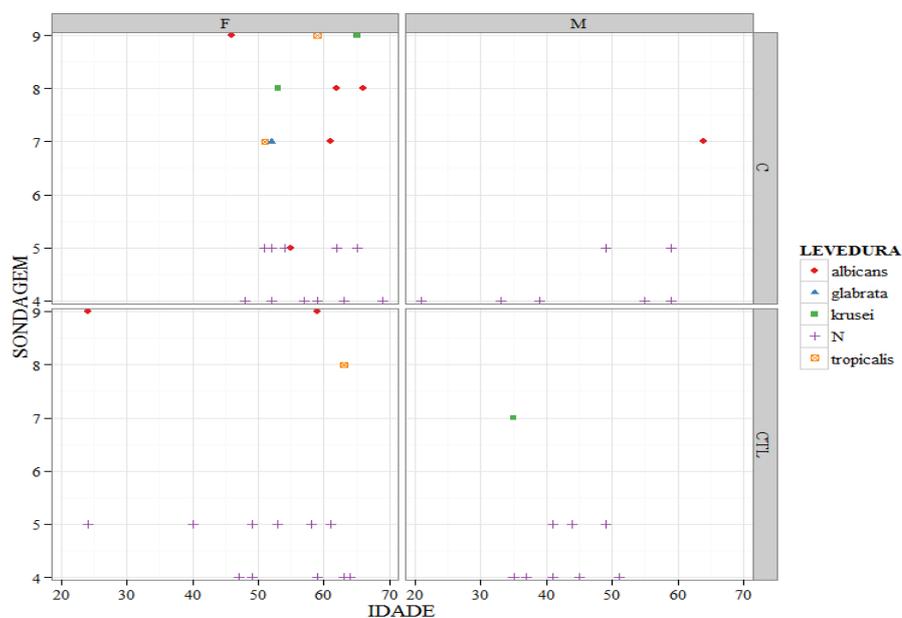
Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 4** - Espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de indivíduos do grupo controle.

Espécies	Nº de isolados	Frequência (%)
<i>C. albicans</i>	2	6,7
<i>C. tropicalis</i>	1	3,3
<i>C. krusei</i>	1	3,3
<i>C. glabrata</i>	-	-
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>13,3</b>

Fonte: dados da pesquisa

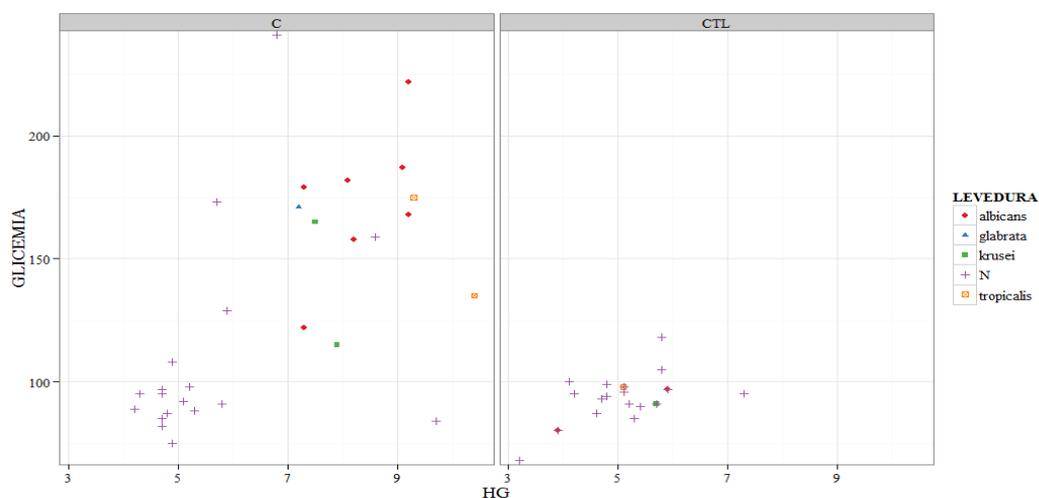
Dos indivíduos examinados (grupo caso e controle), 16 (26,7%) apresentaram leveduras do gênero *Candida* somente em regiões onde a sondagem de profundidade foi maior que 5 mm (gráfico 1).



**Gráfico 1** - Presença de leveduras de acordo com profundidade de sondagem e idade dos grupos da pesquisa

Fonte: dados da pesquisa

Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p = 0,006$  e  $0,005$  respectivamente) do que indivíduos não diabéticos (Gráfico 2; Tabela 5).



**Gráfico 2** - Espécies de *Candida* isoladas segundo valores de glicemia e hemoglobina glicada (HG), nos grupos caso (C) e controle (CTL), N= negativos.

Teste de Mann Whitney ( $p < 0,05$ )

Fonte: dados da pesquisa

**Tabela 5** - Presença de *Candida* spp. segundo valores de glicemia e Hemoglobina glicada de pacientes diabéticos e controle.

	Diabéticos		Controle	
	Glicemia > 126 HG > 7	Glicemia < 126 HG < 7	Glicemia > 126 HG > 7	Glicemia < 126 HG < 7
<i>Candida</i> (+)	12	-	-	4
<i>Candida</i> (-)	-	18	26	-

Teste de Mann Whitney

( $p$  valor = 0,06 e 0,05)

Fonte: dados da pesquisa

Os resultados expressos como valores de Pz médio para cada grupo foram analisados pelo teste estatístico de Mann-Whitney, em nível de significância de 5%.

Todos os isolados (grupo caso e controle) de *C. albicans* mostraram alta atividade de proteinase e fosfolipase. Os valores de Pz para atividade de proteinase dos isolados de *C. albicans* do grupo caso e controle variaram de 0,41-0,46 e 0,40-0,46, respectivamente, sendo os isolados fortemente positivos para a produção de proteinase, e os valores médios de Pz para atividade de fosfolipase dos grupos caso e controle variaram de 0,42-0,52 e 0,43-0,58, respectivamente, com alta atividade de fosfolipase.

Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de proteinase com valores de Pz variando de 0,61-0,69 e 0,69 nos grupos caso e controle, respectivamente, e Pz de 0,45-0,57 e 0,67 para atividade de fosfolipase nos grupos caso e controle, respectivamente. *C. krusei* tiveram atividade de proteinase com Pz valores de 0,69-0,79 e 0,77 nos grupos caso e controle, respectivamente, e não apresentaram atividade de fosfolipase. Já os isolados de *C. glabrata* apresentaram atividade de proteinase somente no grupo caso, com Pz valor de 0,63. Os isolados foram categorizados por seus níveis de produção de fosfolipase e proteinase. A atividade destas enzimas é mostrada na Tabela 6.

No presente estudo, não houve diferença estatística nas atividades de proteinase e fosfolipase dos isolados de *Candida* entre os grupos analisados (Figura 8).



**Figura 4** - *C. albicans* isoladas de pacientes diabéticos produtoras de fosfolipase em meio ASD enriquecido com gemas de ovos a 37°C após 72h

Fonte: o autor



**Figura 5** - *C. albicans* isoladas de pacientes diabéticos produtoras de proteinases em meio com albumina a 37°C após 7 dias.

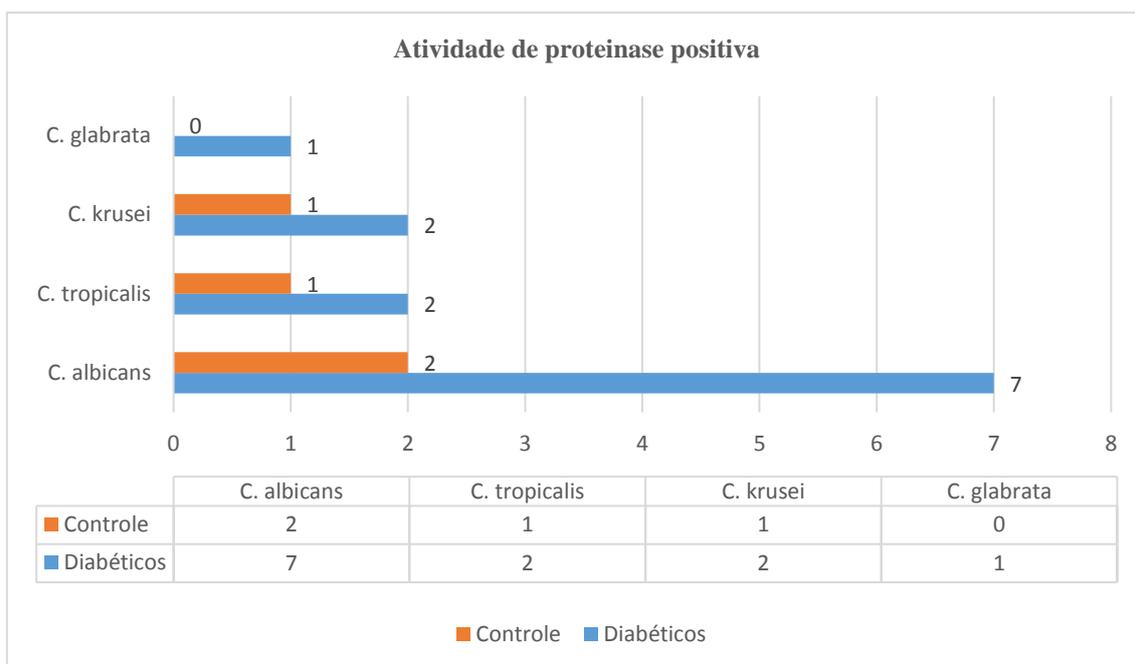
Fonte: o autor

**Tabela 6** - Valores de Pz obtidos nos testes de produção de proteinase e fosfolipase pelo isolados provenientes dos grupos diabéticos e controle

Espécies	Produção de enzimas (Pz valor)							
	Grupo caso		Grupo controle					
	n	fosfolipase	n	proteinase	n	fosfolipase	n	proteinase
<i>C. albicans</i>	7	0,42±0,10	7	0,41±0,05	2	0,43±0,15	2	0,43±0,03
<i>C. tropicalis</i>	2	0,45±0,12	2	0,61±0,05	1	0,41±0,13	1	0,69
<i>C. krusei</i>	2	1	2	0,69	1	1	1	0,77
<i>C. glabrata</i>	1	1	1	0,63	-	-	-	-

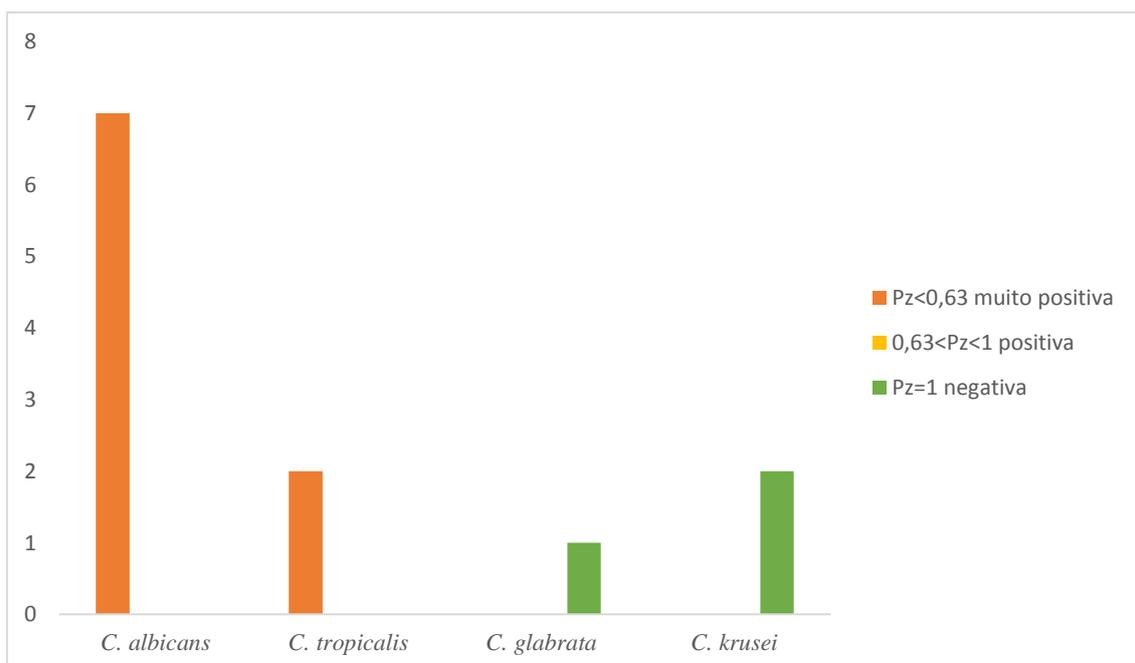
Nenhuma diferença estatisticamente significativa (p=0,269).

Fonte: dados da pesquisa



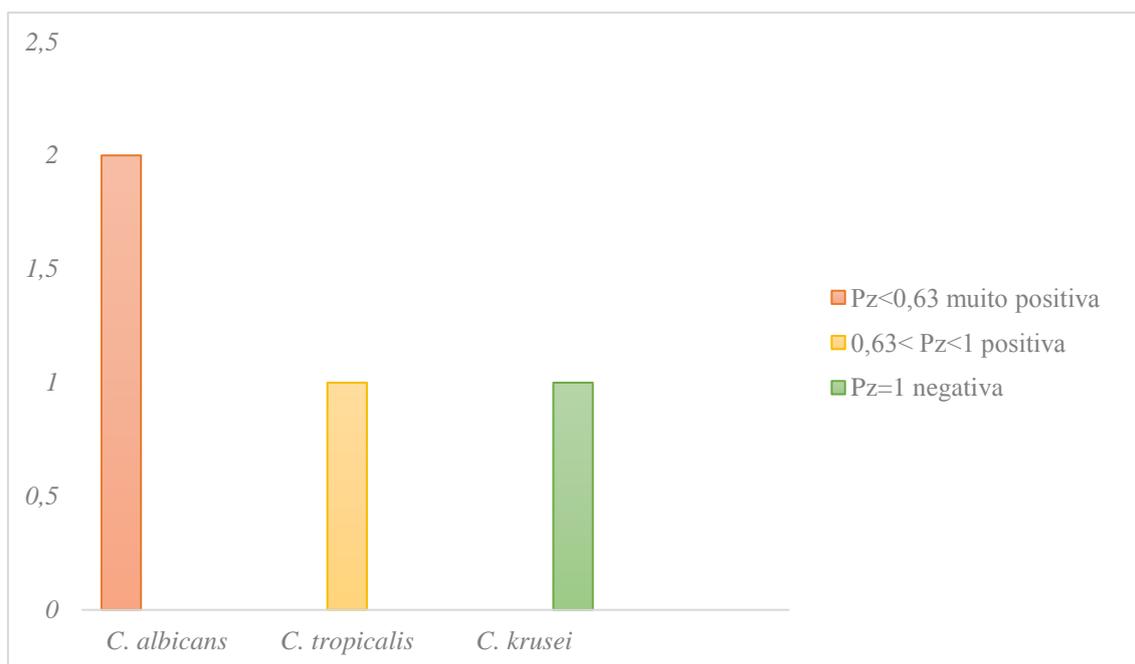
**Gráfico 3** - Distribuição das amostras de *Candida* provenientes da bolsa periodontal de pacientes diabéticos e controle segundo a atividade de proteinase.

Fonte: dados da pesquisa



**Gráfico 4** - Atividade de fosfolipase das espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de diabéticos

Fonte; dados da pesquisa



**Gráfico 5** - Atividade de fosfolipase das espécies de *Candida* isoladas de bolsas periodontais de pacientes do grupo controle.

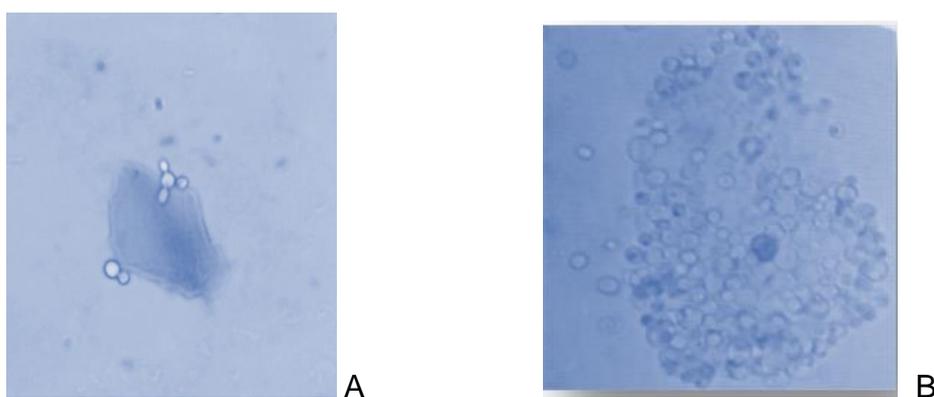
Fonte: dados da pesquisa

A capacidade de aderência dos isolados de *Candida* às células epiteliais está sumarizada na Tabela 7. Sete dos 9 (77,7%) isolados de *C. albicans* e dois dos 3 de *C. tropicalis* (66,7%) aderiram fortemente, enquanto que todos os isolados de *C. krusei* e um isolado de *C. glabrata* apresentaram fraco padrão de aderência. Não houve diferença significativa entre os grupos, apesar do maior número de isolados de espécies de *Candida* dos pacientes diabéticos apresentarem capacidade de adesão.

**Tabela 7** - Avaliação da capacidade de aderência à célula epitelial bucal (CEB) de isolados de *Candida* obtidos de bolsas periodontais de pacientes diabéticos e controle

Etiologia	Número médio de leveduras aderidas a 10 CEB + dp	
	Diabéticos	Controle
<i>C. albicans</i> <sup>xx</sup>	145±33	120±31
<i>C. tropicalis</i> <sup>xx</sup>	125±74	111
<i>C. krusei</i> <sup>0</sup>	17±11	44
<i>C. glabrata</i> <sup>0</sup>	41	SA

Alta aderência (xx), fraca aderência (0), SA= sem aderência  
dp= desvio padrão



**Figura 6** - Fraca aderência de *C. Krusei* (A) e alta aderência de *C. Albicans* (B) às células epiteliais orais. Ampliação: 40x

Fonte: dados da pesquisa

## DISCUSSÃO

*Candida* é o agente etiológico mais frequente de infecções fúngicas. Ela provoca infecções oportunistas principalmente em pacientes imunodeprimidos. Doenças como a diabetes mellitus, insuficiência renal, transplante de órgãos, e neutropenia são os principais fatores predisponentes para infecções por *Candida*.

A capacidade de produção de proteinase e de fosfolipase, aderência à superfície de células do hospedeiro, além de resistência aos antifúngicos são considerados importantes fatores de virulência para espécies de *Candida*, podendo desempenhar um papel essencial na capacidade de se estabelecer como um microrganismo infeccioso e colonizador (CALDERONE & FRONZI, 2001; YANG Y.L., 2003).

A produção de proteinase aumenta a capacidade de colonização e penetração no tecido hospedeiro, destruindo seu sistema imunitário. (KANTARCIOGLU e YUCEL, 2002). Enzimas lipolíticas, tais como fosfolipases, penetram na célula hospedeira aumentando a adesão às células epiteliais com consequente invasão do epitélio oral, favorecendo as infecções por *Candida* (TREVINO-RANGEL et al., 2013). Estudos anteriores confirmaram que a alta produção de fosfolipase está ligada a um maior grau de patogenicidade (MITROVIC et al., 1995; NIEWERT; KORTING, 2001).

Os isolados de *Candida albicans* e *C. tropicalis* produziram maior atividade de proteinase e fosfolipase que as demais espécies (Tabela 7). Esta observação concorda com os resultados de D'Eça Júnior et al. (2011) que comparando *in vitro* a produção enzimática de isolados de *Candida* spp., observaram que a maioria dos isolados de *Candida albicans* foram produtores de proteinase e fosfolipase e 91,7% dos isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de fosfolipase.

Neste trabalho, embora não estatisticamente significativo, os isolados de *C. albicans* produziram mais proteinase e fosfolipase do que espécies de *Candida* não-*albicans* sendo detectados em 100% de seus isolados. Estes resultados podem ser atribuídos à característica da cepa, concordando com o resultado de outros autores que observaram que *Candida albicans* apresentou um percentual significativamente maior de isolados produtores de proteinase e fosfolipase num estudo sobre a produção de fosfolipase e proteinase em isolados clínicos de várias espécies de *Candida* (KANTARCIOGLU E YUCEL, 2002; SILVA, J.O. et al., 2007).

No presente estudo não houveram diferenças estatísticas quanto aos fatores de virulência produzidos por isolados de *Candida albicans* entre indivíduos do grupo controle e em pacientes diabéticos, concordando com resultados obtidos por outros autores que apontaram variações de atividade enzimática entre 60% a 100% para proteinase e 50 a 100% para fosfolipase (SAMARANAYAKE et al., 2002; MANFREDI et al., 2006; KOMIYAMA et al. 2007; ARSLAN et al., 2016).

Entretanto, MANFREDI et al. (2006) demonstraram que a expressão de proteinase não é significativamente mais elevada em isolados de *Candida* de pacientes com diabetes quando comparados aos pacientes saudáveis e que pacientes com diabetes tipo 2 têm maiores níveis de proteinase do que os pacientes com diabetes tipo 1. No presente estudo, não houve diferença estatística nos níveis de proteinase e fosfolipase observados entre os pacientes diabéticos e não-diabéticos, concordando com outros autores (MANFREDI et al., 2006; ARSLAN et al., 2016).

Estudos relataram que 30 a 100% dos isolados orais de *C. albicans* produzem fosfolipases com graus variáveis de atividade enzimática (HANNULA et al., 2000; BARROS et al., 2008, SARDI et al., 2012). Em nossa pesquisa, uma alta atividade de fosfolipase e proteinase foi detectada em 100% dos isolados de *Candida albicans* de diabéticos, concordando com o estudo de TSANG et al., (2007), que encontraram uma alta atividade de proteinase em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

No nosso estudo, isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de proteinase e fosfolipase, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle. *C. krusei* apresentou positividade para proteinase e nenhuma atividade de fosfolipase entre os dois grupos de pacientes, e *C. glabrata* isolada do grupo de diabéticos apresentou somente atividade de proteinase.

Estas observações são em desacordo com os resultados obtidos por Rorig et al., (2009), que determinou que isolados de *C. albicans* apresentaram a maior produção enzimática e que as espécies *C. glabrata* e *C. parapsilosis* não revelaram atividade de fosfolipase e proteinase. Da mesma forma, um estudo realizado por Negri et al., (2010) observaram que apenas um isolado de *C. tropicalis* dos sete obtidos a partir de um cateter venoso central foi positivo para atividade de fosfolipase.

Neste trabalho, todos os isolados de *C. albicans* das bolsas periodontais dos dois grupos apresentaram uma atividade muito forte de fosfolipase e proteinase. As espécies de *Candida* não-*albicans* mostraram atividade de proteinase e média ou nenhuma atividade de fosfolipase. Contrariando esses resultados, Oksuz et al., (2007) estudaram amostras de *Candida* e verificaram que a maioria de espécies de *C. albicans* desenvolveram fortes atividades de enzimas. Dentre as espécies não-*albicans*, os isolados desenvolveram alta atividade de fosfolipase e baixa de proteinase.

*Candida tropicalis* é um patógeno conhecido por ser importante nas infecções nosocomiais (KOTHAVADE et al., 2011; NEGRI et al., 2010). Todos os isolados de *C. tropicalis* analisados no nosso estudo apresentaram atividade de proteinase e fosfolipase, enzimas consideradas como importante fator de virulência e que podem estar envolvidas na patogênese de espécies de *Candida albicans* (YAMAMOTO et al., 1992).

Os resultados para a *C. glabrata* indicam que esta espécie pode produzir proteinase, o que poderia estar relacionado à virulência dessa espécie. Estes dados são importantes e diferentes da maioria dos encontrados na literatura que afirmam que *C. glabrata* não produz níveis significativos de atividade de proteinase (KANTARCIOGLU & YUCEL, 2002; KAUR et al. 2005).

MANE et al. (2011) avaliaram a produção de enzimas de proteinase e fosfolipase de *C. albicans* e os resultados foram 89,7% e 59,0%, respectivamente. No nosso estudo, 100% dos isolados de *C. albicans* apresentaram atividade proteolítica e de fosfolipase, o mesmo sendo observado por outros autores (OLIVEIRA et al,1998; BOSCO et al, 2003; LYON e RESENDE, 2006). Todos esses fatores de virulência aumentam a patogenicidade da *Candida*, que poderia colaborar na progressão da doença periodontal, principalmente em pacientes imunodeficientes.

A adesão das células de *Candida* às células epiteliais bucais (CEB) é um fenômeno complexo e multifatorial que se baseia na expressão de diversos tipos de adesinas nas superfícies de células modificadas morfológicamente. Além disso, possuem a habilidade em formar biofilme sobre as células do hospedeiro resultando na estabilidade da aderência do fungo aos tecidos (KHAN, 2010).

No presente estudo, os isolados de *C. albicans* apresentaram maior adesão à célula epitelial bucal do que espécies de *Candida não-albicans*, contudo essa diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos analisados, concordando com estudo feito por Costa, (2009), que avaliou fatores de virulência e características moleculares de leveduras do gênero *Candida* isoladas de amostras do sangue, de cateter de pacientes nosocomiais e da cavidade bucal de pacientes HIV positivos, verificando que a capacidade de aderência à célula epitelial foi maior em *C. albicans* que *Candida não-albicans*, no entanto não houve diferença de comportamento entre os isolados obtidos dos diferentes locais estudados.

A alta habilidade de aderência apresentada por *C. albicans* pode indicar maior virulência quando comparadas às espécies de *Candida* não-*albicans*. A aderência pode ser considerada como processo multifatorial específico envolvendo vários tipos de adesinas na superfície das células de *Candida* além da variedade de sítios de ligação às células do hospedeiro (KENNEDY, 1988).

Outros estudos também demonstraram que espécies de *C. albicans* são mais aderentes às células epiteliais bucais que outras espécies de *Candida* (BIASOLI; TOSELLO; MAGARÓ, 2002; LYON; RESENDE, 2007; COSTA et al., 2010, DINIZ, 2011), entretanto há pouca informação sobre espécies menos patogênicas como *C. krusei* (SAMARANAYAKE et al., 1998). Em nossa pesquisa, isolados de *C. albicans* apresentaram maior mediana de adesão à célula epitelial bucal que os isolados de *Candida* não-*albicans*, entretanto não houve diferença estatística entre eles ( $p= 0,269$ ) provavelmente ao reduzido número de amostras. *Candida albicans* foi a que apresentou maior capacidade de adesão seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, corroborando com resultados de Lyon e Resende (2006). *C. krusei* é uma espécie pouco patogênica e com baixa capacidade de aderência (SAMARANAYAKE et al., 1998).

A baixa patogenicidade de *C. krusei* verificada em nossa pesquisa reflete uma habilidade reduzida em se aderir às células epiteliais bucais. Estudos realizados por Samaranayake et al. (1994) demonstraram que a aderência de *C. krusei* às células epiteliais bucais de indivíduos saudáveis foi 10 vezes menor que para *C. albicans*.

Samaranayake et al. (1998) avaliou a patogenicidade, colonização e infectividade de *C. krusei* e *C. albicans* na mucosa oral de ratos normais e imunocomprometidos, demonstrando que *C. albicans* foi capaz de colonizar línguas dos dois grupos de animais. *C. krusei* não foi capaz de infectar animais normais, entretanto provocou lesões extensas em ratos imunocomprometidos.

Uma revisão da literatura discutiu os avanços recentes no conhecimento de fatores de virulência de *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, especificamente os de adesão e formação de biofilme, que são componentes-chave na patogenicidade de espécies de *Candida*. Todas as espécies analisadas foram capazes de formarem biofilme, sendo menos extensos para *C. glabrata* em comparação com *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O estudo demonstrou que a capacidade de formação do

biofilme, a estrutura e composição da matriz são altamente dependentes das espécies (SILVA, S. et al., 2011).

Apesar dos resultados desse trabalho não indicarem diferenças estatisticamente significativas na maior produção de fosfolipase e proteinase por cepas de *C. albicans* provenientes de pacientes diabéticos com periodontite, tais enzimas são consideradas importantes na invasão tecidual (GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990; NIEWERTH e KORTING, 2001), e este pode ser um dado importante para o entendimento do papel das leveduras do gênero *Candida* na patogênese da doença periodontal em diabéticos.

## CONCLUSÕES

1. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de bolsas periodontais de 12 (40%) dos pacientes diabéticos, sendo *C. albicans* a espécie mais frequente (23,3%), seguindo-se *C. krusei* (6,7%), *C. tropicalis* (6,7%) e *C. glabrata* (3,3%).
2. No grupo controle foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 13,3% dos pacientes sendo *C. albicans* a mais prevalente (6,7%), seguido de *C. krusei* (3,3%) e *C. tropicalis* (3,3%), havendo diferença estatística entre os grupos ( $p=0,041$ ).
3. Indivíduos diabéticos com glicemia e hemoglobina glicada elevadas apresentaram uma percentagem significativamente mais elevada de leveduras nas bolsas periodontais ( $p = 0,006$  e  $0,005$  respectivamente) do que indivíduos não diabéticos.
4. Todos os isolados (grupo caso e controle) de *C. albicans* mostraram atividade de proteinase, fosfolipase e aderência às células epiteliais.
5. Os isolados de *C. tropicalis* apresentaram atividade de proteinase e fosfolipase e moderada aderência nos dois grupos, *C. krusei* apresentou positividade para proteinase somente nos diabéticos, pouca aderência e nenhuma atividade de fosfolipase entre os dois grupos, e *C. glabrata* apresentou somente atividade de proteinase no grupo de diabéticos.

Considerando-se a colonização e o desenvolvimento de fatores de virulência das cepas de *C. albicans* e *não-albicans* isoladas, poderíamos sugerir uma correlação entre a produção desses fatores e sua patogenia, principalmente se isoladas de indivíduos diabéticos considerados clinicamente imunocomprometidos. A presença de fatores de virulência nas amostras isoladas de bolsas periodontais de pacientes diabéticos sugere a

importância do estudo sistemático desses fatores, visto que a periodontite pode ser o foco de disseminação de infecções profundas.

## REFERÊNCIAS

ARSLAN S.; KOÇ A.N.; ŞEKERCI A.E.; TANRIVERDI F.; SAV H.; AYDEMIR G.; DIRI H. *Genotypes and virulence factors of Candida species isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus.* **Turk J Med Sci.** (2016) 46(1):18-27. <http://dx.doi.org/10.3906/sag-1405-73>

BARBOSA VS; GOMES VP; PETILLO CR; CANABARRO A. Presença de *Candida sp.* em sítios doentes e saudáveis em pacientes com Periodontite Crônica. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** [online]. 2014, vol.68, n.2, pp. 160-164. ISSN 0004-5276.

BOSCO VL, BIRMAN EG, CURY AE, PAULA CR. *Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance.* **Pesqui Odontol Bras.** 17: 217-222, 2003.

CHAVES GM; DINIZ MG; DA SILVA-ROCHA WP. et al. *Species Distribution and Virulence Factors of Candida spp. Isolated from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients in Brazil.* **Mycopathologia** (2013) 175: 255

COLOMBO AL, GUIMARAES T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 599-607, 2003.

COSTA IC; FELIPE I; GAZIRI LCJ. Resposta imune a *Candida albicans.* **Ciências Biológicas e da Saúde.** 2008; 29 (1): 27-40

COSTA RC. Fatores de virulência de isolados de *Candida* de pacientes imunocomprometidos. caracterização molecular de *Candida albicans* suscetíveis e resistentes ao fluconazol. Tese de Doutorado, Goiânia, 2009.

9. COSTA KRC, FERREIRA JC, KOMESU MC, CANDIDO RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. **Mycopathologia** 167: 73-79, 2010.

D'EÇA JUNIOR A. et al. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida.* **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online]. 2011, vol.44, n.3, pp.334-338. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037->

DOUGLAS, CR. Patofisiologia oral: fisiologia normal e patológica aplicada à Odontologia e Fonoaudiologia. São Paulo: Pancast; 1988. 288 p.

FONSECA JB. Candidíase: Aspectos de interesse odontológico. Candidíase. 1ed., São Paulo: Edusp., 1980.

FOTEDAR R; AL-HEDAITHY SSA. *Comparison of phospholipase and proteinase activity in Candida albicans and C. dubliniensis.* **Mycoses**, 48: 62–67  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01057.x>

GHANNOUM MA, ABU-ELTEEN KH. *Pathogenicity determinants of Candida.* **Mycoses**, 33: 265-282, 1990.

KANTARCIOGLU AS, YUCEL A. *Phospholipase and protease activity in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains.* **Mycoses** 5: 160-165, 2002.

KAUR R, DOMERGUE R, ZUPANCIC ML, CORMACK MB. **Curr Opin Microbiol.** 2005; 8:378-384.

KENNEDY, MJ. *Adhesion and association mechanisms of Candida albicans.* **Curr Top Med Mycol.** 1988; 2: 73–169.

KIM, J; SUDBERY, P. *Candida albicans, a major human fungal pathogen.* **J Microbiol.** (2011) 49: 171. doi:10.1007/s12275-011-1064-7

KIMURA HL; PEARSALL NN. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Infect Imunn.** 1978; 21:64-68.

KOMIYAMA EY, SANTOS SSF, JORGE AOC, MARTINS CAP, KOGA-ITO CY. Produção de exoenzimas por amostras de *Candida albicans* isoladas de pacientes com periodontite crônica e indivíduos-controle. Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo 2007 set-dez; 19(3):288-92

KOTHAVADE R, KURA MM, VALAND AG, PANTHAKI MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **J Med Microbiol.** 2010; 59:873-880.

LIMA NETO RG; NEVES RP. Capacidade de aderência às células epiteliais da cavidade oral e perfil histoquímico de culturas de *Candida* estocadas na Micoteca URM. Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

LOBERTO JCS, MARTINS CAS, SANTOS SSF, CORTELLI JR, JORGE AOC. *Staphylococcus* spp. In the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. **Brazilian Journal of Microbiology** 2004; 35 (1-2).

MACÊDO DPC, SILVA VKA, FARIAS AMA, MELO LRB, WILHEIM AB, NEVES RP. *Candida glabrata* esophagitis: new case reports and management. **Brazilian Journal of Microbiology** 39: 1-7, 2008.

MANFREDI M, MCCULLOUGH M.J., VESCOVI P, AL-KAARAWI Z.M., POSTER S.R. *Update on diabetes mellitus and related oral diseases*. **Oral Dis**. 2004; 10: 187–200.

NAGLIK, J.R.; NEWPORT, G.; WHITE, T.C.; FERNANDES-NAGLIK, L.L.F. et al. *In Vivo Analysis of Secreted Aspartyl Proteinase Expression in Human Oral Candidiasis*. **Infection and Immunity**, May (1999), p. 2482–2490.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(3), 400–428, 2003. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>

10. NEVES RP, CAVALCANTI MAQ, CHAVES GM, MAGALHÃES OMC. *Yeasts isolated from clinical samples of AIDS patients*. **Brazilian Journal of Microbiology** 33: 363-364, 2002.

NEGRI M, MARTINS M, HENRIQUES M, SVIDZINSKI TIE, AZEVEDO J, OLIVEIRA R. *Examination of potential virulence factors of Candida tropicalis clinical isolates from hospitalized patients*. **Mycopathologia** 2010; 169:175-182.

NIEWERTH M, KORTING HC. *Phospholipases of Candida albicans*. **Mycoses**, 2001 Nov; 44(9-10): 361-7.

OKSUZ S, SAHIN I, YILDIRIM M, GULCAN A, YAVUZ T, KAYA D, et al. *Phospholipase and proteinase activities in different Candida species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults*. **Jpn. J Infect Dis**. 2007: 60:280-283.

PIRES MFC, CORREA B, GAMBALE W, PAULA CR. *Experimental model of Candida albicans (serotypes A and B) adherence in vitro*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 32: 163-169, 2001.

PRICE MF, WILKINSON ID, GENTRY LO. *Plate methods for detection of phospholipase activity in Candida albicans*. Saboraudia 1982; 20:7-14.

RINDUM J.L., STENDERUP A, HOLMSTRUP P. *Identification of Candida albicans types related to healthy and pathological oral mucosa*. **J Oral Pathol Med**. 1994; 23: 406–412.

RORIG KCO, COLACITE J, ABEGG MA. *Production of virulence factors in vitro by pathogenic species of the genus Candida*. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2009; 42:225-227.

RUCHEL J, TEGELER R, TROST MA. *Comparison of secretory proteinases from different strains of Candida albicans*. Sabouraudia 20:233-244, 1982.

SAMARANAYAKE LP, FIDEL PL, NAGLIK JR, SWETT SP, TEANPAISAN R, COOGAN MM, et al. *Fungal infections associated with HIV infection*. **Oral Dis**. 2002 Jul; 8(2):151-60.

SILVA JO, FERREIRA JC, CANDIDO RC. *Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de Candida sp*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40: 354-355, 2007.

SILVA S, NEGRI M, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, WILLIAMS DW, AZEREDO J. *Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance*. **FEMS Microbiology Reviews** Mar 2012, 36 (2) 288-305. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>

SOBEL JD, MYERS PG, KAYE D, LEVISON ME. *Adherence of Candida albicans to Human Vaginal and Buccal Epithelial Cells*. **J Infect Dis**. (1981) 143 (1): 76-82. doi:10.1093/infdis/143.1.76

TREVINO-RANGEL RJ, GONZÁLEZ JG, GONZÁLEZ GM. *Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the Candida parapsilosis species complex*. **Med Mycol**. 2013; 51:331-335.

TAN WC; TAY FBK; LIM LP. *Diabetes as a risk factor for periodontal disease: current status and future considerations*. *Diabetes and periodontal diseases*. Ann Academy of Medicine, v. 35, n. 8, p. 571-81, 2006.

VERARDI G, LUPATINI AL, BELTRAME JC, TRENTIN MS, SILVA SO, CARLI JP, LINDEN MSS. Doença periodontal e diabetes melito tipo 2. **Revista Odonto** • v. 17, n. 34, jul./dez. 2009, São Bernardo do Campo, SP, Universidade Metodista de São Paulo p: 93-99.

6. VERNILLO A.T. *Diabetes mellitus: relevance to dental treatment*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2001; 91: 263–270.

YAMAMOTO T, NOHARA K, UCHIDA K, YAMAGUCHI H. *Purification and characterization of secretory proteinase of Candida albicans*. **Microbiol Immunol**. 1992; 36:637-641.

YAN, L; YANG, C; TANG, J. *Disruption of the intestinal mucosal barrier in Candida albicans infections*. **Microbiological Research**. (2013) 168: 389–395

YANG YL. *Virulence factors of Candida species*. **Journal of Microbiology Immunology and Infection** 36: 223-228, 2003.

WANG J, OHSHIMA T, YASUNARI U, NAMIKOSHI S, YOSHIHARA A, MIYAZAKI H, MAEDA N. *The carriage of Candida species on the dorsal surface of the tongue: the correlation with the dental, periodontal and prosthetic status in elderly subjects*. **Gerodontology** 2006; 23: 157–163.

WEHBA, C.; RODRIGUES, A. S.; SOARES, F. P. *Diabete e doença periodontal: uma relação bidirecional*. In:BRUNETTE, CM. *Periodontia médica: uma abordagem integrada*. São Paulo: Senac; 2004. p. 171-84.

## APÊNDICE

### 1) Meio Ágar Sabouraud Dextrose (LACAZ et al., 2002)

Dextrose (Synth).....	40g
Peptona (Merk).....	10g
Ágar bacteriológico (Difco).....	15g
Água destilada.....	1000 ml

Distribuir em tubos 20x200 mm e autoclavar a 121° C durante 15 minutos. A seguir, solidificar na posição inclinada de 45°. Conservar em geladeira a 4°C.

### 2) CHROMagar *Candida* (ODDS e BERNAERTS, 1994)

Mistura cromogênica.....	22g
Peptona (Merk).....	10,2g
Cloranfenicol.....	0,5g
Ágar bacteriológico (Difco).....	15g
Água destilada.....	1000ml

Dissolver 47,7g da mistura em 1000 ml de água destilada aquecida, e após homogeneização, distribuir 20 ml em placas de Petri (90mm de diâmetro).

Conservar em geladeira a 4° C.

### 3) Ágar fosfolipase (PRICE et al., 1982)

Peptona (Merk).....	10g
Glicose (Isofar).....	20g
Cloreto de Cálcio (Reagen).....	0,55g
Cloreto de sódio (Reagen).....	57,3g
Ágar bacteriológico (Difco).....	20g
Emulsão de gema de ovo a 50%.....	160ml
Água destilada.....	1000ml

Adicionar os componentes em balão volumétrico, acrescentar água destilada, esterilizar em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Adicionar 160ml de emulsão de ovo a 50% (80g de gema de ovo homogeneizada com 80ml de solução fisiológica esterilizada). Distribuir em placas de Petri (90mm de diâmetro), e conservar em geladeira a 4°C.

### 4) Ágar proteinase (RUCHEL et al., 1982)

YCB- Yeast Carbon Base (Difco).....	11,7g
Albumina Bovina Fração V (Sigma).....	2g
Ágar bacteriológico (Difco).....	20g
Protovit (Roche).....	2,5g
Água destilada.....	1000ml

Dissolver os componentes num béquer com água destilada e esterilizar por filtração utilizando membrana Millipore de 0,22 $\mu$ m. A seguir, acrescentar o protovit e a albumina ao ágar bacteriológico adicionado de YCB e água destilada previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Distribuir em placas de Petri (90mm de diâmetro) e conservar em geladeira a 4°C.

#### 5) Solução fisiológica (NaCl 0,9%)

Cloreto de sódio.....	0,85g
Água destilada.....	100ml

Adicionar o cloreto de sódio na água destilada e homogeneizar. Distribuir em tubos de 10x75mm e autoclavar a 121°C durante 15 minutos e conservar em geladeira a 4°C.

#### 6) PBS (tampão sulfato salino)

Cloreto de sódio .....	8g
Cloreto de Potássio .....	0,2g
Fosfato de Sódio dibásico .....	1,44g
Fosfato monobásico de Potássio .....	0,24g
Água destilada .....	800 mL

Adicionar os componentes na água destilada e homogeneizar. Completar o volume para 1L adicionando água destilada. Ajustar o pH à 7,4 com HCL e autoclavar a 121°C durante 15 minutos e conservar em geladeira a 4°C.

## ANEXOS

### 1. AUTORIZAÇÃO PLATAFORMA BRASIL

-

#### DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da prevalência e do perfil de virulência de *Candida* spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2

**Pesquisador Responsável:** Cristiano Silva Pontes

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 46940315.7.0000.5020

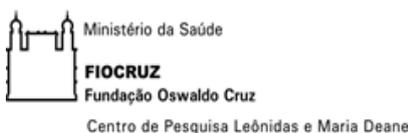
**Submetido em:** 24/07/2015

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazonia

**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado

**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável

## 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE (CPqLMD-FIOCRUZ)

**Projeto: Avaliação da prevalência e dos fatores de virulência de *Candida* spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2.**

Pesquisador Responsável: Cristiano Silva Pontes ( pontescs@uol.com.br)

Endereço: Instituto Leônidas e Maria Deane (CPqLMD-FIOCRUZ)

Rua Terezina, 476. Adrianópolis. Manaus - AM. CEP: 69.057-070. Tel.: +55 (92) 3621-2323.

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Avaliação da prevalência e do perfil de virulência de *Candida* spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2”.

Neste estudo pretendemos avaliar a prevalência e o perfil de virulência de espécies de *Candida* bucais na região periodontal de portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2.

O motivo que nos leva à pesquisa é a carência de estudos sobre a distribuição desses micro-organismos na doença periodontal de indivíduos imunocomprometidos, principalmente em diabéticos.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de anamnese, solicitação de exames hematológicos de glicemia e hemoglobina glicada na rede de saúde do município de Manaus, exame clínico periodontal, enxagues bucais, uso de Swabs e pontas de papel absorvente estéreis para a coleta de material.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua recusa em participar não acarretará

qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-5130. Qualquer outra informação, poderá contactar o pesquisador no Ceo-UEA, Rua Celettra 4, Adrianópolis, Manaus-AM, CEP 69057-150, TEL.: 092-3236-6758.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no Centro de Especialidade Odontológica da Universidade do Estado do Amazonas e a outra será fornecida a você. Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos do estudo “Avaliação da prevalência e do perfil de virulência de *Candida* spp. bucais isoladas de pacientes portadores de doença periodontal e diabetes tipo 2”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Manaus, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

Nome Assinatura participante Data

Nome Assinatura pesquisador Data

Nome Assinatura testemunha Data

### 3. QUESTIONÁRIO DE PESQUISA

Nome:

Data de nascimento:                      Idade:                      Sexo: fem ( ) masc ( )

Diabético: sim ( ) não ( )

Medicamentos em uso para diabetes:

Outros medicamentos em uso:

Faz acompanhamento médico: sim ( ) não ( )

Última visita ao dentista:

Fez tratamento periodontal: sim ( ) não ( )

Fuma: sim ( ) não ( )

Usou antibiótico nos últimos 6 meses? sim ( ) não ( )

Usou antifúngicos nos últimos 6 meses? sim ( ) não ( )

Outra imunossupressão que não seja diabetes? sim ( ) não ( ) Qual?

#### RESULTADOS LABORATORIAIS

Data do exame:

Glicemia em jejum:

Hemoglobina glicada:

#### Tabela de registro do CPI.

<b>17/16</b>	<b>11</b>	<b>26/27</b>
<b>46/47</b>	<b>31</b>	<b>36/37</b>

# 4. FICHA PERIODONTAL

## Anexo 1 – Ficha e Formulário



# Ficha de Exame

EXAMINADOR

ORIG/DUP

---

Nº IDENTIFICAÇÃO

MUNICÍPIO

SETOR CENSITÁRIO

DOMICÍLIO

**INFORMAÇÕES GERAIS**

Idade em anos

Sexo

1- Masculino  
2- Feminino

Cor/Raça

1- Branca 4- Parda  
2- Preta 5- Indígena  
3- Amarela

Realização do Exame

1- Realizado  
2- Não realizado- falta de autorização  
3- Não realizado- autorizado mas não permitido  
4- Não realizado – ausência do morador  
5- Não realizado por outras razões

---

**EDENTULISMO**

USO DE PRÓTESE

Sup  Inf

0- Não usa  
1- Usa uma Ponte Fixa (PF)  
2- Usa mais do que uma PF  
3- Usa Prótese Parcial Removível (PR)  
4- Usa 1 ou mais PF e 1 ou mais PR  
5- Usa prótese Total  
9- Sem informação

(15-19, 35-44 e 65 anos e mais)

NECESSIDADE DE PRÓTESE

Sup  Inf

0- Não necessita  
1- Necessita de 1 PF ou PR (1 elemento)  
2- Nec. De 1 PF ou PR (mais de 1 elemento)  
3- Nec. De uma combinação de próteses (PF e/ou PR para 1 ou mais de 1 elemento)  
4- Nec. de 1 Prótese Total  
9- Sem Informação

---

**CONDIÇÃO DA OCLUSÃO DENTÁRIA (15- 19 anos)**

Overjet maxilar Anterior em mm

Overjet mandibular Anterior em mm

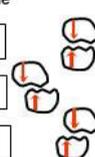
Mordida aberta vertical anterior em mm

Relação molar ântero-posterior

0- Normal  
1- Meia Cúspide  
2- Cúspide Inteira

Angle

0- Classe I  
1- Classe II  
2- Classe III



---

**CÁRIE DENTÁRIA E NECESSIDADE DE TRATAMENTO**

(15-19, 35-44 e 65 anos e mais)

	18	17	16	15	14	13	12	11		21	22	23	24	25	26	27	28
COROA	<input type="text"/>	●	<input type="text"/>														
TRAT.	<input type="text"/>		<input type="text"/>														
	48	47	46	45	44	43	42	41		31	32	33	34	35	36	37	38
COROA	<input type="text"/>	●	<input type="text"/>														
TRAT.	<input type="text"/>		<input type="text"/>														

0- Coroa Hígida  
1- Coroa Cariada  
2- Restaurada mascarada  
3- Restaurada sem cárie  
4- Dente perdido devido à cárie

5- Dente Perdido por Outra razão  
6- Dente com selante  
7- Apoio de Ponte ou Coroa  
8- Coroa não erupcionada  
T- Trauma 9- Excluído

0- Nenhum Tratamento  
1- Restauração uma superfície  
2- Restauração de 2 ou mais superfícies  
3- Coroa por qualquer razão  
4- Faceta Estética

5- Tratamento Pulpar ou Restauração  
6- Extração  
7- Remineração de Mancha Branca  
8- Selante  
9- Sem Informação

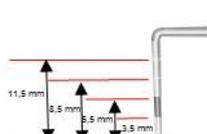
---

**CONDIÇÃO PERIODONTAL**

0- Normal  
1- Sangramento a sondagem  
2- Cálculo  
3- Bolsa de 4 a 5 mm  
4- Bolsa 6 ou mais mm  
X- Ausência

	17/16		
	11		
	27/26		
	37/36		
	31		
	47/46		

SANGRAMENTO GENGIVAL      Cálculo Dentário      Bolsa Periodontal



## 5. Autorização CEO-UEA



Governo do Estado do Amazonas  
**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**Escola Superior de Ciências da Saúde - UEA**  
**Policlínica Odontológica da UEA**



Processo 2015/00021176

### AUTORIZAÇÃO

Autorizamos o atendimento dos pacientes do projeto de pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA E DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA* spp. BUCAIS ISOLADAS DE PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA PERIODONTAL E DIABETES TIPO 2", coordenado pelo pesquisador Cristiano Silva Pontes, podendo para tal fim utilizar as dependências e equipamentos do Centro de Especialidades Odontológicas-CEO-UEA.

Manaus, 13 de agosto de 2015

  
 Marco Fiori Junior

Prof. Marco Fiori Junior  
 Diretor da Policlínica Odontológica da UEA  
 da Universidade do Estado do Amazonas

  
 Prof. Shirley Maria de Araújo Passos  
 Gerente CEO/UEA  
 Shirley Maria de Araújo Passos

Gerente do Ceo-UEA

Av Codajás esq c/ Presidente Castelo Branco,1780 Cachoeirinha CEP: 69065-015

(92) 3878-7850/3878-7860/3878-7862

www.uea.edu.br