

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

ECOLOGIA DE LEVEDURAS DA CAVIDADE BUCAL DE PESSOAS
SAUDÁVEIS: DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL

Carla Zanelatto

Biomédica – CRBM5 0276

Dissertação requisito para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente

Orientadora: Patrícia Valente
Co-orientadora: Maria Lúcia Scroferneker

PORTO ALEGRE, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.
JUNHO, 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, às três mulheres que tornam possível este trabalho.

À Professora **Patrícia Valente da Silva**, que pacientemente aceitou minha retomada do curso após desligamento, sempre compreensiva, disposta e flexível. Agradeço também tantos conhecimentos transmitidos.

À Professora **Maria Lúcia Scroferneker**, pela sensibilidade de respeitar minhas limitações de distância e oferecer apoio incondicional na execução do trabalho, muitas vezes sacrificando as próprias pesquisas em andamento no seu laboratório.

À **Ana Lúcia Zanelatto Lenhard**, pelo incentivo e amor contínuos e por viabilizar o aproveitamento do curso conciliando com as atividades profissionais.

Também não poderia deixar de reconhecer o comprometimento dos colegas de laboratório, especialmente **Paula Mattanna, Maurício Ramirez, Tatiane Daboit e Daiane Heidrich**, que auxiliaram na parte prática deste trabalho.

Aos **familiares e amigos** que me acompanharam nessa jornada estudantil, me reservo o prazer de agradecer pessoalmente todo apoio.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de aumentar meu conhecimento específico e estar em contato com alguns dos melhores profissionais do Estado.

ECOLOGIA DE LEVEDURAS DA CAVIDADE BUCAL DE PESSOAS SAUDÁVEIS: DIVERSIDADE DE ESPÉCIES E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL

Autor: Carla Zanelatto
Orientadora: Prof. Dra Patrícia Valente da Silva
Co-orientadora: Prof. Dra Maria Lúcia Scroferneker

¹ RESUMO

Para melhor compreender o papel dos micro-organismos nas doenças da cavidade bucal, é necessário inicialmente avaliar a diversidade microbiana naturalmente existente em indivíduos saudáveis, além de sua distribuição espacial na cavidade bucal. Muitos estudos são conduzidos elucidando o papel do biofilme e das bactérias na saúde bucal, porém poucas pesquisas focaram na atuação das leveduras. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade e distribuição de leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal de indivíduos saudáveis. Foram coletadas amostras da boca pacientes adultos saudáveis. Foram obtidas amostras de 9 diferentes habitats da boca: bochechas direita e esquerda, assoalho da boca, palato, língua dorsal, língua ventral, dente molar, vestibulo labial e saliva. Foram avaliados 100 pacientes com uma média de 28 dentes. Quarenta e nove indivíduos apresentaram leveduras na sua microbiota bucal. *Candida albicans* foi o micro-organismo mais prevalente (49%), seguido de *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*. A associação das leveduras encontradas e os habitats bucais sugeriu que comunidades leveduriformes podem distinguir-se entre os diferentes tecidos da cavidade bucal. A língua (dorsal e ventral) apresentou colonização específica, caracterizada pelas espécies *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. De forma semelhante, a microbiota dos habitats revestidos por mucosa foi análoga. A microbiota da língua e dos tecidos duros assemelhou-se entre si em menor intensidade. Estes resultados introduzem a dimensão espacial desta diversidade microbiana que vem sendo estudada, complementando as informações obtidas nos estudos do microbioma humano.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Junho, 2015.

YEAST ECOLOGY OF THE ORAL CAVITY FROM HEALTHY PEOPLE: SPECIES DIVERSITY AND SPATIAL DISTRIBUTION

Author: Carla Zanelatto

Advisor: Prof. Dra Patrícia Valente da Silva

Co-advisor: Prof. Dra Maria Lúcia Scroferneker

¹ ABSTRACT

To better understand the role of microorganisms in the diseases of the oral cavity, first it is necessary to evaluate the natural microbial diversity in healthy individuals, as well as their spatial distribution in the oral cavity. Many studies are conducted elucidating the role of biofilms and bacteria in oral health, but few research has focused on the yeast's performance. In this sense, the objective of this study was to evaluate the diversity and distribution of *Candida* species in the oral microbiota of healthy individuals. Samples were collected from the mouth of healthy adults. Samples of 9 different mouth habitats were obtained: right and left cheeks, floor of the mouth, palate, dorsal tongue, ventral tongue, molar tooth, labial vestibule and saliva. We evaluated 100 patients with an average of 28 teeth. Forty-nine subjects had yeasts in their oral microbiota. *Candida albicans* was the most prevalent microorganism (49%), followed by *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*. The association found between the yeasts and oral habitats suggested that communities can be distinguished by the different tissues of the oral cavity. The tongue (dorsal and ventral) presented specific colonization, characterized by the species *C. tropicalis*, and *C. dubliniensis*. Similarly, the microbiota of the mucous habitats was similar. The microbiota of the tongue and hard tissue resembled each other in a lesser degree. These results introduce the spatial dimension of the microbial diversity that has been studied, complementing the information obtained in the human microbiome research.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. June, 2015.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE FIGURAS	I
RELAÇÃO DE TABELAS	II
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	III
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
2.1 Microbioma bucal	12
2.2 Fisiopatologia do gênero <i>Candida</i> no ambiente bucal	17
2.3 Identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i>	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Amostragem e coleta	25
3.2 Isolamento das leveduras	26
3.2.1 Identificação molecular	27
3.3 Controle de qualidade	28
3.4 Análise estatística	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Grupo amostral e variabilidade de espécies	32
4.2 Associações e distribuição no ambiente bucal	36
4.2.1 Cluster 1 – saliva, palato / assoalho + bochechas, vestibulo	41
4.2.2 Cluster 2 – língua e molar	44
4.3 Carga leveduriforme	46
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7. ANEXOS	59
8. VITA	70

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1.	Estágios ecológicos do estabelecimento da comunidade microbiana na cavidade bucal	11
Figura 2.	Representação de comunidades microbianas comensais e patogênicas	14
Figura 3.	Representação do desenvolvimento da colonização dos habitats bucais	15
Figura 4.	Interações entre micro-organismos na boca de pacientes infectados e não infectados pelo HIV	21
Figura 5A.	Representação das leveduras do gênero <i>Candida</i> nos habitats da boca avaliados: bochecha direita e último molar	36
Figura 5B.	Representação das leveduras do gênero <i>Candida</i> nos habitats da boca avaliados: bochecha esquerda, língua dorsal e saliva	37
Figura 5C.	Representação das leveduras do gênero <i>Candida</i> nos habitats da boca avaliados: palato, língua ventral, assoalho da boca e vestíbulo	37
Figura 6.	Dendograma gerado pela análise de agrupamento mensurando a semelhança entre espécies de micro-organismos, abundância e os habitats do ecossistema bucal	40
Figura 7.	Colonização total em homens e mulheres	47
Figura 8.	Relação entre o número de colônias de <i>Candida</i> spp entre usuárias e não usuárias de anticoncepcional oral	49

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1.	Principais espécies fúngicas isoladas da cavidade bucal humana	16
Tabela 2.	Fatores de virulência associados à <i>Candida albicans</i>	20
Tabela 3.	Identificação das espécies de leveduras conforme coloração das colônias em Chromagar Candida	27
Tabela 4.	Descrição do grupo amostral	32
Tabela 5.	Percentual médio das frequências encontradas de <i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. krusei</i> no ecossistema bucal em relação ao número de colônias isoladas em cada habitat	39
Tabela 6	Média do número colônias isoladas em cada habitat, de acordo com o gênero	47

LISTA DE ABREVIATURAS

% - valor percentual

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

GYP – Meio de cultura baseado em glicose, extrato de levedura e peptona

DNA – Ácido desoxirribonucléico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UPGMA – técnica de análise de grupamento

RNA - Ácido ribonucléico

SOP – Síndrome dos Ovários Policísticos

1. INTRODUÇÃO

A superfície da cavidade bucal possui uma área de aproximadamente 215 cm², com superfícies mucosas e duras contendo diferentes tipos de epitélio. Estas diferentes superfícies propiciam substratos para a formação de biofilmes microbianos, compostos por misturas de espécies de bactérias e leveduras, sendo irrigadas pela saliva, que atua como fonte de nutrientes para os micro-organismos e também como veículo de disseminação dos mesmos (Mager et al., 2003; Socransky & Haffajee, 2005).

Alguns dos trabalhos mais influentes sobre ecologia microbiana na cavidade bucal foram conduzidos por um grupo de pesquisadores que, focando em bactérias, propuseram uma classificação destes micro-organismos encontrados na cavidade bucal em grupos designados por cores. Essa classificação foi inicialmente proposta por Socransky et al. (1998) durante o estudo de complexos bacterianos em placa subgengival, na tentativa de definir as comunidades bacterianas utilizando técnicas de *clustering* (UPGMA) e de ordenação (análise de componentes principais e análise de correspondência). As espécies de bactérias foram divididas em cinco grupos principais, sendo que dois deles correlacionavam com quadros clínicos de periodontite (bactérias dos grupos laranja e vermelho). A abordagem da ecologia de comunidades

microbianas na cavidade bucal baseada na interação entre complexos de espécies facilitou enormemente a compreensão do papel das bactérias no ecossistema bucal.

Este trabalho foi muito bem aceito pela comunidade científica e o grupo do Dr. Socransky estendeu as análises para placas supra gengivais (Haffajee et al., 2008), chegando à mesma conclusão de que as espécies de bactérias encontradas podiam ser agrupadas em grupos designados por cores, porém neste trabalho os autores detectaram a presença de seis complexos de espécies.

Apesar de existirem propostas de esquemas de classificação de bactérias em grupos correlacionados com o grau de associação com doenças periodontais, o mesmo não ocorre com as leveduras. Existem poucos estudos experimentais abordando o papel das leveduras na patogênese das infecções bucais.

Ao contrário do grande conhecimento acerca da composição de espécies de bactérias que fazem parte da microbiota normal da cavidade bucal, pouco é conhecido sobre as leveduras. É geralmente aceito que 50% dos indivíduos são portadores de *Candida albicans* na sua forma comensal (Williams et al., 2011). Segundo Sanitá et al. (2011), os níveis de glicose na saliva de pacientes favorecem o crescimento de leveduras, aumentando a aderência de *C. albicans*.

A retenção do micro-organismo na boca é promovida pela aderência às superfícies mucosas causada pela hidrofobicidade da superfície celular da levedura e presença de adesinas. *C. albicans* isoladas de pacientes com

periodontite crônica demonstraram maior aderência a células epiteliais do que *C. albicans* isoladas de pacientes saudáveis (Machado et al., 2010). Por outro lado, Barbot et al. (2011) observaram que a saliva promoveu a sobrevivência e o crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em água da torneira, demonstrando que é um fator importante para a colonização por leveduras.

Os escassos registros na literatura que reportam a presença de leveduras na cavidade bucal humana têm como foco pacientes com algum fator predisponente para candidoses, em especial pacientes infectados por HIV. Dos controles saudáveis utilizados nesses trabalhos, foram isolados *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. A prevalência de leveduras em pacientes HIV positivos pediátricos e adultos é de cerca de 60% nos diferentes estudos (Domaneschi et al., 2011; Nweze & Ogonnaya, 2011; Wu et al., 2011). De uma forma geral, a levedura predominante nos diferentes estudos foi *Candida albicans*, seguida por diferentes espécies de *Candida* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. intermedia*, etc.). Alguns estudos reportaram a presença de *C. dubliniensis*, enquanto ela não foi encontrada em outros (Domaneschi et al., 2011). Wu et al. (2011), estudando a colonização da orofaringe por leveduras em pacientes infectados com HIV em Taiwan, obtiveram que 81,3% dos pacientes eram colonizados por apenas uma espécie, 13% por duas espécies e 5,7% por mais de duas espécies de leveduras.

Alguns dos estudos mencionados acima abordam a resistência a agentes antifúngicos pelas leveduras isoladas de cavidade bucal. Nweze e

Ogbonnaya (2011) encontraram 11,7% das leveduras isoladas de pacientes HIV positivos resistentes a fluconazol, 8,3% a flucitosina, 7,5% ao itraconazol, e 1,7% ao voriconazol, tendo todos os isolados sido suscetíveis a à anfotericina B. A descoberta de isolados resistentes aos agentes antifúngicos demonstra a importância do teste de susceptibilidade a esses agentes. Furlaneto-Maia e colaboradores (2008) encontraram predominância de *Candida* não-*albicans* (88,9% dos isolados) em indivíduos idosos saudáveis em comparação com *C. albicans*. As espécies de *Candida* não-*albicans* encontradas foram *C. tropicalis* (33,3%), *C. glabrata* (27,8%) e *C. krusei* (16,7%). Investigando os fatores de virulência dos isolados obtidos, encontraram proteinases extracelulares em 17% dos isolados, todos os isolados foram hemolíticos, 56% formaram biofilme e a maioria foi sensível ao fluconazol.

Como mencionado acima, os trabalhos citados focam na microbiota leveduriforme de pacientes com fatores predisponentes para candidoses, porém o papel das leveduras na cavidade bucal de pacientes saudáveis permanece largamente inexplorado. Assim, o objetivo do presente estudo foi explorar colonização por leveduras da cavidade bucal de pessoas aparentemente saudáveis, visando definir as espécies do gênero *Candida* presentes, sua distribuição no ambiente bucal e possíveis interações entre espécies e habitats. Esse conhecimento da ecologia de leveduras no ecossistema bucal de pessoas saudáveis é imprescindível para que o papel desses micro-organismos nas doenças bucais seja corretamente avaliado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ecologia é a ciência que estuda as interações entre seres vivos e fatores abióticos em um determinado ambiente. Assim, um ecossistema consiste numa comunidade de organismos se relacionando em um local, que proporciona sua sobrevivência através do fornecimento de elementos físicos e químicos que afetam a sobrevivência dos mesmos (Marcotte & Lavoie, 1998).

Os habitats são esses locais, espaços naturais que apresentam características biológicas e ambientais definidas que proporcionam o aparecimento de uma comunidade microbiana – ou seja, os locais onde os organismos vivem. Já os organismos que vivem em um habitat particular constituem uma comunidade microbiana, formada por populações de uma mesma ou de várias espécies. O nicho é definido como a função de um organismo, em um habitat particular: assim, o nicho não é a localização física de um organismo, mas sim seu papel dentro da comunidade (Masch & Martin, 2009). Este papel é ditado pelas propriedades biológicas de cada população microbiana. Espécies com funções idênticas em um mesmo habitat vão competir para o mesmo nicho, enquanto a coexistência de muitas espécies em um habitat é devido a cada população ter um papel diferente (nicho), evitando assim a concorrência (Socransky & Haffajee, 2005; Masch & Martin, 2009).

Transferindo esse conceito ecológico para o corpo humano, verificou-se que o homem é um grande conjunto de ecossistemas e, independente da variação entre as comunidades instaladas nos diferentes habitats do indivíduo, o comportamento destes grupos de micro-organismos é compatível com os habitantes dos ecossistemas ambientais (Masch & Martin, 2009; Dewhirst et al., 2010; Lamont & Jenkinson, 2010; Zhou et al., 2013).

Os dentes, saliva, fluido gengival e mucosas especializadas de revestimento são atributos que diferenciam a cavidade bucal de outras áreas do corpo humano, caracterizando-a como um ecossistema distinto no organismo. Essa constituição específica confere diferentes habitats mesmo dentro da boca, cada um dos quais irá favorecer o crescimento de uma comunidade microbiana característica devido às suas características biológicas particulares (Marsch & Martin, 2009).

Portanto, os habitantes são os micro-organismos ali existentes, distribuídos nos habitats que são os diferentes locais anatômicos da boca, como os dentes, gengivas, vestibulo, língua, assoalho da boca, bochechas, palato e saliva (Aas et al, 2005; Dewhirst et al., 2010; Lamont & Jenkinson, 2010; Zarco et al., 2012; Cho et al., 2014). Essas populações que compõem a comunidade microbiana residente da cavidade bucal não são encontradas com frequência idêntica em toda a boca. A composição destas comunidades varia em superfícies distintas devido a diferenças nas propriedades biológicas e físicas de cada local (Lamont & Jenkinson, 2010)

Os micro-organismos colonizam as superfícies na boca através da retenção nesses habitats (Marcotte & Lavoie, 1998). A adesão por especificidade, em conjunto com processos metabólicos, determina a capacidade de um micro-organismo para colonizar um hospedeiro animal. Na cavidade bucal, colonizadores bem sucedidos devem resistir à ação de lavagem de fluxo salivar em conjunto com as forças de cisalhamento mecânicas da língua e dos dentes (Lamont & Jenkinson, 2010). Ainda assim, cada habitat apresentará uma biodiversidade característica e uma abundância taxonômica diferente (Zhou et al., 2013).

Os dentes, por mais que sejam uma superfície dura e diferente dos demais locais da boca, oferecem sítios diferentes de retenção além da superfície, como na área de transição com a gengiva (Marcotte & Lavoie, 1998). A natureza da comunidade bacteriana varia dependendo do dente em questão e do grau de exposição ao ambiente: superfícies lisas são colonizadas por um número menor de espécies do que nas fissuras (Samaranayake, 2013).

A colonização microbiana das superfícies mucosas é menos abundante do que as superfícies dentais (Lamont & Jenkinson, 2010). Em contraste, a mucosa bucal oferece uma descamação contínua de suas células epiteliais, o que permite rápida renovação dos nutrientes nesse habitat, bem como maior capacidade de adesão para firmar colônias ali pela intensa irrigação sanguínea. Esta mucosa é diferente da que reveste o palato, que apresenta epitélio não queratinizado (Marcotte & Lavoie, 1998).

Por fim, a língua, com a sua superfície papilar, proporciona sítios de colonização que são protegidos contra a remoção mecânica da escovação (Marcotte & Lavoie, 1998). Essa característica confere baixo potencial redox à língua, promovendo também o crescimento de microbiota anaeróbia neste habitat (Samaranayake, 2013).

As comunidades microbianas que se desenvolvem nas superfícies, como destes habitats citados, são denominadas biofilmes. Uma característica dos biofilmes é que as células microbianas integrantes podem coexistir mesmo com necessidades metabólicas diferentes. A força coletiva de uma comunidade microbiana estabelecida em um biofilme é tão superior aos micro-organismos isolados que o biofilme pode ser considerado como uma unidade evolutiva (Lemont & Jenkinson, 2010).

A saliva interage com todos esses biofilmes e habitats do ecossistema bucal, através de secreção das glândulas salivares maiores (parótidas, submandibular e sublingual) e menores (labial, lingual, bucal e palatal), fazendo a manutenção do pH local. Apesar de sua composição principal ser água, constitui numa mistura complexa de íons inorgânicos, incluindo sódio, potássio, cálcio, cloro, bicarbonato e fosfato. Os principais constituintes orgânicos da saliva são proteínas e glicoproteínas. A concentração desses íons varia diariamente com a intensidade do fluxo salivar (Marcotte & Lavoie, 1998; Samaranayake, 2013).

O pH médio para a saliva não estimulada é entre 6,75 e 7,25. O palato tem um pH médio de 7,34, enquanto o pH médio da língua, do assoalho

da boca e da mucosa bucal é de 6,8, 6,5 e 6,3, respectivamente. Geralmente, um ligeiro aumento na taxa da sua secreção leva a um incremento em sódio, bicarbonato e pH e uma diminuição do potássio, cálcio, fosfato, cloreto, ureia e proteínas. Essas alterações na composição da saliva são capazes de provocar modificações nos habitats bucais (Marcotte & Lavoie, 1998; Kolenbrander et al., 2010).

As flutuações transitórias fisiológicas da saliva - especialmente no seu pH, oferta de íons e proteínas - modulam a colonização por diferentes organismos por meio dos seguintes mecanismos:

- criação de uma película salivar nas superfícies dos dentes - um filme condicionante que facilita a adesão de micro-organismos. A película formada nas áreas queratinizadas e não queratinizadas é diferente, assim como pode proporcionar adesão de diferentes micro-organismos. Uma vez formada, sua composição e estrutura pode ser modificada em contato com os habitats;
- agregação de micro-organismos, facilitando sua remoção da boca ou deposição em superfícies;
- inibição do crescimento de organismos exógenos por fatores de defesa não específicos, como lisozima, lactoferrina e histatinas, que são bactericidas e fungicidas, e fatores de defesa específicos como as imunoglobulinas;

- através de sua capacidade tamponante (pH), mantém o crescimento das comunidades já estabelecidas (Marcotte & Lavoie, 1998; Lamont & Jenkinson, 2010; Samaranayake, 2013).

A saliva também contém uma série de compostos antimicrobianos que podem restringir a acumulação de placa e diminuir populações: lisozimas, peroxidases, lactoferrinas, cistatinas, cromogranina A, fatores antivirais e histatinas. Mas não é somente a atividade salivar que influencia o crescimento e adesão dos micro-organismos na boca, muitos outros fatores detêm esta capacidade. A temperatura, por exemplo, é capaz de regular a expressão de algumas das principais proteases, bem como do gene que codifica para a proteína da subunidade principal de fímbrias e da síntese de superóxido dismutase (neutralização de metabólitos de oxigênio tóxicos) (Lamont & Jenkinson, 2010).

A perturbação do potencial redox num habitat também pode ter um impacto significativo sobre o metabolismo e composição da comunidade microbiana. Muitos microrganismos requerem um pH por volta da neutralidade para o crescimento e são sensíveis a extremos de pH ácido ou alcalino. Depois do consumo do açúcar, por exemplo, o pH em um biofilme supragengival (placa dentária) pode cair rapidamente abaixo de pH 5,0 com a produção de ácidos - ácido láctico predominantemente (Lamont & Jenkinson, 2010).

Assim, a composição e o metabolismo do microbioma num determinado local vão ser influenciados pela taxa de fluxo e propriedades da saliva, o estilo de vida do indivíduo (em particular, hábito de tabaco, natureza

da dieta e exposição medicamentosa) e a integridade das defesas do hospedeiro. Além das mudanças provocadas por estas variações, a ecologia da boca também vai mudar ao longo do tempo devido à erupção ou extração de dentes, a inserção de bandas ortodônticas ou dentaduras, ou ainda qualquer tratamento dentário, incluindo raspagem e restaurações (Marsch & Martin, 2009).

Dentro de um ecossistema, o desenvolvimento de uma comunidade em geral envolve uma sucessão de populações. A boca é geralmente estéril ao nascimento. A aquisição da microbiota bucal segue uma progressão ecológica específica de um pequeno número de espécies pioneiras a uma comunidade clímax diversificada, contendo inclusive muitos anaeróbicos. A partir daí, estabelece-se uma relação dinâmica entre o hospedeiro, habitats e a microbiota residente, conforme exposto na Figura 1 (Marcotte & Lavoie, 1998; Lamont & Jenkinson, 2010).

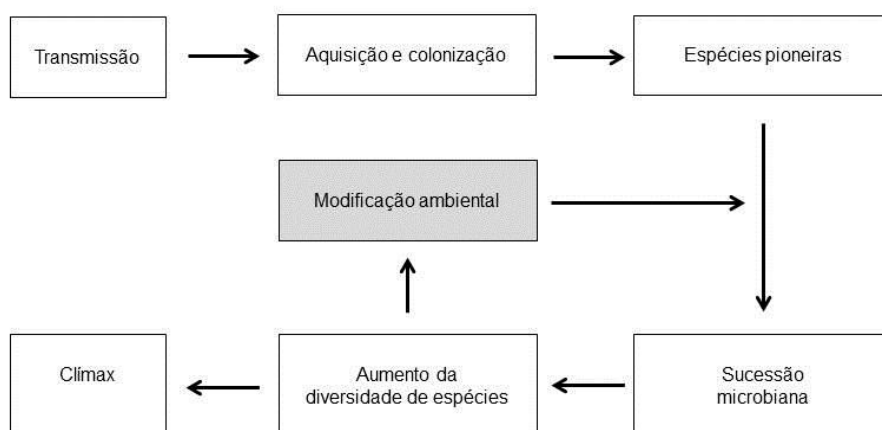


Figura 1 - Estágios ecológicos do estabelecimento da comunidade microbiana na cavidade bucal. Adaptado de Lamont & Jenkinson, 2010.

A formação da microbiota indígena do indivíduo depende da transmissão de micro-organismos para a cavidade bucal e seu potencial de colonização. Inicialmente, na boca, há inoculação passiva pela mãe e por outros indivíduos com proximidade física ao bebê, além da ingestão de água e leite. Aquisição de leveduras e lactobacilos do canal de parto em si pode ser apenas transitória, mas o que é estabelecido é que a saliva tem papel determinante nesta seleção (Lamont & Jenkinson, 2010).

A sucessão termina quando nenhum nicho adicional está disponível para novas populações (clímax). O clímax é independente da homeostase, o que implica mecanismos compensadores para manter condições de estado estacionário. Isto é, ele pode ser interrompido por forças exógenas ou endógenas (Marcotte & Lavoie, 1998; Socransky & Haffajee, 2005).

De toda forma, o equilíbrio tende a ser restaurado quando o habitat retorna ao seu estado original. Em certas ocasiões, esses ambientes podem ser irreversivelmente alterados (como com a extração de um dente, por exemplo), o que implicará num clímax diferente. Isso porque à medida que existem inúmeros nichos ou funções potenciais, especialmente quando há um entrelaçamento de cadeias alimentares, muitos grupos de organismos diferentes podem coexistir indefinidamente (Socransky & Haffajee, 2005; Zarco et al., 2012).

2.1 *Microbioma bucal*

O termo microbioma foi cunhado por Joshua Lederberg para determinar a comunidade comensal e simbiótica que literalmente compartilha

um determinado espaço do corpo humano. Neste sentido, o microbioma bucal consiste em todos os micro-organismos que se encontram no interior da boca e suas extensões contíguas, até o esôfago distal (Dewhirst, 2010). A caracterização e identificação do microbioma que habita os ecossistemas do corpo é essencial para entender a associação entre saúde e doença (Zhou et al., 2013).

A maioria dos ecossistemas contém um grande número de micro-organismos distintos geneticamente e a cavidade bucal humana não é diferente (Kolenbrander et al., 2012). Os organismos presentes na boca são uma mistura entre comensais e patogênicos. A microbiota bucal residente é diversa e consiste de uma vasta gama de vírus, micoplasmas, bactérias, leveduras e até, em certas ocasiões, protozoários que vivem em harmonia nos habitats da boca, incluindo dentes, sulco gengival, língua, bochecha, palatos duro e mole. Os micro-organismos distribuídos nos biofilmes, como a placa dentária, não detêm vantagem de crescimento, permitindo a coexistência de muitas espécies em harmonia. Esta condição também permite que organismos com maiores exigências para desenvolvimento possam sobreviver e crescer como parte de uma cultura mista em condições que seriam incapazes de tolerar se em cultura pura (Marsch & Martin, 2009; Ghannoum et al, 2010; Kolenbrander et al., 2010; Lamont & Jenkinson, 2010; Samaranayake, 2013).

Assim, cada corpo humano contém inúmeras comunidades microbianas que são essenciais para a manutenção da saúde do indivíduo, mas também capazes de provocar doenças em situações distintas (Zarco et al., 2012). As doenças bucais ocorrem quando o balanço do ecossistema é

interrompido. A hipótese da placa ecológica sustenta que mudanças nas proporções relativas de organismos podem ser o precursor para o desenvolvimento da doença, conforme esquematizado na Figura 2 (Lamont & Jenkinson, 2010).

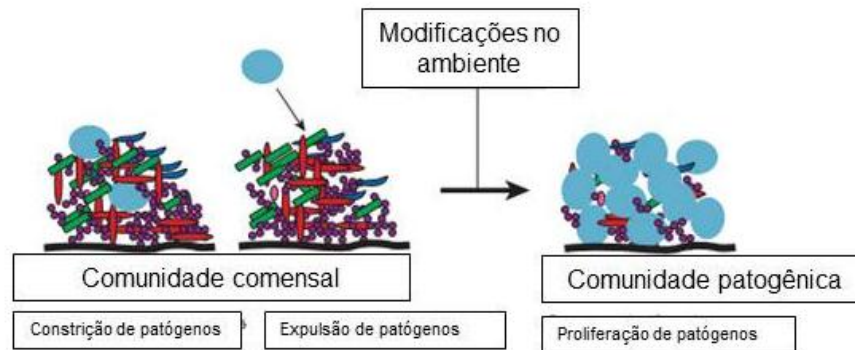


Figura 2. Representação de comunidades microbianas comensais e patogênicas. Em comunidades comensais, patógenos (azul) podem estar presentes, mas limitados ou excluídos pelos comensais. O painel da direita reflete a hipótese ecológica em que as condições mudam de tal forma que a população de patógenos pode tornar-se dominante. Adaptado de Lamont & Jenkinson, 2010.

Além disso, os indivíduos cujos sistemas imunológicos não estão funcionando de forma ideal, ou seja, imunocomprometidos, ficam suscetíveis às infecções por micróbios que são comensais em indivíduos saudáveis. São os chamados patógenos oportunistas (Lamont & Jenkinson, 2010; Cho et al., 2014).

Neste contexto, fica claro que o microbioma bucal é uma das comunidades microbiológicas mais complexas dentre as associadas ao corpo humano (Eren et al., 2014). A grande variedade de habitats da cavidade bucal com diferentes condições ambientais torna ainda mais difícil o estudo da microbiologia da boca (Zarco et al., 2012). As bactérias são o grupo

predominante ali presente, onde já foram catalogadas mais de 700 espécies ou filotipos orais comuns. Destes, estima-se que apenas 50-60% são cultiváveis (Aas et al., 2005; Socransky & Haffajee, 2005; He & Shi, 2009; Samaranayake, 2013; Diaz et al., 2012). A microbiota não cultivável restante está sendo identificada atualmente por métodos moleculares (Socransky & Haffajee, 2005; Samaranayake, 2013).

Dentre os principais filos bacterianos isolados da boca de indivíduos saudáveis, estão *Streptococcus*, *Gemella*, *Eubacterium*, *Selenomonas*, *Veillonella*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Fusobacteria* (Aas et al., 2005; Lamont & Jenkinson, 2010; Kolenbrander et al., 2010). A Figura 3 sugere um modelo espaço-temporal de colonização bacteriana da boca.

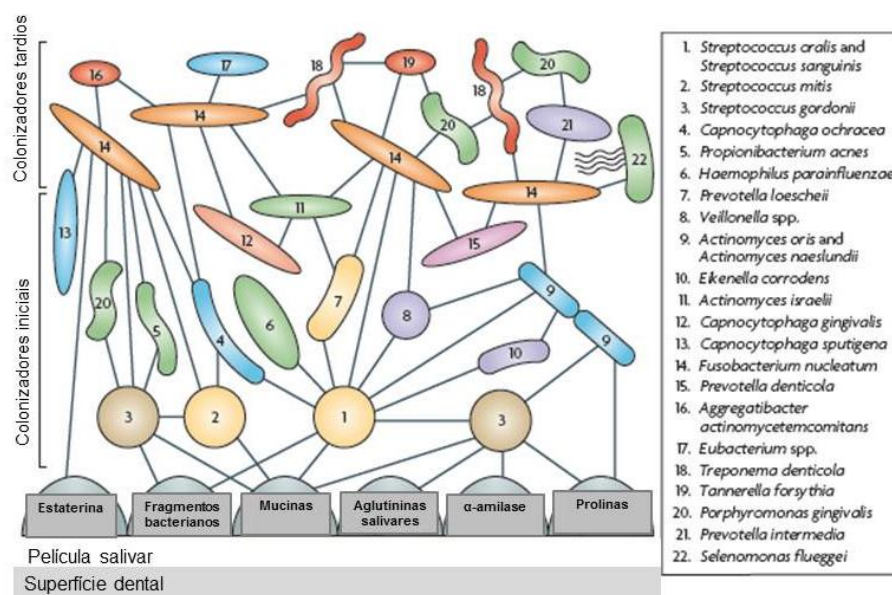


Figura 3. Representação do desenvolvimento da colonização dos habitats bucais. Começando na parte inferior, colonizadores iniciais, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis*, se ligam a receptores complementares salivares na película disposta na superfície do dente. Colonizadores tardios ligam-se às bactérias anteriormente vinculadas (coagregação): *Fusobacterium nucleatum*, por exemplo. Os

estreptococos exibem ampla coagregação intragenérica (por exemplo, *S. gordonii* e *S. oralis*), bem como as parcerias intraespecíficas (por exemplo, *S. gordonii* e *DL1 S. gordonii* 38). Cada estirpe bacteriana apresenta especificidade em parceiros. Adaptado de Kolenbrander et al., 2010.

Sabe-se que as leveduras também fazem parte deste ecossistema. As bactérias estão presentes na maioria dos sítios da boca em concentrações muito mais elevadas do que as leveduras, e assim estas células devem competir na adesão de cada sítio e pela utilização dos nutrientes, mas também estão expostas a toxinas bacterianas e seus derivados (Cannon & Chaffin, 1999). Avanços recentes da microbiologia já demonstraram que as bactérias são capazes de interferir nas comunidades fúngicas e vice-versa (Kraneveld et al., 2012)

Ainda assim, faltam estudos que demonstrem o comportamento dos fungos em condições normais do ambiente bucal (Samaranayake, 2013). Estima-se que 80% das leveduras isoladas na boca sejam do gênero *Candida*. Outras leveduras, como *Saccharomyces* spp, *Malassezia* spp, *Paracoccidioides* spp, e *Cryptococcus* spp também já foram encontradas (Aas et al., 2005; Lamont & Jenkinson, 2010 ; Ghannoum et al., 2010; Dupuy et al., 2014). Na tabela 1 são elencados os principais fungos encontrados na boca já relatados na literatura (Cannon & Chaffin, 1999; Liguori et al., 2007; Lamont & Jenkinson, 2010 ; Ghannoum et al., 2010; Williams & Lewis, 2011; Dupuy et al., 2014).

Tabela 1: Principais espécies fúngicas isoladas da cavidade bucal humana

Espécies de Candida	Outros gêneros/espécies
<i>Candida albicans</i>	<i>Paracoccidioidis brasiliensis</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Aspergillus spp</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> (<i>Filobasidiella neoformans</i>)
<i>Candida kefyr</i> (<i>Kluyveromyces marxianus</i>)	<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Mucor spp</i>
<i>Candida guilliermondii</i> (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)	<i>Saccharomyces spp</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Geotrichum spp</i>
<i>Candida lusitaniae</i> (<i>Clavispora lusitaniae</i>)	<i>Rhizopus spp</i>
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Malassezia spp</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Cladosporium spp</i>
	<i>Fusarium spp</i>
	<i>Pichia spp</i>
	<i>Mycosphaerella spp</i>
	<i>Lysurus spp</i>
	<i>Alternaria spp</i>

2.2 Fisiopatologia do gênero *Candida* no ambiente bucal

Cento e noventa e sete espécies de *Candida* são conhecidas e classificadas como pertencentes ao Reino *Fungi* (Samaranayake, 2013), porém apenas poucas espécies são encontradas em associação com o ser humano. As espécies de *Candida* são componentes normais da microbiota humana, cuja presença é registrada amplamente na literatura científica como habitante da pele e mucosa de indivíduos saudáveis. Estas leveduras são detectadas logo após o nascimento na cavidade bucal do recém-nascido (Williams & Lewis,

2011; Kraneveld et al., 2012; Samaranayake, 2013). Inclusive já é consenso que leveduras deste gênero são predominantes na boca da maioria dos indivíduos.

As leveduras do gênero *Candida* encontradas na cavidade bucal são anaeróbias facultativas e toleram pH baixo, tendo habilidade para colonizar o epitélio bucal e a própria língua, também sendo encontradas em lesões cariogênicas (Martinz & Lacaz, 1980; Socransky & Haffajee, 2005; Lamont & Jenkinson, 2010; Dupuy et al, 2014; Cho et al, 2014). Porém, o papel das espécies de *Candida* no microbioma bucal ainda não é muito bem elucidado (Cho et al., 2014).

A relevância de nomear as espécies desta levedura presentes no ecossistema bucal é calçada na informação de que este gênero emergiu para o sexto patógeno responsável por infecções hospitalares, salientando-se a substituição de *C. albicans* por outras espécies. A importância desses achados reside sobretudo na resistência antifúngica aumentada entre as espécies não-*albicans*, especialmente das espécies *C. glabrata* e *C. krusei* (Gasparetto et al., 2005; Lamont & Jenkinson, 2010).

Em termo de prevalência na boca, há predomínio de *C. albicans*, seguido de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* e *C. parapsilosis*. Uma das razões para esta preponderância entre espécies são os fatores de virulência de cada espécie, que permitem que cada micro-organismo interaja de forma distinta com o hospedeiro. Um dos fatores de virulência de algumas das leveduras do gênero *Candida* é a aptidão em aderir às células de

superfície. Essa propriedade permite que determinadas espécies se fixem de tal forma a impedir sua remoção por meio do fluxo salivar e deglutição, tanto no tecido bucal quanto em biomateriais, como as próteses (Lamont & Jenkinson, 2010).

Outra propriedade que confere resistência à remoção de *Candida* das superfícies colonizadas é sua habilidade de formação de hifas. Uma vez ligada aos receptores da superfície em questão, estas leveduras têm a capacidade de alternar sua morfologia de levedura para uma forma filamentosa a fim de promover a penetração do epitélio e aumentar a resistência das células à fagocitose por células imunitárias do hospedeiro (Lamont & Jenkinson, 2010).

Um certo número de genes foi sugerido como controlador positivo da produção de hifas em *C. albicans*, incluindo HGC1 que codifica para uma proteína citoplasmática imprescindível na formação de hifas. Os estudos que examinaram os mutantes de *C. albicans* incapazes de expressar HGC1 evidenciaram que as cepas não-filamentosas são menos virulentas (Lamont & Jenkinson, 2010).

Além de proporcionar a diversidade do microbioma bucal, sua presença no corpo humano propicia a ocorrência de infecções, já que os fatores de virulência de *Candida* contribuem para desequilibrar o ecossistema microbiológico da boca. Como já citado anteriormente, com a proliferação de alguns micro-organismos em preponderância a outras espécies, há instalação de um professo infeccioso. No caso de *Candida*, esse processo ocorre

especialmente em pacientes imunocomprometidos, mas lesões mecânicas na boca, fluxo salivar inadequado e higiene insuficiente também são fatores que predispõem a candidoses.

Tabela 2: Fatores de virulência associados à *Candida albicans* (Lamont & Jenkinson, 2010).

Fator de virulência	Efeito
Superfície hidrofóbica	Aderência não específica
Expressão de adesinas na superfície celular	Ativação de mecanismos de adesão específicos
Frequência de alteração fenotípica	Modificação antigênica através de mudanças na superfície celular
Desenvolvimento de hifas	Redução da fagocitose, facilidade de escapar do fagócito, facilitador da invasão do epitélio oral
Secreção de aspartil proteinase	Secreção de IgA pelo hospedeiro, destruição da matriz celular
Ligação nas moléculas do complemento	“Máscara” antigênica
Produção de fosfolipases	Destruição de células do hospedeiro

O ecossistema microbiano bucal é particularmente vital para a manutenção da saúde do corpo (Zarco et al., 2012). As infecções causadas por *Candida* com origem bucal podem ser superficiais ou sistêmicas – as superficiais envolvem os tecidos mucocutâneos locais e as sistêmicas envolvem múltiplos órgãos, conforme descrito nos parágrafos abaixo.

As lesões da mucosa mais comuns causadas por estas leveduras são estomatite e queilite angular – que também podem envolver bactérias na

sua fisiopatologia. Isso é causado pelo fato de que as células de *C. albicans* têm a capacidade de coaderir a várias espécies bacterianas, incluindo *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. salivarius* e também espécies de *Actinomyces* (Cannon & Chaffin, 1999; Lamont & Jenkinson, 2010). Mukherjee e colaboradores (2014), em recente estudo de correlação entre o bacterioma e o microbioma, comprovaram as associações estatisticamente significantes entre estes micro-organismos (Figura 4).

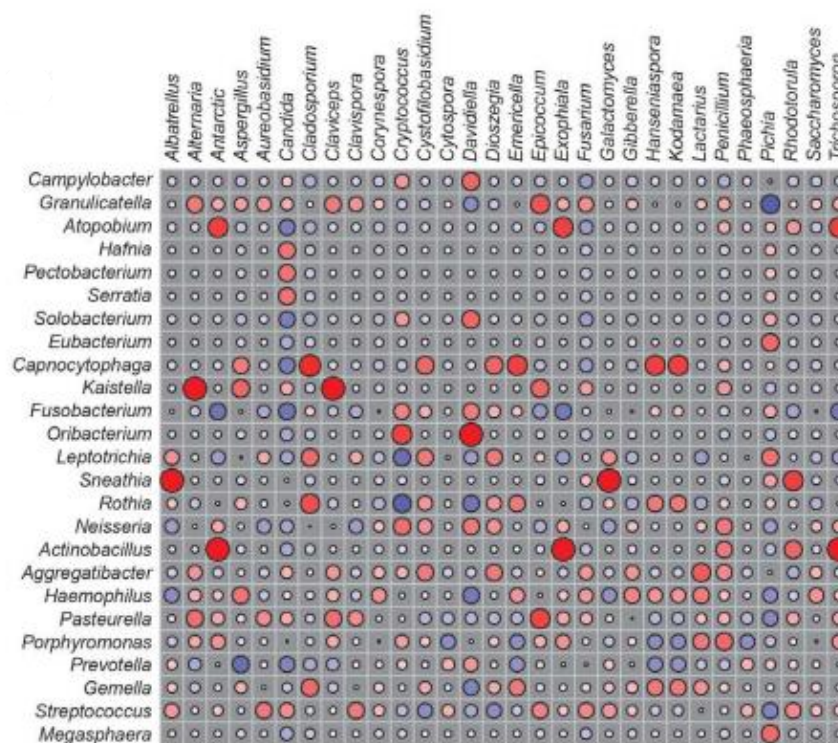


Figura 4. Interações entre micro-organismos na boca de pacientes não infectados pelo HIV. Círculos vermelhos = correlação positiva, círculos azuis = correlação negativa. O diâmetro dos círculos é a correlação absoluta. Adaptado de Mukherjee et al. (2014).

Na atualidade as atenções voltam-se principalmente para a candidíase sistêmica. As leveduras podem adentrar na corrente sanguínea,

modular as respostas imunológicas específicas e desregular mediadores inflamatórios e assim causar doença em diversos órgãos (Zarco et al. , 2012). A mortalidade dentre os indivíduos com candidíase sistêmica é na faixa de 30% a 50% (Williams & Lewis, 2011). Essa condição tem aumentado nas últimas décadas, especialmente relacionadas à espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Lamont & Jenkinson, 2010).

2.3 Identificação de leveduras do gênero *Candida*

Os micro-organismos do gênero *Candida* têm a capacidade de crescer em vários estados morfológicos, como brotamento - incluindo células de levedura, pseudohifas e também em hifas verdadeiras (Lamont & Jenkinson, 2010).

As técnicas laboratoriais convencionais para identificação das leveduras do gênero *Candida* são baseadas principalmente em métodos bioquímicos, como fermentação e assimilação de carboidratos, associadas às análises morfológicas do micro-organismo (Araújo et al., 2005). Em meio sólido contendo ágar Sabouraud dextrose, as leveduras deste gênero se apresentam em colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada.

A identificação de *Candida* através da análise morfológica se dá na avaliação da produção ou não de tubo germinativo (em geral leitura 2h após inoculação) e micromorfologia. Microscopicamente, as células são ovaladas ou ovalada-alongadas. Ao microcultivo em ágar "corn-meal", há formação de pseudomicélios, podendo ser encontrados micélios verdadeiros e

clamidósporos. A formação de tubos germinativos ocorre em cultivos com soros de animais a 37°C (ANVISA, 2013).

O uso de meios cromógenos de cultura com capacidade de diferenciar algumas espécies de *Candida* e outras leveduras de interesse clínico tem sido difundido. Esses meios têm como fundamento a alteração na cor desenvolvida pelas colônias através de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos ou substratos cromógenos (Araújo et al, 2005).

Neste trabalho, utilizamos o meio BBL CHROMagar Candida Difco para identificação presuntiva das espécies desta levedura provenientes de amostras bucais. Este meio, assim como os demais meios cromogênicos, se baseia na utilização do substrato β glicosaminidase e diferencia as leveduras de acordo com a morfologia e a cor das colônias. Assim, é possível discernir as colônias de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* pela diferença em sua coloração e morfologia (Araújo et al., 2005, Murray et al., 2005; Zimbro et al, 2009).

O Chromagar também tem sido utilizado na intenção de diminuir o tempo de diagnóstico e identificação de agentes patogênicos (Daef et al., 2014). Seu uso também tem contribuído para as associações entre leveduras e doenças bucais em outros estudos (Beighton et al., 1995). A confiabilidade desta técnica já foi amplamente testada, com resultados em níveis de concordância próximos a 100%, conforme uma compilação de resultados científicos apresentados por Daef e colaboradores em 2014. Inclusive, em evidências exibidas por Merseguel e colaboradores em 2015, 300 amostras de leveduras do gênero *Candida* foram avaliadas pela identificação presuntiva no

Chomagar Candida e molecular (região ITS 1 e ITS 2), remetendo a 100% de concordância entre os resultados fenotípicos e genéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e coleta

Após autorização do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (sob o número 18147, conforme anexo 1), foram coletadas amostras da cavidade bucal de 100 adultos entre 18 e 60 anos recrutados no serviço odontológico da UFRGS.

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados através de questionário dirigido e consentimento livre e esclarecido conforme anexo 2, objetivando eleger somente pacientes saudáveis. Os critérios adotados para caracterizar tal condição foram: ausência de patologias bucais visíveis, indivíduos não fumantes, no mínimo 20 dentes erupcionados; ausência de aparelho ortodôntico ou próteses; ausência de condições de imunossupressão e Diabetes ou xerostômicos. Os participantes declararam não ter utilizado medicamentos tópicos ou sistêmicos das classes de antifúngicos, antibióticos ou corticóides nos últimos três meses antecedentes à coleta. Previamente, um cirurgião dentista avaliou a saúde bucal destes pacientes, excluindo doenças odontológicas no momento da coleta da amostra. Os voluntários pertenciam a ambos os sexos. Os referidos critérios de inclusão e exclusão foram avaliados

através de questionários e avaliação odontológicas, registrados em formulário específico, disposto no anexo 3.

As amostras foram obtidas através de fricção de swab estéril em oito locais distintos da cavidade bucal: língua dorsal, língua ventral, assoalho da boca, palato duro/mole, bochecha direita/esquerda, vestibulo/lábio, gengivas e no último dente molar inferior da direita. Também foram coletadas amostras salivares por sucção através de uma pipeta Pasteur, totalizando nove amostras por paciente. Os swabs e a saliva foram transportados para o laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS imersos em água peptonada 1%, visando posterior processamento.

3.2 Isolamento das leveduras

As nove amostras obtidas de cada paciente foram inoculadas em placas de Petri contendo meio seletivo e diferencial BBL CHROMagar Candida Difco (Zimbro et al, 2009). A semeadura foi realizada em duplicata através da técnica de esgotamento com o próprio swab utilizado na coleta. A água peptonada contendo saliva foi semeada da mesma forma, após a imersão de um swab estéril para tal fim.

Após inoculação, as placas foram incubadas por até 48h a $35 \pm 2^\circ \text{C}$. A coloração das colônias leveduriformes após crescimento no meio seletivo diferencial permitiu a identificação presuntiva da espécie de levedura, segundo as orientações do fabricante (Tabela 3).

Tabela 3: Identificação das espécies de leveduras conforme a coloração das colônias em Chromagar Candida (Zimbro et al., 2009; Araújo et al., 2005).

Coloração das colônias	Identificação
Verde claro ou verde médio	<i>Candida albicans</i>
Rosa claro a rosa pink	<i>Candida krusei</i>
Azul marinho ou azul metálico	<i>Candida tropicalis</i>
Lilás	<i>Candida glabrata</i>
Verde malva	<i>Candida dubliniensis</i>

Isolados que não apresentaram reações características no Chromagar Candida foram encaminhados para sequenciamento das regiões D1/D2 da subunidade grande ribossomal 26S, visando sua identificação molecular.

3.2.1 Identificação molecular

Para extração de DNA, cada cepa foi cultivada em meio GYP (0.5% extrato de levedura, 2% glicose, 1% peptona) a 30°C por 18 horas. Depois de centrifugar e lavar com água destilada, a biomassa de cada cultivo foi ressuspensa em 400µL de tampão de lise (NaCl 0.5M, EDTA 10mM, SDS 2%, Tris-HCl 50mM; pH 8) e incubada por 60min a 65°C. Imediatamente depois, foi adicionado 200µL de Acetato de Potássio (5M, pH 4.8) e as amostras foram mantidas por 30min em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e de novo centrifugado a 14.000 rpm por 5min.

O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado 1mL de isopropanol a -20°C, agitando suavemente os tubos durante 5min. Depois de centrifugar a 14.000 rpm por 10min, o pellet foi lavado com etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 5min. Os pellets secos foram ressuspensos em 50µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 7.4). Depois de incubar as amostras a 37°C durante 30min com 3µL de RNase (10mg/mL), as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C. A qualidade do DNA extraído foi analisada em géis de agarose 1% (p/v).

O domínio D1/D2 da subunidade grande ribossomal 26S rRNA foi amplificado com os primers NL1 e NL4 (O'Donnell, 1993). As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo inicial de 94 ° C durante 5 min , 35 ciclos a 94 ° C durante 15 s , 55 ° C durante 45 s , 72 ° C durante 90 s , e um ciclo de extensão final a 72 ° C para 6 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese num gel de agarose a 1,5 % a 100 V durante 45 minutos e coradas com GelRed ® para visualização sob luz UV. A captura de imagem digital foi realizada através do gelDoc Sistema Geni2 (Syngene, Cambridge, UK).

As sequências foram obtidas com o sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, usando os protocolos da Ludwig Biotecnologia localizado em Alvorada, Brasil, e comparadas com as sequências das cepas cadastradas na base de dados Genbank, por meio do algoritmo BLAST. Identidade igual ou superior a 99% foi o critério para identificação no nível taxonômico de espécie (Ramírez-Castrillón et al., 2014).

3.3 Controle de qualidade

Os procedimentos de controle de qualidade seguiram as recomendações da Anvisa para avaliação de amostras clínicas (ANVISA, 2006) e intervenções visando padronização dos experimentos:

- A avaliação odontológica dos participantes, bem como a coleta, foi realizada por um único cirurgião dentista.
- Todas as amostras, devidamente identificadas, foram semeadas em duplicata no referido meio de cultura.
- O ágar foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e as placas foram estocadas no escuro.
- A esterilidade do meio foi controlada pelo teste de incubação em 10% de cada lote de Chromagar Candida preparado.
- O funcionamento do ágar foi testado através da semeadura de cepas ATCC das espécies *C. tropicalis* (ATCC 750); *C. krusei* (ATCC 6258); *C. albicans* (ATCC 10231); e verificação da coloração produzida conforme as instruções do fabricante.
- As placas foram utilizadas antes de uma semana de fabricação.

3.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no Núcleo de Assessoria Estatística do Instituto de Matemática da Universidade Federal do Rio Grande

do sul. A significância das variáveis do grupo amostral foi verificada pelo teste T de Student, considerando o nível de significância $p < 0,05$.

Visando verificar se existe correlação entre espécies de leveduras e sítio da boca de onde foram isoladas, os resultados foram avaliados pelo método de Análise de Cluster, através do Método de Ward e distância métrica de Chebychev. Este teste estatístico permite que, através de diferentes algoritmos, elementos sejam agrupados de acordo com sua semelhança.

A analogia foi computada por meio do coeficiente de similaridade mínima (Socransky et al., 1982) e os agrupamentos foram expressos em dendrogramas, onde os dados são apresentados de forma aglomerativa e hierárquica. O dendrograma é um gráfico em forma de árvore onde é possível alterações dos níveis de similaridade para as sucessivas etapas do agrupamento. À medida que o gráfico avança para a direita no diagrama, aumentando as distâncias de conexão, agrupamentos cada vez maiores são formados, com mais diversidade e menos similaridade.

A diversidade de espécies e seus respectivos habitats também foram submetidos à Análise de Frequência Multivariada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A anatomia da boca e a caracterização físico-química distinta entre os tecidos biológicos que a compõem permitem que o espaço bucal se comporte como um ecossistema, apresentando diferentes habitats de colonização. Cada um destes habitats é caracterizado por propriedades diferentes, inclusive entre indivíduos, proporcionando o crescimento de uma extensa comunidade microbiana distinta (Marcotte & Lavoie, 1998; Kolenbrand et al., 2010; Berezow & Darveau, 2011).

Há teorias baseadas em que as doenças bucais são influenciadas pela atividade destas comunidades de micro-organismos e não pela ação de patógenos em particular (Kolenbrand et al., 2010). Estudos evidenciando a variabilidade de espécies fúngicas já comprovaram que as leveduras também fazem parte deste ecossistema, porém faltam evidências que demonstrem o comportamento destes micro-organismos em condições normais (Samaranayake, 2013).

Alguns estudos recentes já relacionaram a biodiversidade bacteriana e os habitats da cavidade bucal, bem como já elencaram algumas espécies fúngicas componentes do microbioma normal da boca (Socransky & Haffajee, 2005; Mager et al., 2003; Ghannoum et al., 2010; Zhou et al., 2014). Neste

sentido, propusemos, através deste estudo, avaliar a colonização de leveduras do gênero *Candida* no ecossistema bucal de pessoas saudias. Além de distinguir as espécies de *Candida*, averiguamos sua distribuição e possíveis interações entre espécies e sítios de colonização no interior na boca.

4.1 Grupo amostral e variabilidade de espécies

A tabela 4 apresenta as características gerais dos integrantes da pesquisa, onde a alta média do número de dentes entre os pacientes atestou que o grupo amostral foi de indivíduos saudáveis, uma vez que a preservação de elementos dentários está intimamente ligada à qualidade de vida, incidência e prevalência de doenças odontológicas (Silva, 2007).

Tabela 4. Descrição do grupo amostral.

Características amostrais	
Total da amostra	100 pacientes
Pacientes colonizados por <i>Candida</i> sp.	63%
Idade	Máxima: 51 Mínima: 18 Média: 27
Gênero	71, 4% feminino 28,6% masculino

Continuação Tabela 4:

Dentes erupcionados	Mínimo: 20 Máximo: 32 Média: 27
----------------------------	---------------------------------------

Ao final dos experimentos, 1800 placas de petri foram avaliadas quanto ao seu crescimento leveduriforme (oriundas de 100 pacientes, nove amostras de cada um e cada amostra semeada em duplicata). Os dados do grupo amostral, quando submetidos ao teste T de Student, não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Dentre as amostras analisadas através do Chromagar Candida, foram identificadas as seguintes espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Duas leveduras, caracterizadas por colônias marrons e creme, respectivamente, não puderam ser identificadas presuntivamente pelo Chromagar Candida, tendo sido encaminhadas para sequenciamento, conforme descrito na metodologia. As leveduras de coloração creme foram identificadas molecularmente como *Candida parapsilosis* e as com colônias marrons como *Meyerozyma guilliermondii* – forma anamorfa de *C. guilliermondii*.

Todas estas espécies citadas já foram isoladas em amostras da boca de pacientes saudáveis e doentes, conforme já descrito na literatura científica (Liguori et al., 2007; Lamont & Jenkinson, 2010; Williams & Lewis, 2011; Dupuy et al., 2014). Todavia, em estudo metagenômico pioneiro do microbioma bucal humano, Ghannoum e colaboradores (2010) avaliaram 20

pacientes, dos quais isolaram *C. khmerhensis* e *C. metapsilosis*, não encontradas na presente pesquisa. Em congruência aos nossos achados, estudo com crianças e adolescentes também normais, conduzido por Martins e colaboradores (2011), também relatou a espécie *C. glabrata*, o que não foi observado pelo grupo liderado por Ghannoum.

Apesar da metodologia de coleta amostral utilizada por Ghannoum e colaboradores (2010) parecer mais eficiente, uma vez que a técnica de enxágue bucal permite maior oportunidade de contato com todas estruturas e habitats da boca, a presente pesquisa identificou duas espécies a mais do que os autores citados. Esse resultado também indica que a técnica de identificação utilizada em nossa pesquisa, mesmo que inferior – se comparada com a técnica molecular de técnica de pirosequenciamento multitag (MTPS) utilizada por Ghannoum et al. (2010) - foi eficaz e não restringiu a variabilidade de espécies de *Candida*.

Uma das causas desta diferença no número de espécies encontrada pode ter sido a origem dos pacientes, que implica numa microbiota indígena possivelmente distinta em função dos hábitos. Ainda comparando os dois estudos, apontamos o baixo número amostral no estudo de Ghannoum et al. (2010), em contraste com o presente estudo, também pode ter influenciado nos resultados.

Já confrontando as diferentes espécies de *Candida* isoladas em indivíduos doentes (Mager et al., 2003; Liguori et al., 2007; Mukherjee et al., 2014) e as encontradas no presente estudo, é possível afirmar que a

variabilidade de espécies de *Candida* no microbioma bucal de indivíduos saudáveis e com doença bucal é semelhante – mesmo considerando a técnica de coleta, que pode ter limitado a diversidade de leveduras encontradas. Esse achado reforça o comportamento oportunista das leveduras investigadas.

Por outro lado, ao examinar o comportamento de outros gêneros fúngicos nos indivíduos saudáveis e portadores do HIV, Mukherjee e colaboradores (2014) verificaram que o microbioma dos pacientes com o vírus era diferente dos indivíduos não infectados. Foram encontradas até nove gêneros diferentes em amostras obtidas através de enxágue bucal: dentre os infectados, os gêneros mais comuns foram *Candida* (92%), *Epicoccum* (33%) e *Alternaria* (25%); enquanto nos pacientes isentos do vírus houve predomínio de *Candida* (58%), *Pichia* (33%) e *Fusarium* (33%).

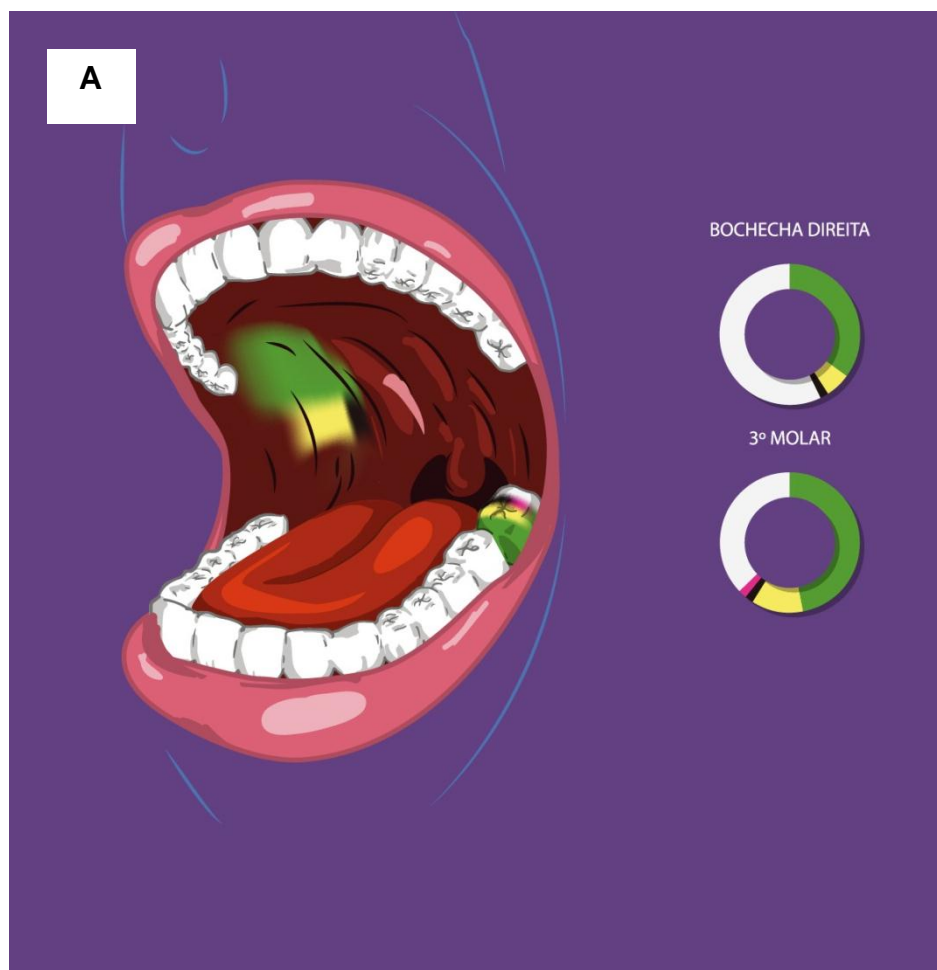
C. albicans foi a espécie mais incidente em nossa pesquisa, em concordância aos dados recentes apresentados em estudo do microbioma bucal (Ghannoum et al, 2010; Mukherjee et al 2014), que também verificaram a predominância de *C. albicans* na boca de pacientes saudáveis (40% e 58% respectivamente).

Outras espécies observadas como predominantes na boca no presente estudo foram *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Em estudo com pacientes saudáveis (Ghannoum et al., 2010), *Candida parapsilosis* foi encontrada com frequência de 15%, caracterizando a segunda espécie de *Candida* mais frequente. Liguori e colegas (2007) também registraram *C. krusei* como uma

das três mais frequentes em estudos com pacientes com doenças odontológicas.

4.2 Associações e distribuição no ambiente bucal

Todos os sítios da boca examinados foram colonizados por mais de uma espécie de *Candida*. A língua dorsal e a língua ventral foram os pontos de maior diversidade dentre os habitats avaliados, apresentando todas as espécies encontradas nesta pesquisa. A Figura 5 (A, B, C) ilustra, em proporção aproximada, a colonização média pelas diferentes espécies de *Candida* nos pacientes do presente estudo.



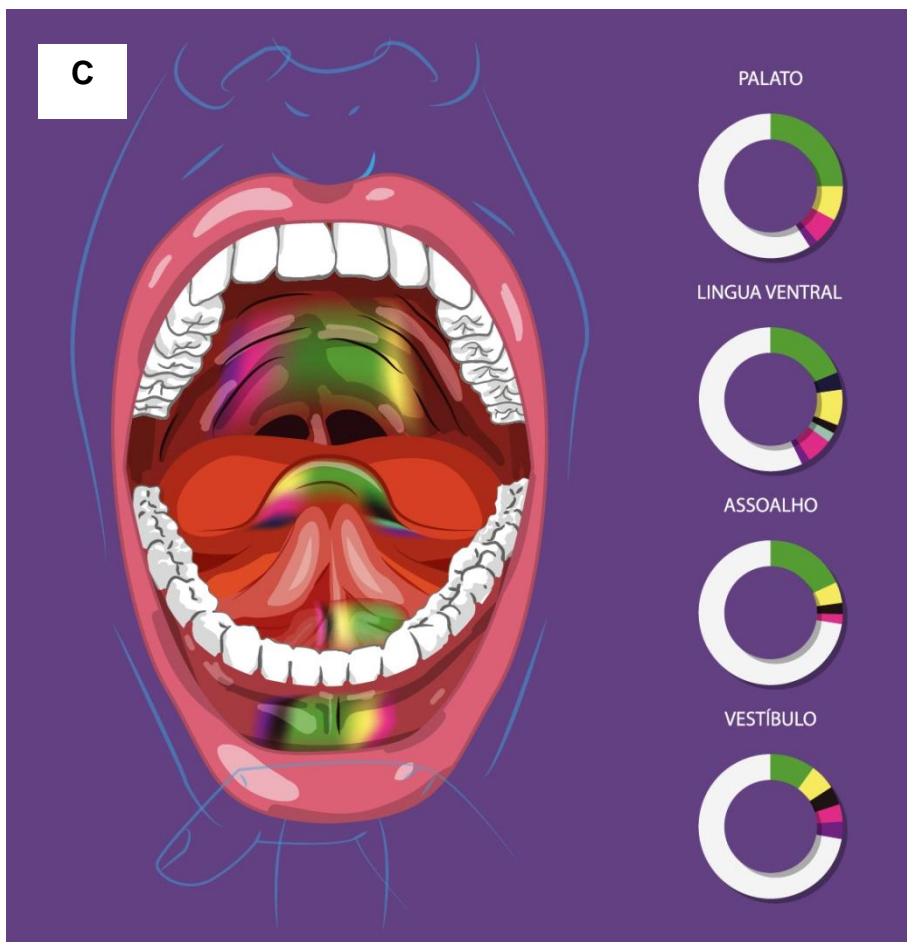
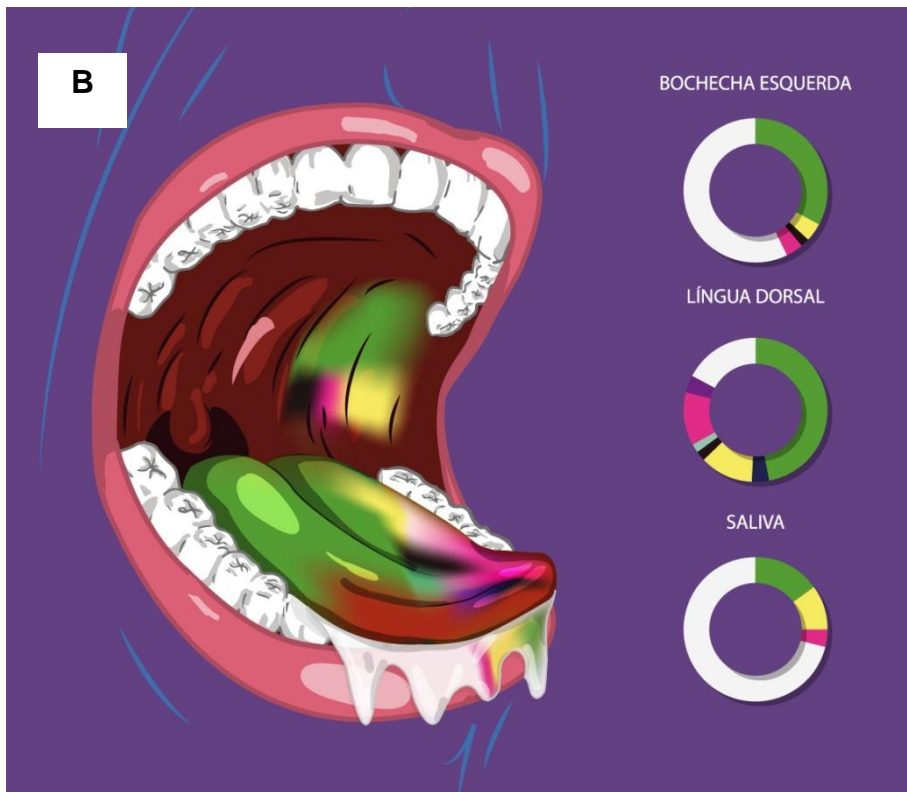


Figura 5: Representação das leveduras do gênero *Candida* encontradas nos nove habitats da boca avaliados. As ilustrações simulam a colonização da boca de um indivíduo saudável, considerando a média de colonização das espécies de *Candida* encontradas neste estudo. Os gráficos laterais demonstram as proporções entre cada espécie, onde a cor branca representam áreas isentas de colonização leveduriforme no referido habitat. A cor verde representa colônias de *Candida albicans*, áreas amarelas indicam *Candida parapsilosis*, áreas pretas correspondem a *Meyerozyma guilliermondii*, coloração rosa indica *Candida krusei*, cor violeta corresponde a *Candida glabrata*, azul marinho são colônias de *Candida tropicalis* e verde claro são áreas cobertas por *Candida dubliniensis*. Habitats avaliados: (A) bochecha direita e último molar; (B) bochecha esquerda, língua dorsal e saliva e (C) palato, língua ventral, assoalho da boca e vestíbulo. Ilustrações: Gabriel Camerini.

Aas e colaboradores (2005), em pesquisa que associou bactérias e nichos do ecossistema bucal, também observou maior variabilidade de espécies nas amostras da língua. A fisiologia que descreve a adesão de espécies de *Candida* no dorso da língua explica o porquê desta variabilidade nos referidos nichos. A aderência bucal de *Candida* ocorre principalmente na queratina mole das papilas verdadeiras, local que oferece proteção aos microorganismos ali instalados da ação mecânica da escovação, favorecendo a colonização na língua (Marcotte & Levoie, 1998; Rangel et al., 2001).

Estes fatores anatômicos também influenciam a colonização nos demais habitats, especialmente naqueles que propiciam acúmulo de leveduras, como os sulcos formados topografia dos dentes e todos os locais de difícil acesso para lavagem salivar. Assim, os tratamentos odontológicos também podem determinar espaços de colonização, como na ocasião de restaurações mal adaptadas (Samarayake, 2013).

Pela sua característica que não permite superfície de adesão, a saliva apresentou menor diversidade entre todos habitats, oportunizando somente a colonização de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Estas

espécies apresentaram comportamento semelhante na colonização do ecossistema bucal, já que foram capazes de crescer em todos os habitats da boca, mesmo que em frequências distintas e com predomínio ímpar de *C. albicans*, conforme exposto na Tabela 5 e observado anteriormente na Figura 5.

Tabela 5. Percentual médio das frequências encontradas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* no ecossistema bucal em relação ao número de colônias totais isoladas em cada habitat.

Habitat	Frequência média de colonização em %		
	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida krusei</i>
Saliva	14,3%	10%	4,1%
Último molar	46,9%	12%	2%
Vestíbulo labial	10,2%	6%	4,1%
Palato	24,5%	8%	6,1%
Língua dorsal	46,9%	12%	12,2%
Língua ventral	18,4%	8%	6,1%
Bochecha esquerda	32,7%	4%	4,1%
Bochecha direita	34,7%	6%	1%
Assoalho da boca	14,3%	4%	2%

A preponderância de *C. albicans* foi um dos resultados esperados no trabalho, já que é consenso científico a alta frequência desta levedura na boca. Além disso, sabe-se que esta espécie possui maior capacidade de adesão às células epiteliais que as demais espécies de *Candida*, o que sugere uma maior amplitude de distribuição (Rangel, 2001; Ghannoum et al., 2010; Lamont & Jenkinson, 2010; Samaraynake, 2013; Mukherjee et al., 2014).

Submetendo os resultados da diversidade e distribuição de espécies, associações e abundância à análise estatística, evidenciou-se

interação entre os micro-organismos identificados e os locais de coleta propostos como habitats (Figura 6). A figura é baseada na análise de cluster que emprega coeficientes de similaridade descritos na metodologia. A análise de clusters resultou na formação de dois grandes clusters. O cluster 1 agrupou a saliva e áreas revestidas de mucosa: palato, assoalho da boca, vestíbulo e bochechas. O segundo cluster agrupou o tecido duro e muscular (último molar, língua ventral e língua dorsal).

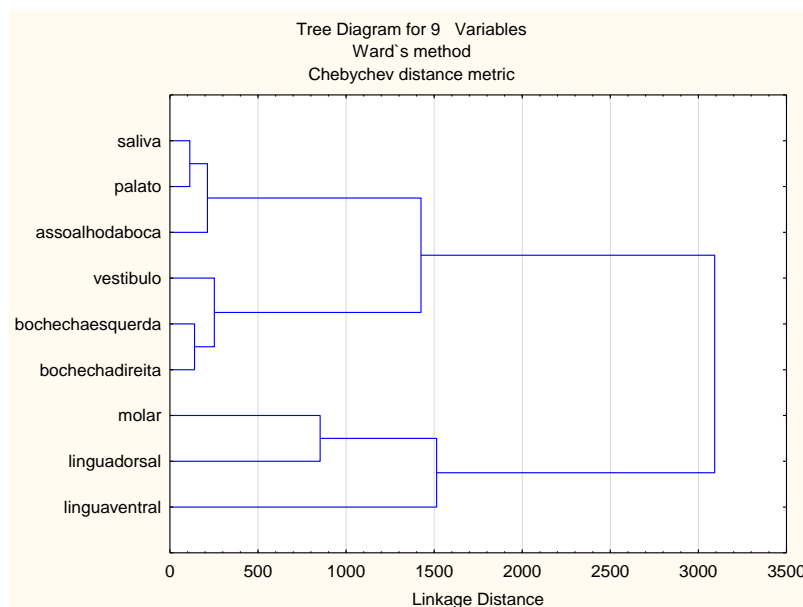


Figura 6. Dendrograma gerado pela análise de agrupamento, mensurando a semelhança entre espécies de micro-organismos, abundância e os habitats do ecossistema bucal.

O resultado disposto na Figura 6 demonstra que dois grandes grupos formados: um primeiro grupo, com maior semelhança, mostrou perfil leveduriforme similar entre a saliva, palato e tecidos moles e o grupo número 2 agrupou o dente e a língua da cavidade bucal (último molar, língua dorsal e ventral).

Estas diferenças entre a abundância de micro-organismos e sua relação com os habitats de um mesmo ecossistema bucal já foram focos de alguns estudos com bactérias desenvolvidos na última década (Mager et al., 2003; Socransky & Haffajee, 2005; Dupuy et al., 2014; Eren et al., 2014). Em pesquisas lideradas pelo Dr Socransky (Mager et al., 2003; Socransky & Haffajee, 2005) já foi demonstrado que além da abundância distinta entre habitats bucais, há também diferenças nas frequências de gêneros bacterianos entre indivíduos de nacionalidades diferentes.

4.2.1 Cluster 1 – saliva, palato/assoalho + bochechas, vestíbulo

Avaliando os micro-organismos encontrados em cada local de coleta, fica claro que o primeiro *cluster* foi agrupado pela semelhança na frequência de cada espécie em cada habitat. Isso porque os habitats deste primeiro cluster não apresentaram colonização exatamente pelas mesmas espécies, como visualizado na Figura 5 (A, B, C). Além das três espécies que colonizaram todo ecossistema (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*), alguns habitats apresentaram também *C. glabrata* (palato), *M. guilliermondii* (assoalho e ambas bochechas). Avaliando estes dados, sugere-se que a carga leveduriforme pode ter sido o principal elo de semelhança entre estes *clusters*.

Em estudo que utilizou técnica de oligotipagem no microbioma bucal, Eren e colaboradores (2014) descreveram semelhança nas comunidades bacterianas do dorso da língua, tonsilas palatinas, garganta, palato e saliva. Mesmo que tenham observado espécies distintas em cada habitat, encontraram também, em congruência aos nossos achados, cargas de micro-organismos semelhantes, quando do mesmo gênero, nos diferentes locais

apontados.

A colonização destes habitats também foi semelhante ao comportamento observado em bactérias do gênero *Streptococcus* por Mager e colaboradores (2003), onde quatro espécies deste gênero apresentaram proporções semelhantes nos tecidos moles e saliva de pacientes também saudáveis, porém, diferentes das demais regiões da boca avaliadas, como observado nestas leveduras no corrente estudo. Ainda avaliando os estudos de Mager et al. (2003), se compararmos a distribuição de espécies de leveduras apontada em nossa pesquisa com seus resultados em bactérias, percebe-se que *C. albicans* se comportou da mesma forma que *S. mitis*, já que ambos micro-organismos tiveram a capacidade de colonizar todos os habitats bucais e com abundância predominante.

O grupamento similar de micro-organismos nas bochechas e vestibulo pareceu ser relacionado ao epitélio mucoso de revestimento idêntico nestes locais. Apesar de ser revestido por mucosa, o palato é formado por epitélio não queratinizado, diferindo-se destes locais em sua composição e, por isso, não agrupando com maior similaridade com estas estruturas.

A disposição física destes habitats também pode ter colaborado para este resultado, já que são habitats conectados continuamente pela sua composição tecidual. Essas justificativas também se aplicam à equiparidade de carga leveduriforme e variabilidade verificados nas duas bochechas, onde há área e composição equivalentes. Na pesquisa conduzida por Socransky e Haffajee (2005), a microbiota bacteriana dos tecidos moles foi semelhante às

bactérias encontradas na placa gengival e subgengival, o que reforçaria essa hipótese histológica.

Já o dorso da língua e o palato duro entram em contato centenas de vezes por dia e ainda assim esses habitats não apresentaram características de colonização análogas entre si, conforme as Figuras 5 e 6. Novamente, estes resultados se mostram congruentes ao observado nas bactérias (Socransky & Haffajee, 2005), onde os micro-organismos que colonizaram estas superfícies também foram radicalmente diferentes em abundância e proporções de espécies nestes habitats.

Ao analisarmos detalhadamente o cluster que agrupou estas estruturas, verificam-se dois pequenos grupos com maior similaridade foram ligados. Um deles demonstra similaridade entre a comunidade de *Candida* entre a saliva e o palato. Neste caso a semelhança deve-se ao fato dos dois habitats, diferentemente dos demais agrupados neste cluster, não apresentarem colonização por *Meyerozyma guilliermondii*. Contraditoriamente, a saliva mostrou-se com colonização mais próxima ao dorso da língua nos estudos conduzidos com bactérias no ano 2003 (Mager et al., 2003).

Outro grupamento de maior semelhança no cluster apresentado foi o das bochechas esquerda e direita. Considerando que estes habitats apresentaram as mesmas espécies, a paridade foi baseada na analogia da carga leveduriforme, que foi praticamente idêntica (média aproximada do número de leveduras em cada indivíduo).

4.2.2 Cluster 2 – Língua e último molar

O cluster que uniu o último molar, língua dorsal e língua ventral foi ligado pela diferenciação de espécies, já que este grupo apresentou duas espécies que não foram encontradas nos habitats do cluster 1. As espécies *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* estiveram intimamente relacionadas a este grupamento. Apesar de serem capazes de colonizar a língua dorsal e ventral concomitantemente com todas as outras espécies identificadas neste estudo, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* mostraram-se inábeis em fixar-se em outros sítios do ecossistema bucal.

Contudo, as espécies que colonizaram o tecido duro (último molar) foram capazes de colonizar também os habitats revestidos por mucosa ou tecidos moles, diferente das observações de Mager e colaboradores (2003), que, mesmo de forma tímida, verificaram colonização distinta de bactérias nestas áreas da boca.

A boca é uma única parte do corpo que contém tecidos mineralizados expostos (sob a forma de dentes). Estudos demonstraram que as células de *C. albicans* não têm propriedades de adesão que permitam ligar-se a um dos componentes destes tecidos (hidroxiapatita cristalina), o que só seria possível por meio da lâmina salivar que recobre os habitats bucais (Cannon & Chaffin, 1999). Neste sentido, a variabilidade de espécies do habitat dental e da saliva deveria ser a mesma, porém este dado não foi confirmado na presente pesquisa. A colonização do último molar apresentou a levedura *M. guilliermondii*, o que não foi observado na saliva.

O tropismo específico das espécies *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* pela língua apresentado nestes resultados já foi justificado fisiologicamente por Eren e colaboradores (2014), em estudo do microbioma bucal. Segundo eles, micro-organismos de um mesmo gênero, porém de espécies diferentes, podem ter uma localização espacial na boca drasticamente diferente.

Como ponto comum, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* são produtoras de biofilme e são as únicas espécies, além de *C. albicans*, capazes de produzirem hifas verdadeiras (Lamont & Jenkinson, 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo* comprovaram que *C. dubliniensis* demonstra essas capacidades, mas de forma bem menos eficiente do que *C. albicans*, o que explicaria a menor colonização de habitats observada pela primeira espécie citada (Lamont & Jenkinson, 2010; Moran et al., 2012; Paula et al., 2014). A incapacidade de *C. dubliniensis* suportar temperaturas elevadas também é um fator que inibe sua habilidade de colonizar certas áreas.

A virulência de *C. dubliniensis* tem sido aceita cientificamente. Em 2014, Mukherjee e colaboradores, avaliando o microbioma de pacientes infectados e não infectados pelo HIV, afirmaram que, após *C. albicans*, *C. dubliniensis* é a espécie mais recorrente tanto na boca de pacientes imunocomprometidos quanto nas dos indivíduos normais.

Buscando comparar a produção de fatores de virulência *in vitro* de espécies patogênicas do gênero *Candida*, Rörig e colaboradores (2009) avaliaram três isolados de cada espécie de interesse e demonstraram que um isolado de *C. tropicalis* e de *C. dubliniensis* tiveram capacidades idênticas de

produzir fosfolipase, amilase e proteinase, diferindo somente na temperatura de crescimento. Estudos recentes foram capazes de apontar outras semelhanças entre as duas espécies associadas no habitat da língua dorsal. Avaliando leveduras oriundas da cavidade bucal de pacientes infectados pelo HIV, por exemplo, pesquisadores verificaram que *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* se mostraram resistentes aos antifúngicos e com comportamento hidrofóbico (Paula et al., 2014)

4.3 Carga leveduriforme

A característica do gênero *Candida* que promove sua manifestação infecciosa de forma oportunista também está relacionada com a quantidade de elementos leveduriformes colonizando o ambiente bucal (Kraneveld et al., 2012).

A colonização na cavidade oral foi distinta entre os sexos. O número de colônias totais isoladas foi expressivamente menor nos homens quando comparado às mulheres: 38 colônias ante a média de 130 colônias, respectivamente, conforme a figura 7, que apresenta um gráfico de barra de erro que mostra a média e os intervalos de confiança de 95% da média.

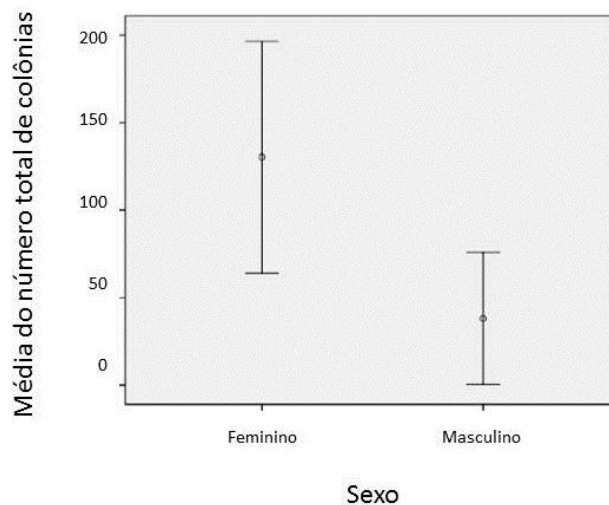


Figura 7: Colonização total média em homens e mulheres.

Os dentes molares e a língua dorsal foram os locais de maior colonização nos indivíduos do sexo feminino, de forma bastante díspar perante aos demais locais coletados, como é demonstrado na Tabela 6. Já nos participantes do sexo masculino a colonização teve distribuição mais uniforme, com maior número de colônias na língua dorsal, palato e saliva.

Tabela 6. Total de indivíduos que apresentaram maior número de colônias no referido habitat, de acordo com o gênero.

Habitat	Número de indivíduos	
	Feminino	Masculino
Saliva	5	5
Último Molar	21	4
Vestíbulo	9	1
Palato	9	5
Língua dorsal	20	10
Língua ventral	10	4
Bochecha Esquerda	14	2
Bochecha Direita	13	4
Assoalho da boca	7	0
Total:	49 indivíduos	

Kraneveld e colaboradores (2012), avaliando a carga de micro-organismos do gênero *Candida* em idosos holandeses, verificaram correlações entre a quantidade totais de leveduras presentes na saliva e bactérias presentes no microbioma bucal. Um aumento na carga de *Candida* foi relacionado com o aumento de *Bacillus* e com a diminuição de bactérias dos gêneros *Fusobacteria*, *Flavobacteria* e *Bacteroidia*. Com base nessas descobertas, os autores concluíram que grandes cargas de *Candida* inibem a diversidade bacteriana e favorecem o predomínio de bactérias do gênero *Streptococcus*, desequilibrando o ecossistema da boca.

Também catalogando a abundância de *Candida* no microbioma bucal, Socransky & Haffajee (2005) verificaram que a quantidade de micro-organismos totais foi maior em pacientes com doença periodontal do que nos indivíduos com o perionto saudável.

Ao relacionar o número de colônias isoladas entre as mulheres que utilizavam anticoncepcional oral e as não usuárias deste tipo de contraceptivo do nosso estudo, verificou-se uma diminuição gradativa no número total de colônias proporcionalmente ao aumento do tempo de uso do contraceptivo. Isto é: quanto mais tempo de uso do medicamento, menos colônias foram detectadas, conforme o resultado de testes de análise de frequência multivariada (Figura 8).

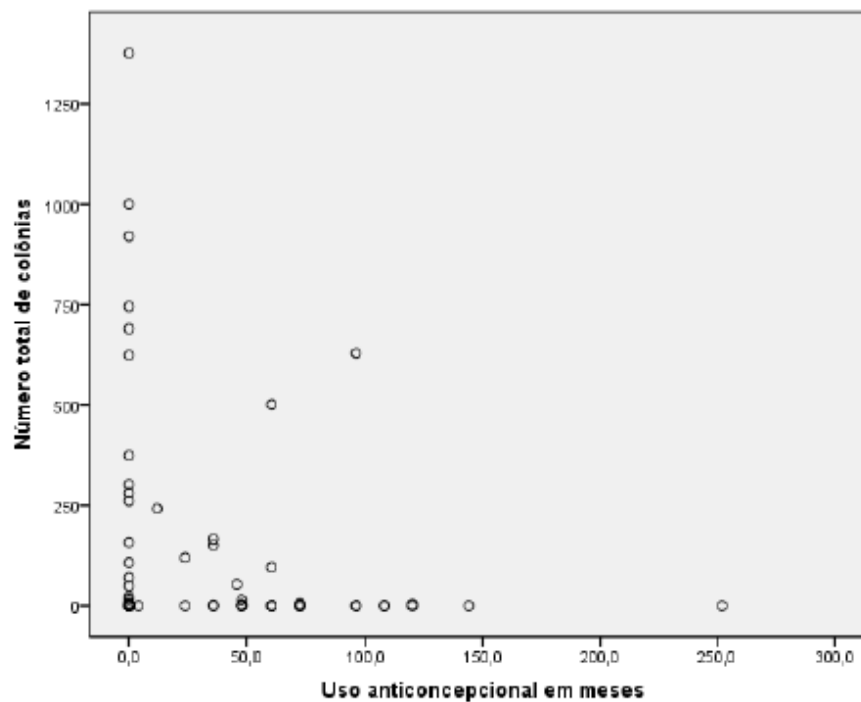


Figura 8: Histograma da relação entre o número de colônias de *Candida* spp. entre usuárias e não usuárias de anticoncepcional oral.

Não há registros na literatura que sugerem associação direta entre o uso de anticoncepcional e candidíase oral ou colonização leveduriforme na mucosa bucal. Porém, o conhecimento científico consolidado é que em condições mórbidas diversas e na dependência de fatores locais, eleva-se a incidência de micro-organismos do gênero *Candida* no organismo. Assim, casos de endocrinopatias podem causar predisposição à colonização por estas leveduras. Os desequilíbrios de origem hormonal biodisponibilizam maiores quantidades de glicose nos tecidos, e a adição do açúcar ao meio onde está a colonização leveduriforme reativa o crescimento da *Candida* (Martins & Lacaz, 1980).

Neste sentido, um fator que poderia estar ligado ao grande número de colônias isoladas no início do tratamento anticoncepcional é a incidência da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), distúrbio endócrino feminino extremamente comum em adultos na idade reprodutiva (Yarak et al., 2005; Erol et al., 2014; Sirmans & Pate, 2014). Nesta Síndrome, a resistência à insulina – e consequente tolerância glicêmica aumentada – parece ser um dos mecanismos fisiopatológicos principais do problema. Além disso, ela pode desencadear alteração no metabolismo do cortisol, resultando em baixa imunidade e maior suscetibilidade ao desenvolvimento de *Candida* (Yarak et al., 2005; Sirmans & Pate, 2014).

Considerando que a primeira linha de tratamento da SOP é o uso de anticoncepcionais, mas também trabalhando com a premissa de que as participantes do estudo são saudáveis e sofrem oscilações hormonais em seu ciclo menstrual normalmente, poderíamos sugerir que a associação inversa entre o número de colônias de *Candida* encontradas e o tempo de uso de anticoncepcional pelas participantes do estudo pode ter emergido em decorrência de uma estabilização hormonal nos habitats coletados ao longo do tempo de utilização do medicamento. Ao administrar os hormônios uma dose regular é ingerida, o *feedback* negativo do sistema endócrino ajustaria-se para esta quantidade de hormônio administrada, anulando as grandes oscilações destes metabólitos hormonais nestes indivíduos, principalmente através de regulação das adrenais (Yarak et al, 2005; Sirmans & Pate, 2014).

Porém, de forma contraditória a este raciocínio, estudos relatam que a utilização prolongada de alguns agentes terapêuticos predispõe ao

aparecimento das candidíases, incluindo o uso de anticoncepcional (Martins & Lacaz, 1980).

Nestes domínios apresentados e visualizando a discussão dos resultados demonstrados, abrimos precedentes para inúmeras perspectivas dentro deste trabalho:

- A avaliação das espécies de *Candida* na boca frente à hormonioterapia poderia explicar o fenômeno fisiológico de resposta das leveduras na utilização de anticoncepcionais;
- Ponderando que a similaridade entre habitats intrabuciais deste estudo foi constatada principalmente na proporção das espécies e não da diversidade de micro-organismos, a complexidade da distribuição espacial pode ser melhor avaliada através da interação das leveduras *Candida* com outros gêneros de leveduras;
- Apesar das evidências científicas exporem características que relacionam *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, fazem-se necessários estudos direcionados a estas duas espécies para melhor entender os mecanismos que levaram à sua associação ou tropismo pelo habitat da língua dorsal.

5. CONCLUSÕES

Num momento da ciência que a metagenômica conduz o microbioma humano e ambiental a novos percursos, a microbiota leveduriforme que compõe a cavidade bucal de indivíduos saudáveis tem sido pouco explorada. Nossos resultados introduzem a dimensão espacial desta diversidade microbiana que vem sendo estudada, complementado as informações obtidas nos estudos do microbioma humano. Neste sentido, listamos as principais conclusões e contribuições deste trabalho:

- *Candida albicans* foi o micro-organismo mais prevalente no presente estudo, seguido de *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*.
- A associação entre as leveduras encontradas e os habitats bucais sugeriu que comunidades leveduriformes podem distinguir-se entre os diferentes locais da cavidade bucal. A principal contribuição em definir o ecossistema bucal normal é a capacidade de correlacionar associações específicas com as doenças humanas.
- As espécies *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* apresentaram tropismo específico pelo tecido lingual.

- A microbiota dos habitats revestidos por mucosa foi análoga.
- A microbiota da língua e dos tecidos duros assemelhou-se entre si em menor intensidade.
- Mulheres apresentaram maior carga leveduriforme de *Candida* em relação aos indivíduos do sexo masculino.
- Houve uma relação inversamente proporcional entre o tempo de utilização de anticoncepcional oral e o número de colônias de *Candida*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas JA, et al. **Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity.** J. Clin. Microbiol. 2005, 43(11):5721.

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8 – Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica.** 2013: Disponível em > <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/5bec2d004e257546b098b3c09d49251b/M%C3%B3dulo+8+%E2%80%93+Detec%C3%A7%C3%A3o+e+identifica%C3%A7%C3%A3o+de+fungos+de+import%C3%A2ncia+m%C3%A9dicapdf?MOD=AJPERES> <

ANVISA. **Tecnologia em Serviços de Saúde: Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos.** 2006: M2 - I – 3; M2-C1-5. Disponível em > http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/manual_testes_antimicrobianos.pdf <

Araújo, CR et al. **Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno Chromagar *Candida*.** Revista de Patologia Tropical. Vol. 34 (1): 37-42. jan.-abr (2005).

Barbot V, et al. **Saliva promotes survival and even proliferation of *Candida* species in tap water.** FEMS Microbiol Lett. 2011 Nov;324(1):17-20.

Beighton D, et al. **Use of CHROMagar *Candida* Medium for Isolation of Yeasts from Dental Samples.** Journal of Clinical Microbiology, Nov. 1995, p. 3025–3027 Vol. 33, No. 11.

Berezow, AB ; Darveau, RP. **Microbial Shift and Periodontitis.** Periodontol 2000. 2011 February ; 55(1): 36–47.

Cannonl, RD ; Chaffin, WL. **Oral colonization by *Candida albicans*.** Crit Rev Oral Biol Med 10(3):359-383 (1999).

Cho, T et al. **Importance of Diversity in the Oral Microbiota including *Candida* Species Revealed by High-Throughput Technologies.** International Journal of Dentistry. Volume 2014, Article ID 454391, 1-5.

Daef et al. **Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species.** Brazilian Journal of Microbiology 45, 1, 255-262 (2014)

Dewhirst FE, et al. **The Human Oral Microbiome.** J. Bacteriol. 2010, 192(19):5002.

Domaneschi , et al. **Oral colonization by *Candida* species in AIDS pediatric patients.** Oral Dis. 17: 393-398 (2011).

Diaz, PI et al. **Bacterial diversity in the oral cavity.** Molecular Oral Microbiology 27 (2012) 182–201.

Dupuy AK, et al. **Redefining the Human Oral Mycobiome with Improved Practices in Amplicon-based Taxonomy: Discovery of *Malassezia* as a Prominent Commensal.** PLoS ONE 9(3): e90899 (2014).

Eren, AM et al. **Oligotyping analysis of the human oral microbiome.** PNAS, 2014, 111(28): E2875–E2884

Erol N et al. **Kounis syndrome in PCOS.** World J Cardiol 2014 December 26; 6(12): 1285-1289 ISSN 1949-8462

Furlaneto-Maia L, et al. **In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals.** Mycopathologia 2008; 166: 209-217.

Gasparetto et al. **Produção de biofilme por leveduras de cavidade bucal.** Acta Sci. Health Sci.. Maringá, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005.

Ghannoum, MA et al. **Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals.** PLoS Pathog 6(1): e1000713 (2010).

Haffajee AD, et al. **Microbial complexes in supragingival plaque.** Oral Microbiol Immunol 2008: 23: 196–205

He, X-S and Shi, W-Y. **Oral Microbiology: Past, Present and Future.** International Journal of Oral Science, 1(2): 47–58, 2009.

Kolenbrander, PE et al. **Oral multispecies development and the key role of cell – cell distance**. Nature Reviews, Microbiology Vol. 8, July 2010, 471-480.

Kraneveld EA, et al. **The Relation between Oral Candida Load and Bacterial Microbiome Profiles in Dutch Older Adults**. PLoS ONE 7(8): e42770 (2012).

Lamont, RJ ; Jenkinson, HF. **Oral microbiology at a glance**. Wiley-Blackwell, 2010, 14a ed.

Liguori, G et al. **Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR**. J Clin Pathol 2007;60:1035–1039.

Machado AG, et al. **In vitro adherence of *Candida albicans* isolated from patients with chronic periodontitis**. J. Appl. Oral Sci. 384-387 (2010).

Mager et al. **Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces**. J Clin Periodontol. 2003 Jul;30(7):644-54.

Marcotte, H; Lavoie, MC. **Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998, 62(1):71.

Marsch, PD ; Martin, MV. **Oral Microbiology**. Elsevier, 5a ed, 2009.

Martins ACM, et al. **Prevalence of yeast species in the oral cavity and its relationship to dental caries**. Acta Scientiarum. Health Sciences: Maringá, v. 33, n. 1, p. 107-112, 2011.

Martins, LEC ; Lacaz, CS. **Etiopatogenia e aspectos clínicos das candidíases superficiais e cutâneo-mucosas**. Rev. Med., vol 62, nº 2:24 a 26, 1980.

Merseguel KB, et al. **Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection**. BMC Infectious Diseases (2015) 15:57

Moran GP, et al. ***Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic?** International Journal of Microbiology, Volume 2012, Article ID 205921.

Mukherjee PK et al. **Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of *Pichia* as an Antagonist of Opportunistic Fungi.** PLoS Pathog 10(3): e1003996 (2014).

Murray MP, et al. **CHROMagar *Candida* as the Sole Primary Medium for Isolation of Yeasts and as a Source Medium for the Rapid-Assimilation-of-Trehalose Test.** Journal of Clinical Microbiologu, Mar. 2005, p. 1210–1212.

Nweze EI ; Ogonnaya UL. **Oral *Candida* isolates among HIV-infected subjects in Nigeria.** J Microbiol Immunol Infect. 2011 Jun;44(3):172-7

O'Donnell, K et al. **Fusarium and its near relatives in The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation.** In: Fungal Systematics, eds Reynolds DR& Taylor JW (2013), pp. 225–233.

Paula SB, et al. **Effect of Eugenol on Cell Surface Hydrophobicity, Adhesion, and Biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* Isolated from Oral Cavity of HIV-Infected Patients.** Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2014, Article ID 505204, 8 pages.

Ramírez-Castrillón, M et al. **(GTG)5 MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts?** PLoS ONE 9(8): e105870 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0105870

Rangel, AL. **Aderência de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* na superfície da língua de ratos normais e xerostômicos.** Piracicaba, SP: [s.n.], 2001.X, 63f : iJ.

Rörig KCO et al. **Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 42(2):225-227, mar-abr, 2009.

Samaranayake, L. **Essential microbiology for dentistry.** Elsevier, 4th ed, 2013.

Sanitá PV, et al. ***Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis.** Oral. Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. 111: 726-733 (2011).

Silva, PV et al. **The dental number influence on daily performance.** RFO, v. 12, n. 3, p.13-17, setembro/dezembro 2007.

Socransky S.S. ; Haffajee A.D. **Periodontal microbial ecology.** Periodontology 2000, Vol. 38, 2005, 135–187.

Socransky SS, et al. **Microbial complexes in subgingival plaque.** J Clin Periodontol. 1998 Feb;25(2):134-44.

Williams, D ; Lewis, M. **Pathogenesis and treatment of oral Candidosis.** Journal of Oral Microbiology 2011, 3: 5771.

Williams DW, et al. **Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention.** Periodontology 2000 , 2011, 55: 250-265.

Wu, CJ et al. **Oropharyngeal yeast colonization in HIV-infected outpatients in southern Taiwan: CD4 count, efavirenz therapy and intravenous drug use matter.** Clin Microbiol Infect. 2012 May;18(5):485-90.

Yarak, S et al. **Hiperandrogenismo e pele: síndrome do ovário policístico.** An Bras Dermatol. 2005; 80(4):395-410.

Zarco, MF et al. **The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine.** Oral Diseases (2012) 18, 109–120.


Zimbro MJ et al. **Manual of Microbiological Culture Media - Difco & BBL Manual.** 2nd edition, 2009: 142-143.

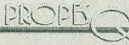
Zhou et al. **Biogeography of the ecosystems of the healthy human body.** Genome Biology 2013, 14:R1.

Zhou et al. **Exploration of bacterial community classes in major human habitats.** Genome Biology 2014, 15:R66.

7. ANEXOS

Anexo 1. Documento de aprovação do comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

 **UFRGS** **PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL **Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs**



CARTA DE APROVAÇÃO

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

Número: 18147
Título: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS EMERGENTES ISOLADOS NO SUL DO BRASIL

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

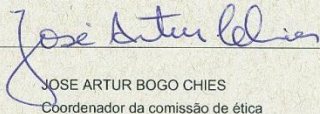
ALEXANDRE MENEGHELLO FUENTEFRIA - coordenador desde 01/03/2010
ADELINA MEZZARI - pesquisador desde 01/03/2010
PATRICIA VALENTE DA SILVA - pesquisador desde 01/03/2010

Equipe Externa:

Sydney Hartz Alves - pesquisador desde 01/03/2010

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 16/12/2010 - Sala de Reuniões do 3º andar da PROPLAN, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 16 de Dezembro de 2010


JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética

1

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido oferecido aos voluntários do estudo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Composição de espécies de leveduras na microbiota normal da cavidade bucal de pacientes aparentemente saudáveis”. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador (a) ou com a instituição.

Este estudo tem como objetivo avaliar as leveduras normalmente presentes na boca humana. O projeto possibilitará a coleta de informações que poderão posteriormente ser utilizadas para avaliação de risco de desenvolvimento de doença periodontal em que leveduras possam estar envolvidas.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em submeter-se a coleta de material da boca (saliva, gengiva, bochecha e dente), sendo o material coletado com cotonetes, submeter-se a uma análise clínica odontológica e responder a questionário sobre idade, uso de dentaduras, uso de inaladores com esteroides, uso de anticoncepcionais, fluxo salivar, doenças e medicações ingeridas.

Na coleta serão utilizados materiais esterilizados e a mesma será realizada por profissional da área odontológica. Os riscos são mínimos, visto que a coleta será realizada com cotonete, o que não causará dor nem desconforto.

Não haverá custos para o participante.

As informações contidas nesta pesquisa serão confidenciais e asseguramos sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Você receberá uma cópia deste termo, onde constam endereço e telefone do pesquisador, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Declaro que li e entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Pesquisador responsável: Dra. Maria Lúcia Scroferneker
Laboratório de Micologia (lab. 210). Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Sarmiento Leite 500. Centro. Porto Alegre – RS Tel: 51-33083934

Comissão de Ética em Pesquisa da UFRGS. Tel: 51-3308-3738

Anexo 3. Questionário com termos de inclusão e exclusão dos participantes da pesquisa.

Informações do paciente

Data da coleta: ____/____/____ Primeiro nome: _____

Telefone para contato: _ (____) _____

Data de Nascimento/idade: ____/____/____ ____ anos

Sexo: feminino masculino

Número de dentes (no mínimo 20): _____

Há evidência de doença odontológica? periodontite, candidíase, tumores...

Sim Não

Itens para inclusão

O Sr(a) já participou do presente estudo? Sim Não

Utiliza prótese total, removível ou aparelho ortodôntico? Sim Não

Faz uso de inaladores com corticóides? Sim Não

Apresenta xerostomia? Sim Não

É portador de Diabetes? Sim Não

É portador de doença ou condições que causam imunossupressão?

Aids/ HIV Uso de corticoesteróides Doença de Cushing
 Transplantado Quimioterapia e radioterapia Lupus Outro. Qual?

Está administrando antibiótico ou antifúngico? Sim Não

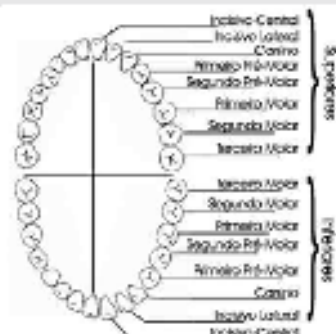
Usou uma destas duas classes de medicamentos nos últimos 3 meses?

Sim Não

Utiliza anticoncepcional hormonal?

Medicamentoso Injetável Adesivo tempo: _____

Observações



Anexo 4. Lista de micro-organismos representativos provenientes deste estudo.

Isolado	Área coletada	Coloração	
		Chromagar	Candida
Identificação			
2 ^a	Vestíbulo labial	Verde	<i>Candida albicans</i>
2B	Língua dorsal	Verde	<i>Candida albicans</i>
2C	Molar	Verde	<i>Candida albicans</i>
2D	Bochecha Esquerda	Verde	<i>Candida albicans</i>
2E	Molar (placa duplicata)	Verde	<i>Candida albicans</i>
2F	Bochecha direita	Verde	<i>Candida albicans</i>
2G	Língua ventral	Verde	<i>Candida albicans</i>
3 A	Língua ventral	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
3B	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
3C	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
3D	Língua dorsal	Marrom claro	<i>Meyrozyma guilliermondii</i>
3E	Língua dorsal	Marrom escuro	<i>Meyrozyma guilliermondii</i>
3F	Bochecha direita	Verde médio/escuro	<i>Candida albicans</i>
3G	Bochecha esquerda	Verde médio/escuro	<i>Candida albicans</i>
3H	Vestíbulo labial	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
3I	Assoalho da boca	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
3J	Bochecha direita (duplicata)	Verde médio/escuro	<i>Candida albicans</i>
3L	Bochecha esquerda (duplicata)	Verde escuro	<i>Candida albicans</i>
3M	Língua ventral (duplicata)	Verde escuro	<i>Candida albicans</i>
3N	Molar (duplicata)	Verde escuro	<i>Candida albicans</i>
3 O	Vestíbulo labial (duplicata)	Verde escuro	<i>Candida albicans</i>

3P	Língua dorsal (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
3Q	Língua dorsal (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
3R	Assoalho da boca (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
4A	Vestíbulo labial	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
5A	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
5B	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
5C	Palato	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
6 A	Palato	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
6B	Bochecha Direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
6E	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
6F	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
7 A	Língua dorsal (duplicata)	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
7B	Saliva	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
7C	Língua dorsal	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
8 A	Saliva	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
8B	Palato	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
8C	Assoalho da boca	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
8D	Molar (duplicata)	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
8E	Molar (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
8F	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
8G	Língua ventral	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
8H	Bochecha esquerda	Verde escuro	<i>Candida albicans</i>
8I	Bochecha esquerda (duplicata)	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
8J	Língua dorsal	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
8L	Língua dorsal (duplicata)	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
8M	Língua dorsal (duplicata)	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>

10 A	Saliva	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10B	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10C	Vestíbulo labial	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10D	Língua ventral (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10E	Assoalho da boca	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10F	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10G	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10H	Bochecha direita	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
10I	Palato	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
13 A	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
14 A	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
14B	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
14C	Língua dorsal (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
14D	Língua ventral	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
14E	Palato (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
14F	Bochecha direita	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
15 A	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
15B	Palato	Rosa claro	<i>Candida krusei</i>
15C	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
16 A	Palato	Rosa claro	<i>Candida krusei</i>
17 A	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
19 A	Bochecha direita	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
19 B	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
24 A	Saliva	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
24B	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
24C	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
24D	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>

24E	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
24F	Língua ventral	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
25 A	Língua dorsal	Azul escuro	<i>Candida tropicalis</i>
26 A	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
26B	Molar (duplicata)	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
26C	Palato	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
27 A	Palato	Rosa/lilás	<i>Candida krusei/glabrata</i>
31 A	Bochecha esquerda	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
31B	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
31C	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
31D	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
31E	Bochecha direita (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
36 A	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
36B	Língua ventral	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
36C	Língua ventral (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
38 A	Palato	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
38B	Saliva	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
38C	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
38D	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
41 A	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
41B	Língua dorsal (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
41C	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
42 A	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
42B	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
42C	Palato	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
43 A	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>

43B	Palato	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
43C	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
43D	Bochecha esquerda	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
44 A	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
44B	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
47 A	Saliva	Rosa	<i>Candida krusei</i>
48 A	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
48B	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49 A	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49B	Palato	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49C	Saliva	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49D	Assoalho da boca	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49E	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49F	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
49G	Língua ventral	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
50 A	Bochecha esquerda	verde médio	<i>Candida albicans</i>
50B	Vestíbulo labial	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
50C	Bochecha direita	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
55 A	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
55B	Vestíbulo labial	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
55C	Vestíbulo labial (duplicata)	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
55D	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
55E	Bochecha direita	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
55P	Palato	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
55Q	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
57 A	Língua ventral	Azul escuro	<i>Candida tropicalis</i>
57B	Língua dorsal (duplicata)	Azul escuro	<i>Candida tropicalis</i>

57C	Língua dorsal (duplicata)	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
60 A	Molar	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
61B	Língua ventral	Lilás	<i>Candida glabrata</i>
61C	Saliva	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
61D	Vestíbulo labial	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
66 A	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
67 A	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
69 A	Molar	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
69B	Língua ventral	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
69C	Vestíbulo labial	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
69D	Assoalho da boca	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
69E	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
69F	Língua dorsal	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
69G	Bochecha esquerda	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
71 A	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
72 A	Vestíbulo labial	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
72B	Molar	Creme	<i>Candida parapsilosis</i>
74 A	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
76 A	Bochecha direita	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
76B	Molar	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
76C	Saliva	Verde claro	<i>Candida albicans</i>
76D	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
76E	Bochecha esquerda	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
77 A	Língua ventral	Rosa claro	<i>Candida Krusei</i>
85 A	Língua dorsal	Lilás	<i>Candida glabrata</i>
89 A	Língua dorsal	Verde malva	<i>Candida dublieniensis</i>
89B	Língua ventral	Verde malva	<i>Candida dublieniensis</i>

90 A	Assoalho da boca	Lilás	<i>Candida glabrata</i>
91 A	Assoalho da boca	Rosa claro	<i>Candida Krusei</i>
91B	Bochecha esquerda	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
91C	Língua dorsal	Verde médio	<i>Candida albicans</i>
91D	Molar	Rosa claro	<i>Candida Krusei</i>
96 A	Língua dorsal	Rosa claro	<i>Candida Krusei</i>

8. VITA

8.1 DADOS PESSOAIS

Nome: Carla Zanelatto

Endereço: Rua Saldanha Marinho, 649 apto 103, centro de Bento Gonçalves – RS, Brasil.

Telefone: (54) 9151-4979; (54) 3451 - 1089

E-mail: zanelatto.carla@gmail.com

8.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

- | | |
|-------------|---|
| 2013 – 2015 | Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS,
Brasil |
| 2010 | Aperfeiçoamento técnico no Departamento de Hematologia
do Centro Hospitalar de Coimbra
Universidade de Coimbra, UC, Coimbra, Portugal |
| 2002 – 2008 | Bacharelado em Biomedicina.
Universidade Feevale |

8.3 PRODUÇÃO CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA, ARTÍSTICA E CULTURAL

8.3.1 Resumo em anais de eventos

ZANELATTO, C.; MATTANNA, P.; RÖSING, C.; SCROFERNEKER, M.L.; SILVA, P.V. Diversidade e distribuição de leveduras da cavidade bucal de indivíduos saudáveis. In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada; III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada; IX Encontro Nacional de Estudantes de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola; XI Fórum dos Coordenadores dos Programas de Pós Graduação em Microbiologia da Área Agrícola, 2014.

SETER, L.; STIVAL, M.; LIPRERI, A.; **ZANELATTO, C.;** SILVA, da . Produção de toxinas killer em diferentes meios de cultivo e pH. In: I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008, Porto Alegre. Anais do I Encontro Gaúcho de Micologia, 2008.

ZANELATTO, C. ; WAGNER, S. C. ; KRAMER, A. ; DERESZ, L. F. ; LAZZAROTTO, A. R. ; SPRINZ, E. . Avaliação do perfil hematológico de pacientes HIV-1 em TARV em um treinamento concorrente com séries simples. In: I Congresso Internacional de Bioanálises, 2008, Novo Hamburgo. I Congresso Internacional de Bioanálises, 2008.

ZANELATTO, C. ; WAGNER, S. C. ; BEZ, M.R ; CARVALHO, J. V. ; LAZZAROTTO, A. R. . TREINAMENTO CONCORRENTE COM SÉRIES SIMPLES EM PACIENTES HIV POSITIVO: AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA. In: 6º Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2007, Florianópolis - SC. Anais 6º Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde - Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde, 2007.

MIRANDA, C. L. ; **ZANELATTO, C.** . HELP - PORTAL DE PRESCRIÇÃO DE EXERCÍCIOS FÍSICOS PARA PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS. In: 6º Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde, 2007, Florianópolis. Anais do 6º Congresso Brasileiro de Atividade Física e Saúde - Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde, 2007.

8.3.2 Textos de jornais e revistas

2008 – 2012 Editora da página de saúde de periódico bissetimanal
Jornal Gazeta, Bento Gonçalves, RS, Brasil

8.3.3 Outros tipos de produção técnica

2014 Revisão de artigo científico "*Effect of some culture extracts of Aspergillus oryzae on dehulling properties of pigeon pea (Cajanus cajan L.)*"
African Journal of Microbiology Research, Lagos, Nigéria, África

2011 Ministrante de palestra de Deontologia
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

2011 Ministrante de curso de extensão de interpretação de básica do hemograma para profissionais da saúde
Faculdade da Serra Gaúcha, Caxias do Sul, RS, Brasil

- 2011 Ministrante de curso de extensão de interpretação de exames de bioquímica
Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2011 Ministrante de curso de extensão de hormônios
Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2011 Ministrante de curso de extensão de interpretação de exames laboratoriais
Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2011 Ministrante de curso de extensão de interpretação de exames laboratoriais, coleta e problemas pré analíticos
Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2011 Ministrante de curso de extensão de interpretação de exames de imunologia
Faculdade Cenecista de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2010 Ministrante de curso de extensão de hemograma e exames laboratoriais
Associação Brasileira de Odontologia, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2009 Coordenação técnica científica de projeto de Saúde Preventiva (Boas Práticas – Agrotóxicos com Segurança)
Associação dos Produtores Ecológicos de Bento Gonçalves, Bento Gonçalves, RS, Brasil
- 2008 Participação na comissão organizadora do I Encontro Gaúcho de Micologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil