

GILMARA FERREIRA DE ARAÚJO

**LEVEDURAS ISOLADAS DE CÁRIE DENTÁRIA DE PACIENTES
ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE ODONTOLOGIA DO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ – HUOC DA
UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO – UPE- RECIFE-PE-BRASIL**

**RECIFE
2008**

GILMARA FERREIRA DE ARAÚJO

**LEVEDURAS ISOLADAS DE CÁRIE DENTÁRIA DE PACIENTES
ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE ODONTOLOGIA DO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ – HUOC DA
UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO – UPE- RECIFE-PE-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Biologia de Fungos.

**RECIFE
2008**

Araújo, Gilmara Ferreira de

**Leveduras isoladas de cárie dentária de pacientes atendidos no
ambulatório de odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz –
HUOC da Universidade de Pernambuco – UPE – Recife – PE - Brasil /
Gilmara Ferreira de Araújo. – Recife: O Autor, 2008.**

83 folhas: il., fig., táb.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCB. Departamento de Micologia, 2008.**

Inclui bibliografia.

1. Cáries dentárias 2. Leveduras I Título.

**616.314-002 – CDU (2.ed.)
617.67 CDD (22.ed.)**

**UFPE
CCB – 2009- 027**

Ata da Reunião de Prova pública de defesa de Dissertação da aluna **GILMARA FERREIRA DE ARAÚJO**, da área de concentração em **MICOLOGIA APLICADA**, do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos – nível MESTRADO, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

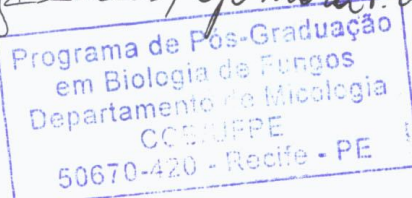
Às nove horas do dia vinte e dois de fevereiro de dois mil e oito, na sala de aulas teóricas da Pós-Graduação em Biologia de Fungos, do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, realizou-se a prova pública de defesa de dissertação apresentada pela mestranda **GILMARA FERREIRA DE ARAÚJO**, sob a orientação da Profa. **LUSINETE ACIOLE DE QUEIROZ**, intitulada: "**LEVEDURAS ISOLADAS DE CÁRIES DENTÁRIAS DE PACIENTES ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE ODONTOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO OSWALDO CRUZ –HUOC DA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO - RECIFE**". Presentes professores, alunos e convidados. A Banca Examinadora, aprovada pelo Diretor de Pós-Graduação da PROPESQ, Dr. **FERNANDO LUÍS DE ARAÚJO MACHADO** em onze de fevereiro de dois mil e oito, foi composta pelos seguintes **membros titulares**: Profa. **LUSINETE ACIOLE DE QUEIROZ**, do Departamento de Micologia, da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Ciências área de Microbiologia e Imunologia, pela Universidade de São Paulo, membro titular interno e orientadora da aluna; **OLIANE MARIA CORREIA MAGALHÃES** da Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Micologia, Doutora em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco, membro titular interno e **MISAEIL SILVA FERREIRA COSTA**, da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Doutor em Biologia de Fungos pela Universidade Federal de Pernambuco, membro titular externo. Como **membros suplentes** os Professores: **CRISTINA MARIA DE SOUZA MOTTA**, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco, e como membro suplente externo **MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA**, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas, Doutora em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal de Pernambuco. A Profa. Leonor Costa Maia iniciou a sessão apresentando os membros da Banca Examinadora, agradecendo a colaboração e a presença de todos. Em seguida convidou a Mestranda para apresentar a sua Dissertação. A seguir, os membros da Banca Examinadora discutiram alguns pontos e fizeram sugestões sobre o trabalho. Procedida a avaliação, a Banca Examinadora atribuiu à Mestranda **GILMARA FERREIRA DE ARAÚJO** a menção: APROVADA COM DISTINÇÃO. Nada mais havendo a tratar, eu, **Giovanna de Lima Guterres**, lavrei, datei e assinei a presente ATA, que também assinam os demais presentes. Recife, 22 de fevereiro de 2008.

Giovanna de Lima Guterres

Neuma Gusmão, Misael S.F. Costa

Oliane Magalhães, Gilmara F. de Araújo

*Howaldy da
Pereira 12/3/08*



DEDICO

A Deus, que me proporcionou força plena para fazer uso desses benefícios que me tem oferecido.

A minha filha, LAVÍNIA, que transmite paz, esperança e muito amor.

Ao meu esposo, MÁRCIO, por fazer parte de minha vida de forma tão intensa, amoroso, carinhoso, dedicado, compreensivo,.

A minha mãe, CARMINHA, por ser minha melhor amiga. Dedicada, compreensiva, honesta, amorosa. Está sempre presente em minha vida. É tudo de muito bom.

Ao meu pai: SEBASTIÃO (in memoria), pela firmeza de atitude e exemplo de vida.

Aos meus irmãos, especialmente MAZINHO, que sempre vibrou com as minhas vitórias.

Aos meus afilhados: RICARDO ANTÔNIO E RAFAELLY MILLENA, pela nossa valiosa amizade.

Aos meus familiares que estiveram presente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pelo acolhimento.

Ao Departamento de Micologia, pela disponibilidade e ensinamentos científicos.

À Pós-graduação, pelo Programa que tem me enriquecido intelectualmente.

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela contribuição financeira.

Aos membros do comitê de ética da Universidade de Pernambuco, pelo atendimento e presteza de serviço.

À Chefia do Departamento de Micologia, Prof^a Dr^a Cristina Motta, pela sua tranquilidade e disponibilidade.

Ao Laboratório de Micologia Médica (UFPE), especialmente a minha amiga ELVISLENE, que posso contar com o apoio para toda hora.

À Prof^a Dr^a Lusinete Aciole Queiroz, pelo seu valioso conhecimento, pelas sugestões propostas. Admirável profissional e pessoa. Obrigada pelas nossas conversas que geraram questionamentos e boas idéias. Compartilhar da sua experiência foi um grande privilégio. Deus ilumine sempre seu caminho.

À Prof^a Dr^a Oliane Magalhães, por todo empenho, sabedoria, compreensão, discernimento, bom senso, valiosos ensinamentos, competência, dedicação, além de ser uma profissional extremamente competente..

À Prof^a Dr^a Elvira Bezerra (UPE), pelo incentivo a seleção da Pós-graduação e apoio a pesquisa.

Aos colegas Idalina Cambuim, Ana Beatriz, Felipe Duarte e Bruno Gomes, pela força, entusiasmo e otimismo contagiantes, proporcionando discussões e sugestões que servirão para crescimento, aprendizado e incentivo à pesquisa.

À Prof^a Dr^a Leonor Maia, pelo exemplo de profissional e comprometida com suas funções.

À Prof^a Dr^a WIDED, pela recepção em seu ambiente de trabalho.

À Prof^a Dr^a Rejane Pereira, pelas habilidades, agilidade, organização, desprendimento, competência, garra, determinação e disciplina, além da confiança depositada em mim. Tudo isso sempre me estimulou a dar este grande passo.

Ao Professor Armando Marsden, pela disponibilidade em transmitir seus conhecimentos.

Aos funcionários e colegas da Coleção de Culturas Micoteca -URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, especialmente a Eliane, por toda colaboração, atenção e amizade.

Aos funcionários e pacientes do Ambulatório de Odontologia da Universidade de Pernambuco- UPE- pelo auxílio na obtenção de dados e matérias.

Aos Odontólogos: Mônica Cruz e Bernadete Bezerra pela paciência e dedicação durante a realização das coletas.

Ao estatístico, Fernando Duarte, responsável pela análise estatística, pela dedicação ao trabalho.

À minha filha, LAVÍNIA, pela satisfação em fazer parte de nossa família.

Ao meu esposo, MÁRCIO, pelo amor, companheirismo e pela grandiosa força de realizar esse percurso junto a mim.

À minha mãe, pela paciência, incentivo, compromisso e muita força.

Aos meus irmãos que me incentivaram, especialmente Gilda, que participa de forma efetiva de minha formação intelectual.

A Júlio César, meu sobrinho, que esteve próximo de mim nos momentos em que estive mais necessitada, auxiliando em tudo que fosse possível.

Aos pacientes que aceitaram com tranquilidade e satisfação, participar desse estudo.

A Josi que também se fez presente neste trabalho contribuindo na harmonia física do ambiente.

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a execução deste trabalho. Aos que me apoiaram, aos que me ensinaram. Todo agradecimento.

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Páginas
Figura 1	Fluxograma	23
Figura 2	Exame direto de amostras de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, Recife, PE, Brasil.	28
Figura 3	Espécies isoladas de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, Recife, PE, Brasil.	30
Figura 4	Espécies isoladas de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, Recife, PE, Brasil em relação ao sexo e a faixa etária.	33

RESUMO

Leveduras estão distribuídas na cavidade bucal e têm sido isoladas de diferentes nichos, dentre estes, cáries dentárias, que podem se constituir em reservatórios de microrganismos potencialmente invasivos aos tecidos do hospedeiro, podendo provocar infecções superficiais ou sistêmicas. No Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - UPE - Recife, foram atendidos 100 pacientes, de ambos os sexos, numa faixa etária de três a 80 anos e distribuídos em quatro grupos: Pacientes com cardiopatia, com neoplasia, com transplante hepático e clinicamente sãos. Desses pacientes foi coletado material de cárie dentária para detectar leveduras. Com cureta periodontal, odontólogos coletaram as amostras de material de cárie dentária, as quais foram armazenadas em baterias térmicas e transportadas para os laboratórios da pós-graduação em Biologia de fungos (UFPE), onde foram realizadas as técnicas para exame direto, cultura e identificação. Leveduras foram isoladas de cárie dentária de todos os pacientes. Das amostras de material de cárie dentária de pacientes com cardiopatia foram isoladas *Candida albicans* 51(79%), *C.guilliermondii* 7(11%), *C. dubliniensis* 3(5%), *C. parapsilosis* 2(3%) e *Trichosporon pullulans* 1(2%); De pacientes com neoplasia, apenas *C.albicans* 11 (100%); De pacientes com transplante hepático, *C. albicans* 6(50%) e *C. guilliermondii* 6(50%) e de pacientes clinicamente sãos, *C. albicans* 6 (43%),*C. guilliermondii* 6(43%),*C. magnoleae* 1(7%) e *C. tropicalis* 1 (7%). Maior número e diversidade de leveduras ocorreram em amostras de pacientes com cardiopatia. Maior número de leveduras foi obtido de amostras de pacientes da faixa etária entre 45 a 54 anos e maior diversidade entre 55 a 80 anos. Segundo o teste do Qui-quadrado, não houve diferença significativa entre as espécies de leveduras com relação aos grupos de pacientes e faixa etária.

Palavras chave: Leveduras, cárie dentária, pacientes.

ABSTRACT

Yeasts are distributed in the oral cavity and have been isolated from different niches, among them, dental carie, which can be reservoirs of microorganisms in potentially invasive to the host tissue and can cause infections or systemic surface. In Dental Clinic of the University Hospital Oswaldo Cruz - UPE - Recife, 100 patients were attendit, of both sexes, in an age group of three to 80 years and divided into four groups: Patients with heart disease, cancer, liver transplantation and clinically healthy. Of these patients was collected material for dental carie to detect yeasts. With periodontal curette, dentists collected samples of material from dental carie, which were stored in thermal batteries and transported to the laboratories of post-graduate in biology of fungi (UFPE), where the techniques were performed for direct examination, culture and identification . Yeasts were isolated from dental carie in all patients. Of the samples of material of dental carie in patients with heart disease were isolated *Candida albicans* 51 (79%), *C.guilliermondii* 7 (11%), *C. dubliniensis* 3 (5%), *C. parapsilosis* 2 (3%) and *Trichosporon pullulans* 1 (2%); In patients with cancer, only *C.albicans* 11 (100%); In patients with liver transplantation, *C. albicans* 6 (50%) and *C. guilliermondii* 6 (50%) in patients clinically healthy, *C. albicans* 6 (43%), *C. guilliermondii* 6 (43%), *C. magnoleae* 1 (7%) and *C. tropicalis* 1 (7%). Increased number and diversity of yeasts occurred in samples from patients with heart disease. Increased number of yeast was obtained from samples of patients from the age group between 45 to 54 years and more diversity between 55 to 80 years. According to the Chi-square test, there was no significant difference between the species of yeast with respect to groups of patients and age.

Keywords: Yeasts, dental carie, patients

SUMÁRIO

DEDICO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
CASUÍSTICA E METODOS	21
3.1 GRUPO DE ESTUDO	21
3.2 COLETA DE AMOSTRAS DE MATERIAL DE CÁRIE DENTÁRIA	21
3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	21
3.3.1.EXAME DIRETO	21
3.3.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	22
3.3.3 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	22
3.3.4 FLUXOGRAMA	23
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
3.5 MEIOS DE CULTURA	24
3.5.1 Meio para o isolamento e purificação	24
3.5.2 Meios para identificação	24
3.5.2.1 Prova de assimilação	25
3.5.2.2 Prova da fermentação de açúcares	26

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
7 ANEXO	44
7.1 TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	44
7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	45
7.3 FICHA DE CONTROLE DOS PACIENTES DA ODONTOLOGIA	47
7.4 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO / CLASSIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	48
7.5 ARTIGO DE Nº 1	49
7.6 ARTIGO DE Nº 2	63
7.7 COMPROVANTES DOS ARTIGOS 1 E 2	79
7.8 NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRASILIAN JOURNAL MICROBIOLOGY	80

1 INTRODUÇÃO

Leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem por brotação, fissão e brotação-fissão (Lacaz et al., 2002); estão amplamente distribuídas em natureza e presentes na cavidade oral, fazendo parte da microbiota bucal, que tem importante papel tanto na saúde bucal como no desenvolvimento de doenças decorrentes da alteração desse ecossistema, contribuindo para o desenvolvimento do sistema imune, permitindo a colonização equilibrada de grande variedade de microrganismos, os quais se constituem como reservatório de microrganismos potencialmente invasivos aos tecidos do hospedeiro.

Leveduras têm sido isoladas também de placas dentárias (Anderson; Odds, 1985), canais radiculares (Najzar-Fleger et al., 1992), em cáries dentárias (Najzar-Fleger, 1992; Marren et al., 1996) e alterações subgengivais (ZAMBON et al. 1990).

A cárie dental é uma doença infectocontagiosa, multifatorial, que resulta em perda de minerais da estrutura dos dentes, causada por ácidos orgânicos produzidos por microorganismos, durante o metabolismo de carboidratos; a mesma é considerada uma doença complexa que depende da interação de fatores relativos ao hospedeiro e da presença de microrganismos cariogênicos (Fernandes; Alves, 1997) que pode ser detectada pelo exame clínico visual quando “atinge um nível de porosidade capaz de alterar o padrão de refração dos raios luminosos incidentes” (THYLSTRUP; FEJERSKOV, 1988; WEYNE; HARARI, 2001; VALLE, 2002).

O patógeno primário, *Streptococcus mutans*, juntamente com o *Actinomyces viscosus* e *S. sanguis* estão envolvidos na aderência ao dente e na produção de ácido láctico necessários à dissolução do esmalte (Langlais; Miller, 2002), além das leveduras que também podem participar da formação do biofilme. O acúmulo de biofilme dental desempenha um papel decisivo na iniciação da cárie dentária e da gengivite, e sua remoção efetiva é essencial para o restabelecimento e/ou manutenção da saúde bucal. Os biofilmes contendo *Candida albicans* são importantes para a manifestação de candidoses de mucosas e para o processo de colonização, tanto de cavidades de cárie como de bolsas periodontais (GEORGE; FALKLER, 1992; STARR et al., 2002).

Embora algumas espécies estejam distribuídas de forma mais restrita, podem comportar-se como microrganismos comensais ou patogênicos no organismo do homem e de outros animais (Martins et al., 2002), desde que haja ruptura no equilíbrio biológico resultante de fatores predisponentes, patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos, havendo então, um aumento na multiplicação e/ou invasão destes microrganismos em tecidos, instalando-se a infecção (GHANNOUM; ABU-ELTEEN, 1990; ODDS, 1998).

A diversidade de espécies de leveduras com o aumento do número de indivíduos imunocomprometidos na população tem atraído a atenção para o estudo de espécies de leveduras como fungo oportunista patogênico, destacando-se a *C. albicans* como agente etiológico de maior incidência em lesões de candidíase bucal (Powderly, 1992; Greenspan; Greenspan, 1993; Chigurupati et al., 1996; Ramosgomez et al., 1999). Outras espécies também vêm emergindo como patógenos causadores de infecções fúngicas como *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* (Krcmery; Barnes, 2001; Cheng et al., 2005; Richardson, 2005) e *C. dubliniensis* (SULLIVAN; COLEMAN, 2004; MEILLER et al., 1999; BROWN et al., 2000; PORTELA et al., 2004).

Segundo a literatura consultada, há carência de informações referente ao material de cárie dentária e leveduras isoladas deste material, além da preocupação de não poder dissociar a saúde bucal da geral, que em condições específicas, pode atuar como focos de disseminações de microrganismos patogênicos, ocasionando efeitos sistêmicos. Por isso, os objetivos deste trabalho é conhecer leveduras presente em material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – UPE – Recife - PE, verificar a ocorrência de leveduras em material de cárie dentária, indicar a espécie prevalente das amostras isoladas, relacionar a diversidade de leveduras com a condição clínica dos pacientes e relacionar as espécies isoladas com sexo e idade dos pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A microbiota bucal coexiste em estado balanceado e harmônico com o hospedeiro, porém mudanças nesse ambiente, como o surgimento de diferentes nichos pode provocar alterações quantitativas e qualitativas do referido equilíbrio (JORGE et al, 1987).

A cavidade bucal oferece uma variedade de nichos à colonização microbiana, permitindo a sobrevivência de uma diversidade de bactérias, vírus e fungos (Haffajee; Socransky; 1994; Sweeney et al., 1998; Jabra-Rizk et al., 2001). As espécies de *Candida* fazem parte da microbiota comensal da boca; entretanto, sob determinadas condições, comportam-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões de mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves. (DE REPENTIGNY et al., 2000; LEUNG et al., 2000).

Segundo Höfling, Rosa (1999) o gênero *Candida* compreende um grupo de leveduras encontrado em diversos ecossistemas, inclusive na microbiota residente de humanos e animais; no entanto, podem comportar-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que se manifestam clinicamente por lesões superficiais da pele e mucosas, ou mesmo, sob determinadas circunstâncias, como candidoses disseminadas, muitas vezes severas ou letais (Liu et al., 1996). Nas últimas duas décadas a literatura tem relatado uma ocorrência crescente de infecções por esses fungos, assim como a identificação de novas espécies patogênicas, principalmente em imunocomprometidos (PFALLER, 1995; PIZZO et al., 2002).

Diversos estudos reportam que aproximadamente metade da população adulta saudável abriga essas leveduras nas mucosas bucais (Arendorf; Walker, 1980; Darwazeh; Al-Bashir, 1995; Abu-Elteen; Abu-Alteen, 1998), entretanto, uma prevalência muito variável entre os diferentes grupos populacionais tem sido encontrada (Hannula et al., 2000; Samaranayake; Samaranayake, 2001). Isso pode ser devido principalmente à dificuldade de padronização dos fatores que influenciam a colonização, em populações heterogêneas, como uma dieta rica em açúcares (Pizzo et al., 2000) ou a presença de cavidades de cárie dentária (STARR et al., 2002).

Várias condições predisponentes estão associadas tanto à colonização assintomática quanto à manifestação clínica de candidoses, incluindo as deficiências imunes específicas

Fidel, 2002; Rodriguez-Galan et al. 2002), além de desordens endócrinas, lesões de tecidos moles e medicamentos como antibióticos e corticosteróides (MOREIRA et al., 2001).

Nas últimas décadas, vários fatores têm contribuído para o aumento da incidência de infecções fúngicas oportunistas, e o mais relevante pode ser o crescimento das populações de indivíduos gravemente enfermos e/ou de imunocomprometidos, que sobrevivem com os avanços da medicina, recém-nascidos de baixo peso, infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, neutropenias induzidas por quimioterapia, transplantes de órgãos, procedimentos médicos invasivos, como cirurgias extensas ou cateteres vasculares, ou mesmo medicamentos como antibióticos ou corticosteróides (Groll et al., 1998; De Backer et al., 2000). Uma outra razão para a relevância das infecções provocadas por estes microrganismos é que, embora existam muitos compostos antifúngicos disponíveis no mercado, tais drogas têm limitações em sua utilização, por apresentarem toxicidade ao hospedeiro, e também pela possibilidade de ocorrer a manifestação de resistência, por diferentes espécies e subespécies de *Candida* (Powderly et al., 1993). Portanto, todos estes aspectos têm contribuído, conjuntamente, para aumentar o interesse no estudo desses microrganismos (De BACKER et al. 2000).

As leveduras são encontradas, assim, colonizando diferentes sítios da cavidade bucal, como língua, palato, tonsilas e mucosa dos lábios e bochechas (Arendorf, Walker, 1980; Hägewald et al., 2002); e em cáries dentárias (STARR et al., 2002; HOSSAIN et al., 2003).

Segundo Samaranayake e Samaranayake (2001) relata como são altamente prevalentes em populações saudáveis e assintomáticas, o isolamento de *Candida* spp. da cavidade bucal não implica, necessariamente na ocorrência de infecções

Starr et al (2002); Hossain et al. (2003) que as cavidades de cáries dentárias podem ser um reservatório importante de espécies de *Candida*. Segundo Hossain et al. (2003) foi observada uma semelhança significativa entre as cepas de *C. albicans* que colonizavam a cavidade bucal e o trato gastrointestinal de crianças com lesões de cárie severas, e propõem que tais lesões sirvam como nichos para a colonização de *C. albicans* para sítios distantes da boca, podendo, causar infecções em órgãos vitais como pulmões, estômago e intestino. Os autores recomendam o tratamento odontológico e uma adequada higiene bucal como medidas preventivas indispensáveis, especialmente em populações de risco. Estes fungos também já foram observados infectando canais radiculares, muitas vezes associados com a resistência à terapia endodôntica (MOLANDER et al., 1998).

Loesche (1986), Lindquist et al.(1991), Thylstrup; Fejerskon (1995) Jorge (1998) e Napimoga (2004) relataram que uma das doenças bucais que reflete falha no equilíbrio da microbiota bucal é a cárie dentária, resultante de aumento do número de microrganismos, que em sua progressão desencadeia a destruição de tecidos mineralizados dos dentes. Entre os fatores principais apontados para que a cárie se estabeleça estão o hospedeiro com dentes susceptíveis, colonizados por microrganismos potencialmente cariogênicos, dieta com alto consumo de carboidratos e higiene bucal deficiente.

Segundo Ramirez-Amador et al. (1997), a incidência de leveduras na cavidade bucal e as razões para o estabelecimento da infecção fúngica são decorrentes de fatores predisponentes tais como: queda de imunidade do hospedeiro, desordens endócrinas, lesões em mucosas, higiene oral deficiente e tratamento prolongado com antibióticos e corticosteróides.

Durante os eventos de colonização e infecção, um número de fatores de virulência é expresso pelas espécies de *Candida*, como por exemplo, a adesão do fungo aos tecidos do hospedeiro, as alterações morfogênicas e a secreção enzimática (Calderone; Fonzi, 2001). No entanto, nenhum fator em particular tem sido considerado o único responsável pela infecção, mas uma combinação de mecanismos de virulência, expressos sob determinadas circunstâncias, parece ser responsável pelo desenvolvimento de candidoses (ODDS, 1994).

A presença de *Candida* na cavidade bucal não é suficiente para a colonização; o primeiro passo é a adesão da levedura às células do epitélio do hospedeiro (Samaranayake; Mcfarlane, 1990). A adesão da levedura à superfície celular é decorrente das adesinas de superfície do agente infectante que reconhecem a matriz extracelular de proteínas tais como laminina, colágeno, fibronectina e fibrina, presentes nas superfícies celulares do hospedeiro (GREEFIELD, 1992; KLOTZ et al., 1993).

Em geral as leveduras envolvidas em colonização de mãos de profissionais da área de saúde e cateteres podem ser virulentas e oferecer riscos de infecção. A maior parte das candidemias é precedida pelo evento de colonização do próprio paciente pela mesma espécie de levedura responsável pela infecção, contudo as infecções hematogênicas por *Candida* spp podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos dos profissionais de saúde, principalmente em pacientes portadores de cateteres vasculares (STRAUSBAUGH et al., 1996; TAMURA; GASPARETTO, 2003; CHENG et al., 2005).

Muitos microrganismos, considerados como não patogênicos, tem a capacidade de produzir infecções e doenças. Esta propriedade não depende somente dos fatores de virulência, mas dependerá também dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Tem havido, recentemente, um constante aumento na incidência de infecções devidas a tais microrganismos, dos quais muitos fazem parte da microbiota do homem e dos animais. O enfraquecimento do hospedeiro pode ser ocasionado pelo uso de drogas, como as que reduzem a rejeição após transplantes de órgãos (drogas imunossupressoras) e nos casos de portadores de Câncer (FINEGOLD; WEXLER, 1988).

A *Candida albicans* é o agente etiológico encontrado com maior incidência em lesões de candidíase bucal (Powderly, 1992; Greenspan; Greenspan, 1993 Chigurupati et al., 1996; Ramosgomez et al., 1999), ocorre como um microrganismo comensal na cavidade bucal dos indivíduos não causando alterações (Arendorf; Walker, 1980), entretanto, em pacientes imunocomprometidos, assume características de patogenicidade alterando a harmonia com o hospedeiro. É considerada a mais virulenta, invadindo e provocando danos aos tecidos, quando as defesas do hospedeiro estiverem local ou sistematicamente prejudicadas (Budtz-Jørgensen, 1990; Larone, 1995; Edman, 1998; Zöllner, 2000). As candidoses por *C. albicans* podem ser superficiais ou profundas, viscerais ou sistêmicas, com localização mucosa ou muco-cutânea e com fungemias. *C. albicans* pode causar também flebite supurativa, artrite, osteomielite, endoftalmite, vaginite, balanite e lesões do sistema nervoso central (ZÖLLNER, 2000; LACAZ et al., 2002).

Outras espécies também vêm emergindo como patógenos causadores de infecções fúngicas como *C.tropicalis*, *C.stellatoidea*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C. guilliermondii*, Powderly, (1992); Greenspan; Greenspan (1993); Krcmery; Barnes (2001); Cheng et al. (2005); Richardson (2005) e *C. dubliniensis* (SULLIVAN; COLEMAN, 1998; MEILLER et al., 1999; BROWN et al., 2000; PORTELA et al., 2004).

Para colonizar, infectar e evadir-se das defesas do hospedeiro, *C. albicans* possui um repertório de fatores de virulência, que inclui uma variedade de enzimas, cujos principais representantes são as proteinases aspartil secretadas (saps) e as fosfolipases. O estabelecimento de possíveis correlações entre a atividade enzimática e as diferentes linhagens de *C. albicans*, assim como a compreensão mais aprofundada do papel desempenhado por essas enzimas durante os processos infecciosos, abrirá novas perspectivas

de intervenções terapêuticas (OLLERT et al., 1995; GHANNOUM, 2000; CALDERONE; FONZI, 2001; HUBE; NAGLIK, 2001; NIEWERTH; KORTING, 2001).

Siqueira; Rôças (2004) detectaram *C. albicans* associada a espécies bacterianas em dentes com lesões peri-radiculares persistentes. Para tais autores, a resistência aos medicamentos dispensados intra-canal, e a capacidade de colonizar a dentina e invadir túbulos dentinários podem explicar a presença dessa levedura nas infecções endodônticas persistentes.

Para os autores, Sullivan et al. (1995); Hannula et al. (2000), a *C. dubliniensis* é capaz de aderir fortemente às células do epitélio mucoso, e parece estar bem adaptada ao meio-ambiente bucal, além de ter sido isolada ainda do trato respiratório, vagina e trato gastrointestinal, e também de urina, escarro e feridas, estando implicada em infecções invasivas, mesmo em HIV-negativos, quando acometidos por doenças graves (JAINKITTIVONG, 1998; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; FOTEDAR; ALHEDAITH, 2004).

A ocorrência de leveduras é também comum em pacientes com câncer em estágio avançado (Davies et al., 2002), e a candidose bucal é considerada uma condição clínica grave entre esses pacientes; desse modo, estudos epidemiológicos sobre a distribuição e o potencial de virulência dessas leveduras, em diferentes grupos populacionais, abordando os fatores de risco associados à infecção, são importantes no desenvolvimento de estratégias para o controle e prevenção de infecções clinicamente importantes (LOCKHART 1999; GHANNOUM, 2000; LEUING et al., 2000; DAVIES et al., 2002; RODRIGUEZ-GALAN et al., 2002; KAM; XU, 2002).

Patterson (1999) relata que as infecções causadas por fungos ocorrem, geralmente, entre o final do primeiro mês e o sexto mês pós-transplante de órgãos sólidos, estando associadas a óbitos nesse período. Infecção por *Candida* (endógena ou exógena) ocorre em pacientes imunocomprometidos nas unidades de terapia intensiva (PATTERSON, 1999; BOAZ et al., 2006).

Embora a infecção por fungos ocorra mais frequentemente em pacientes imunocomprometidos, vários casos deste tipo de infecção, pós cirurgia cardíaca, têm sido descritos na literatura médica. A incidência de endocardite infecciosa em prótese valvar varia de 7 a 25%. O período de maior risco são os seis meses após a troca valvar, com incidência de 1,4 a 3,1% no 1º ano, declinando para 0,35% após um ano. Os agentes mais comuns de infecção nos primeiros 60 dias após o implante da prótese são o *Staphylococcus*

aureus, os bacilos *gram* negativos, os difteróides e os fungos. Os fungos podem corresponder até a 10% dos casos, com predomínio da *C. albicans* e do *Aspergillus* sp. Os principais fatores predisponentes para a infecção fúngica são a cirurgia cardíaca, o uso de drogas injetáveis, a antibioticoterapia endovenosa prolongada, a nutrição parenteral e a imunossupressão grave (RAMOS et al., 2003).

A maior parte das infecções por *Trichosporon* é considerada micose oportunista, chegando-se a catalogar muitos casos como mortais; apresentam-se sobretudo em pacientes neutropênicos, que recebem quimioterapia ou corticosteróide, e, com muito mais frequência, em pacientes transplantados ou portadores de neoplasia; foram relatadas em pacientes com hemocromatose, com próteses valvulares ou dispositivos intravenosos, ou com AIDS. Nos pacientes que apresentam granulocitopenia grave, as manifestações clínicas podem caracterizar-se por febre, lesões maculopapulares na pele, coriorretinite, infiltrações pulmonares, endocardite, hepatite, encefalite, septicemia (fungemia) refratária a tratamento, fungúria e dano renal (WALSH, 1996).

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 GRUPO DE ESTUDO

No Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz - UPE, Recife, foram atendidos 100 pacientes, de ambos os sexos, com faixa etária de 3 a 80 anos. Estes foram distribuídos em 4 grupos: pacientes com cardiopatia, com neoplasia, com transplante hepático e clinicamente sãos. Entre os pacientes com cardiopatia havia uma subdivisão para diferenciar os tipos de cardiopatia, valvopatia, doença coronariana, cardite, cardiopatia hipertensiva, e cardiopatia congênita. E para os pacientes com neoplasia, leucemia, melanoma, carcinoma brônquica e câncer de próstata.

3.2 COLETA DE MATERIAL DE CÁRIE DENTÁRIA

As amostras foram coletadas em material de cárie dentária por profissionais da área de Odontologia através do uso de cureta periodontal esterilizada com auxílio de espelho bucal, gaze para secar os dentes e lanterna para iluminação. As mesmas foram acondicionadas em tubos esterilizados contendo 1mL de água destilada esterilizada, adicionada de 50mg de cloranfenicol/L. Em seguida, armazenadas em baterias térmicas e transportadas para o Laboratório da Pós-graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco onde foram maceradas e submetidas as técnicas de exame direto, cultura e testes para identificações de leveduras.

3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.3.1 EXAME DIRETO

Foram retiradas alíquotas para preparação de lâminas a fresco para visualização de estruturas fúngicas.

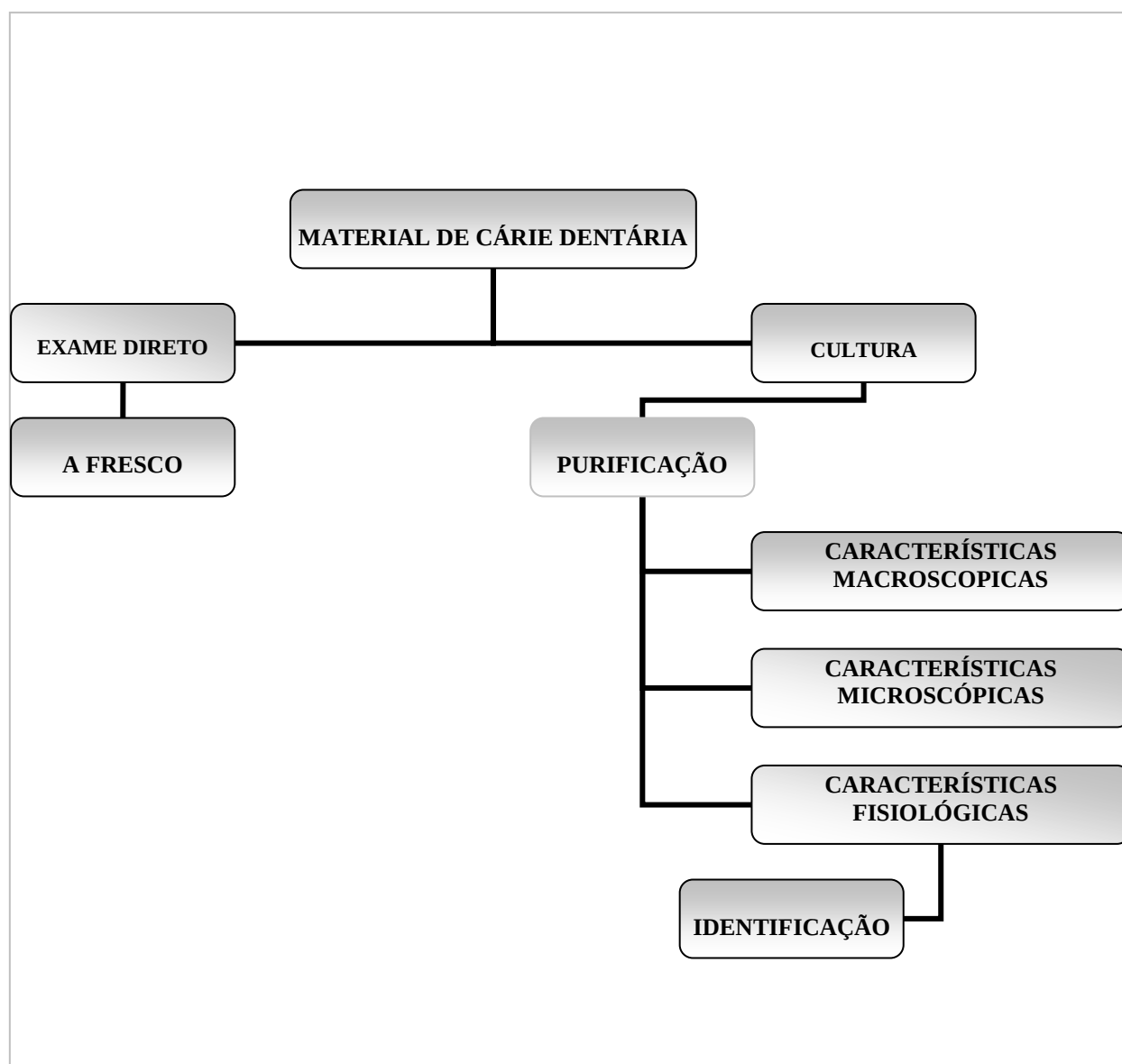
3.3.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Da suspensão foi retirado 0,2 mL e semeadas por espalhamento radial na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de extrato de leveduras e 50mg de cloranfenicol/L contido em placas de Petri e mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e a 37°C em duplicata. As placas foram observadas diariamente e após 72 horas foram purificadas a partir de suspensões com água destilada esterilizada adicionada de 50mg de cloranfenicol/L. Dessas suspensões foram retiradas 0,2 mL e semeadas por espalhamento radial na superfície do meio ágar Sabouraud adicionado de extrato de leveduras e 50mg de cloranfenicol/L contido em placas de Petri e mantidas à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$) e a 37°C . À medida que as colônias isoladamente surgiram, foram repicadas para tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud sem antibiótico (**Fluxograma**).

3.3.3 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Após a purificação, foram isoladas unidades formadoras de colônias isoladas aleatoriamente de um ponto em que apresentavam características macroscópicas semelhantes e, posteriormente identificadas com base na morfofisiologia, segundo os critérios adotados por KURTZMAN; FELL (1998), HOOG; GUARRO (2000); BARNETT et al. (2002).

Os meios de cultura foram preparados segundo LACAZ et al. (2002).

Figura1. FLUXOGRAMA

Kurtzman(1998), Hoog Guarro(2000), Barnett et al. (2002)

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada pela aplicação do Teste do Qui-quadrado χ^2 em tabela de contingência segundo BUSSAB; MORETTIN (2003).

3.5 MEIOS DE CULTURA

3.5.1 Meio para o isolamento e purificação

Ágar Sabourand + 0,5% de extrato de levedura (SAB + YE)

Peptona de carne.....10g
Extrato de leveduras.....5g
Dextrose.....40g
Ágar.....20g
Cloranfenicol.....50mg
Água destilada q.s.p.....1000mL
pH final = 5,5

3.5.2 Meios para identificação

Água Bile de Boi

Bile de Boi.....20g
Água destilada q.s.p.....1000mL

Ágar gorodkowa

Extrato de carne.....1g
Cloreto de sódio.....0,5g
Dextrose.....0,25g
Ágar.....2,0g
Água destilada q.s.p.....1000mL

Meio com Carbonato de Cálcio

Extrato de leveduras.....	11g
Dextrose.....	5g
Carbonato de Cálcio.....	3g
Ágar.....	20g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Ágar uréia

Peptona de carne.....	1,0g
Dextrose.....	5g
Cloreto de sódio.....	5g
Fosfato de potássio monobásico.....	2g
Vermelho de fenol.....	0,012g
Uréia.....	29g
Ágar.....	20g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

3.5.2.1 Prova de assimilação**Meio básico C**

Sulfato de amônio.....	5g
Fosfato de potássio dibásico.....	1g
Sulfato de magnésio.....	0,5g
Ágar.....	20g
Água destilada q.s.p.....	1000mL

Meio básico N

Fosfato de potássio dibásico..... 1g
Sulfato de magnésio.....0,5g
Dextrose.....20g
Ágar.....20g
Água destilada q.s.p..... .1000mL

3.5.2.2 Prova da fermentação de açúcares**Água peptonada a 0,5 %**

Peptona. de carne0,5g
Extrato de leveduras.....0,5g
Água destilada q.s.p.....1000mL

Soluções de açúcares (arabinose, glicose, galactose, lactose, maltose, metil α glucosidase, melicitose, melibiose, rafinose, sacarose, trealose, xilose) a 4%

Açúcar..... 4g
Água peptonada a 2,5%100mL

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – UPE, Recife, PE, Brasil, foram analisadas amostras de material de cárie dentária de 100 pacientes distribuídos em quatro grupos, correspondentes a 63 pacientes com cardiopatia, 11 com neoplasia, 12 com transplante hepático e 14 clinicamente sãos.

Entre os pacientes com cardiopatia, 27 eram portadores de valvopatia, 14 de cardite, 11 de doença coronariana, nove de cardiopatia hipertensiva e dois de cardiopatia congênita; Considerando os pacientes com neoplasia, quatro com leucemia, três com melanoma, dois com carcinoma brônquica e dois com câncer de próstata.

Ao exame direto foram detectadas células de leveduras com brotação simples, e múltipla, isoladas e agrupadas, pseudomicélio, micélio verdadeiro e artrosporado; Foi positivo o exame direto de 32% das 100 amostras de material de cárie dentária dos pacientes já citados, correspondendo a 27 amostras de material de cárie dentária de pacientes com valvopatia e uma amostra de material de paciente com cardiopatia congênita. Das amostras de material de cárie dentária dos pacientes com cardite, com cardiopatia hipertensiva, com doença coronariana, com leucemia, com melanoma, com carcinoma brônquica, com câncer de próstata e de amostras de material de cárie dentária de pacientes clinicamente sãos, todas foram negativas para o exame direto; Das amostras de material de cárie dentária de pacientes com transplante hepático, quatro foram positivas (Figura 1). Não houve diferença significativa $\chi^2 = 102,1$ em relação ao resultado de exame direto das amostras de material de cárie dentária dos pacientes.

O resultado de exame direto das amostras de pacientes analisados pode ser atribuído a escassa quantidade de material colhido das cáries dentárias, todas de pequena extensão. É importante enfatizar que cada paciente era portador apenas de uma cárie dentária, em decorrência dos mesmos terem acompanhamento profilático.

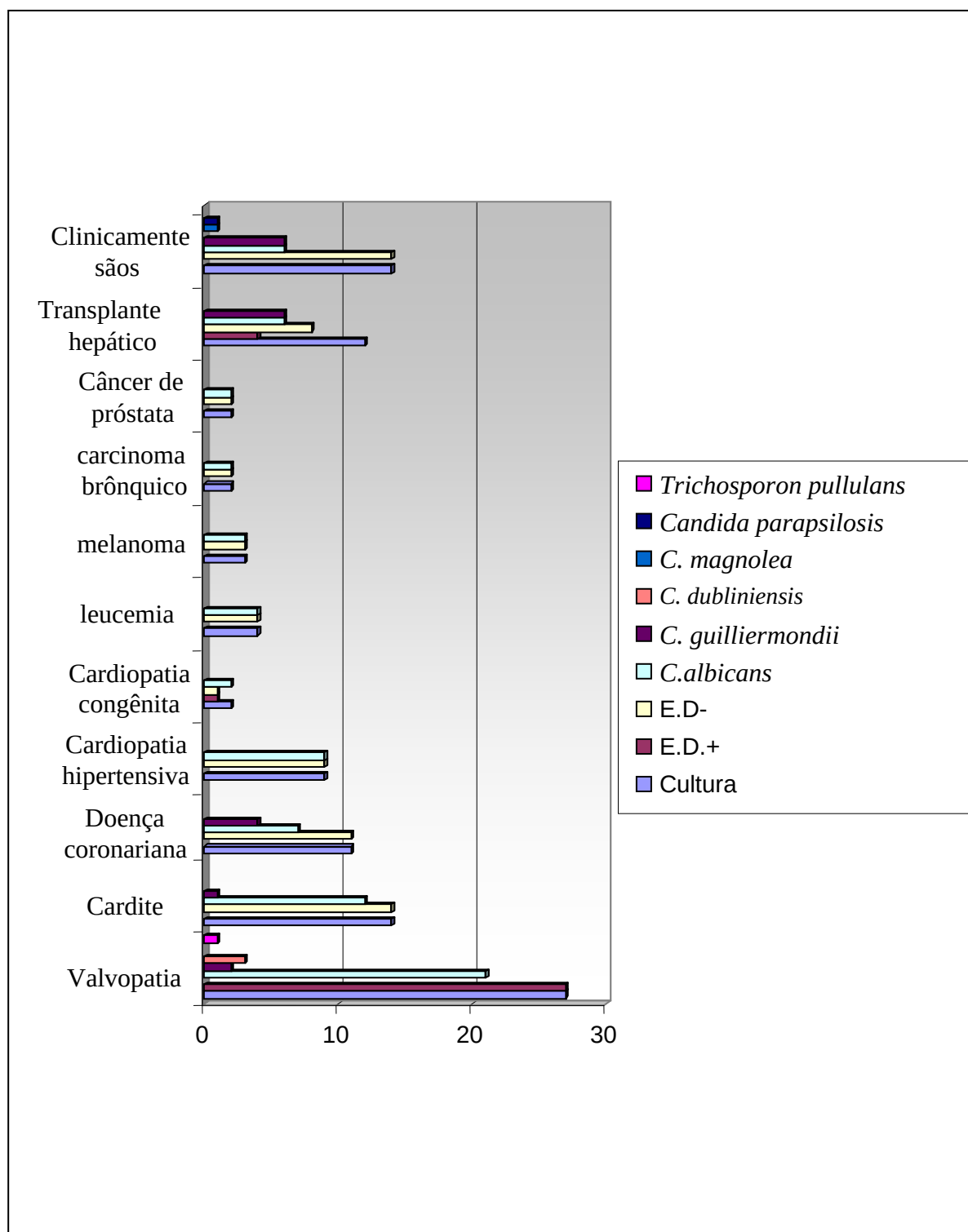


Figura 2. Exame direto de amostras de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, Recife, PE, Brasil. E.D- Exame direto negativo, E.D.+ Exame direto positivo.

Foram obtidas 101 culturas de leveduras das 100 amostras de material de cárie dentária analisadas, independente do resultado do exame direto. Vale salientar que de uma amostra foram isoladas duas espécies de leveduras e das demais apenas uma espécie. Estudos relatam que uma única amostra clínica pode ser colonizada tanto por uma única espécie quanto por múltiplas espécies de *Candida* no mesmo ou em diferentes sítios do organismo (BARROS, 2005).

Das leveduras isoladas, 78 correspondem a *Candida albicans*, 15 a *C. guilliermondii*, três a *C. dubliniensis*, uma a *C. magnolia*, uma a *C. parapsilosis*, uma a *C. tropicalis* e uma a *Trichosporon pullulans*. Dos 27 pacientes portadores de valvopatia foram isoladas 21 *C. albicans*, duas *C. guilliermondii*, três *C. dubliniensis*, uma *C. parapsilosis* e um *Trichosporon pullulans*; dos 14 com cardite, 12 *C. albicans*, um *C. guilliermondii* e um *C. parapsilosis*; dos 11 com doença coronariana, sete *C. albicans* e quatro *C. guilliermondii*; dos dois portadores de cardiopatia hipertensiva e dos portadores de cardiopatia congênita foi isolada apenas *C. albicans* com respectivo número de isolados, nove e dois. Foram isoladas apenas *C. albicans* em amostras de material de cárie dentária de pacientes com leucemia, correspondendo ao número de quatro isolados, três em pacientes com melanoma, dois em pacientes com carcinoma brônquico e dois em pacientes com câncer de próstata. Das amostras de material de cárie dentária de pacientes com transplante hepático foram isoladas seis *C. albicans* e seis *C. guilliermondii*. E das amostras de material de cárie dentária de pacientes clinicamente sãos foram isoladas seis *C. albicans*, seis *C. guilliermondii*, uma *C. magnolia* e uma *C. tropicalis* (Figura 2). Não houve diferença significativa $\chi^2 = 203,1$ em relação às espécies e os grupos de pacientes analisados.

A variedade de leveduras isoladas de material de cárie dentária dos pacientes selecionados está apoiada por Branchini et al. (1994); Birman et al. (1997); Sen et al. (1997); Jacob et al. (1998); Sziegoleit et al. (1999); Moreira et al. (2001); Koneman et al. (2001); Silva et al. (2002); Rego et al. (2003); Soares et al. (2004); Medrano et al. (2006); quando dizem que várias causas têm sido propostas para explicar a súbita emergência de tantas espécies novas de leveduras como agentes infecciosos, entre os quais são citados o uso de antibióticos de amplo espectro por períodos prolongados, agentes antineoplásicos, uso de cateter venoso, neoplasias, neutropenia, imunossupressão e outros fatores que causam diminuição do sistema imunológico, além do uso disseminado de antifúngicos, por serem menos eficazes contra as

espécies que não é a *C.albicans*, possibilita sua proliferação (CAMPISI et al., 2002; KAM; XU, 2002; AHMAD et al., 2003; EPSTEIN et al., 2003).

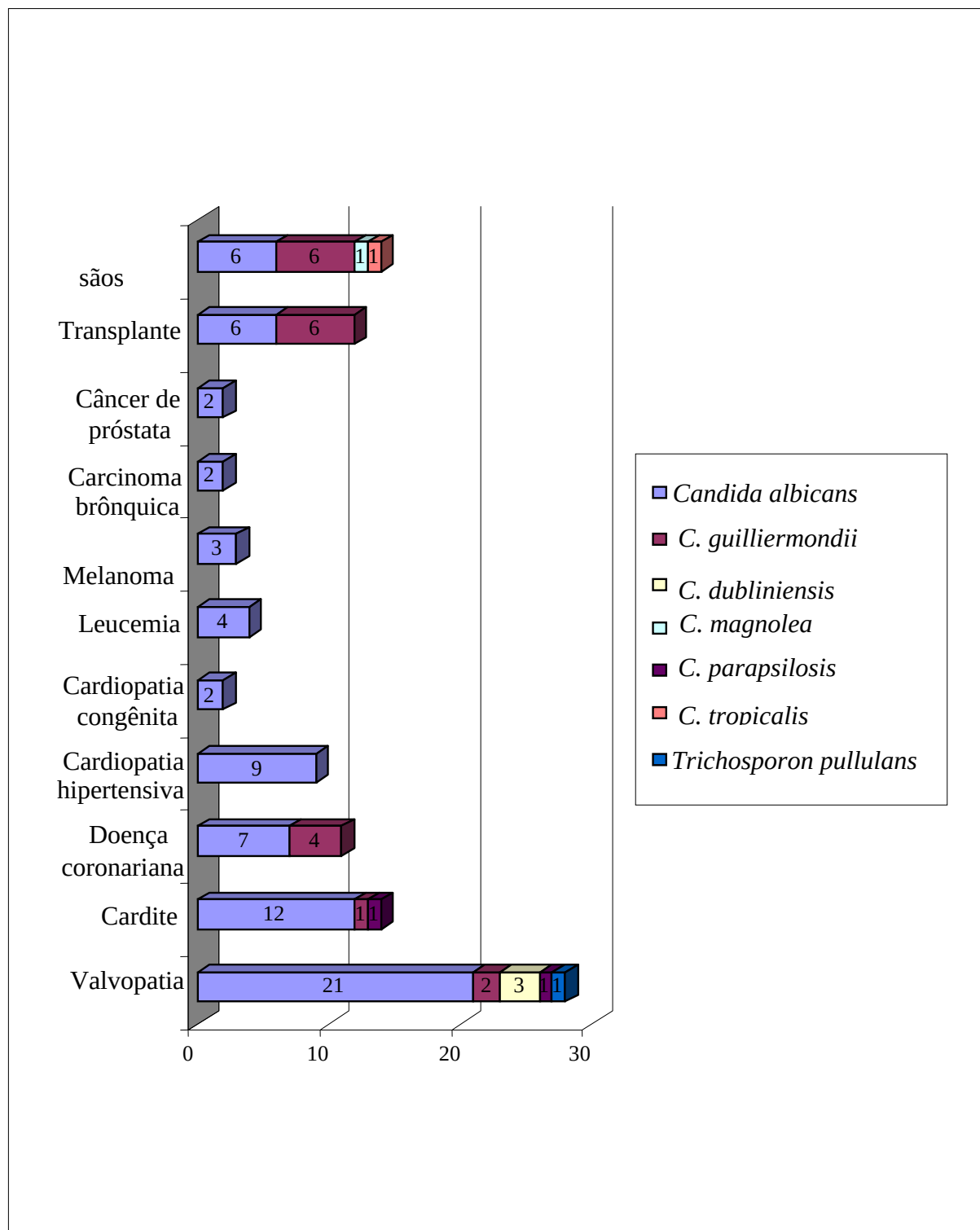


Figura 3. Espécies de leveduras isoladas de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, Recife, PE, Brasil.

Entre as leveduras isoladas, verifica-se a predominância de *C. albicans*, o que não houve diferença significativa $\chi^2 = 68,10$ em relação às outras espécies isoladas. O isolamento de *C. albicans* em material de cárie dentária é utilizado como mecanismo específico para conseguir refúgios na cavidade bucal, podendo atuar como sapróbio ou através da capacidade de invasão de tecidos, provocar infecções fúngicas. É reconhecida como agente oportunista freqüente nas infecções em pacientes imunocomprometidos, associado a fatores como, baixa imunidade, desordens endócrinas, lesões em tecidos moles, higiene bucal deficiente, prolongada terapia antibiótica, fatores nutricionais, baixo fluxo salivar. Esses fatores seriam desencadeantes de infecção, porém, a severidade desta, além de estar relacionada a fatores do hospedeiro também se deve às propriedades inerentes ao próprio microrganismo, o que tem sido enfatizado por ARENDORF; WALKER (1980); CANNON et al. (1995); SEN et al. (1997); FLAITS; HICKS,(1999); MOREIRA et al.. (2001); NIKAMA et al. (1998); GUILHERMETTI (2004); CERQUEIRA et al. (2005).

O isolamento de leveduras em material de cárie dentária em pacientes com cardiopatia pode ser apoiado por Joklik et al. (1995) quando dizem que *A Candida guilliermondii*, e *C. parapsilosis* podem estar associadas à infecção de mucocutânea, particularmente na mucosa bucal e podem ser agente etiológico de endocardites. Colombo et al. (1999) cita que a *C. parapsilosis* está envolvida frequentemente em candidemia de pacientes hospitalizados.

A *C.dubliniensis* tem sido isolada por todo o mundo, entretanto, é raro seu aparecimento na microbiota bucal de indivíduos, além de ter sido isolada ainda do trato respiratório, vagina e trato gastrointestinal, e também de urina, escarro e feridas, estando implicada em infecções invasivas, mesmo em HIV-negativo, quando acometidos por doenças graves (JAINKITTIVONG et al.1998; SULLIVAN; COLEMAN, 1998; FOTEDAR; HEDAITHY, 2004).

A *Candida tropicalis* é uma levedura, que possui a capacidade de atravessar a mucosa intestinal e atingir a corrente sanguínea em indivíduos imunocomprometidos, podendo estar associado a infecções na mucosa bucal, vaginal e nas unhas (JOKLIK et al., 1995).

A *C. magnolia* tem sido isolada de suco de frutas cítricas, de alimentos, sendo confirmado por BARNETT (2002).

O *Trichosporon pullulans* tem sido isolado em alimentos, amostras de água e em solo segundo BARNETT (2002).

O Isolamento de *C. albicans* em material de cárie dentária de pacientes com neoplasia pode ser apoiado por Hoope et al.(1995) quando relata que há aumento do número de *C. albicans* em paciente com neoplasia em detrimento do maior desenvolvimento de fatores predisponentes, como a quimioterapia que predispõem da desintegração da mucosa, à ulceração e a infecção secundária em pacientes imunocomprometidos e que fazem uso de quimioterapia antineoplásica. A *C. albicans* é o microrganismo mais freqüente na cavidade bucal de pacientes submetidos a quimioterapia. Spolidorio et al. (2001) relatam que em pacientes portadores de neoplasia submetidos a radioterapia produz severa diminuição de fluxo salivar dentro das duas semanas de tratamento e que os fatores salivares estão correlacionados com o aumento dos microrganismos, além de quebrar o equilíbrio ecológico da microbiota bucal, favorecendo o aparecimento de infecções e maior proliferação de microrganismos.

O isolamento de *Candida* sp em material de cárie dentária de pacientes com transplante hepático pode ser apoiado por Hussain et al. (2003) quando dizem que pacientes com transplante hepático tem determinado emergência de espécies que não é identificada como *C. albicans*, resistentes a antifúngicos, bem como não demonstrou diminuição de mortalidade nos pacientes expostos.

O isolamento de *Candida* sp em material de cárie dentaria de pacientes clinicamente são é possível, uma vez que as leveduras fazem parte da microbiota bucal tanto de pessoas saudáveis com de portadores de infecções, sendo confirmada por BARNETT et al. (2002).

As leveduras são de ocorrência comum na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo a *Candida albicans* a espécie predominante na microbiota bucal, constituindo 60 a 70% do total de isolamento. Os microrganismos do gênero *Candida* são, em geral, comensais, mas, em determinados indivíduos e em situações específicas, podem transformar-se na forma parasitária, produzindo candidoses bucais (JORGE et al. 1997).

Os resultados obtidos em relação a faixa etária, sexo e espécies isoladas de amostra de material de cárie dentária de pacientes analisados apresentam-se da seguinte forma: Na faixa etária de três a 14 anos, dos nove pacientes do sexo masculino foram obtidas oito *C. albicans* e uma *C. guilliermondii*, dos quatro pacientes do sexo feminino, três *C. albicans* e uma *C. dubliniensis*; Na faixa etária de 15 a 24 anos, dos quatro pacientes do sexo masculino, foram obtidas quatro *C. albicans*, dos dez pacientes do sexo feminino, nove *C. albicans* e uma *C.*

dubliniensis; Na faixa etária de 25 a 34 anos, dos nove pacientes do sexo masculino, oito *C. albicans* e uma *C. parapsilosis*, dos nove pacientes do sexo feminino, oito *C. albicans* e uma *C. magnolea*; Na faixa etária de 35 a 44 anos, dos oito pacientes do sexo masculino, oito *C. albicans*, dos oito pacientes do sexo feminino, sete *C. albicans*, uma de *C. tropicalis* e um de *Trichosporon pullulans*; Na faixa etária de 45 a 54 anos, dos 17 pacientes do sexo masculino, 15 *C. albicans* e dois *C. guilliermondii*, dos seis pacientes do sexo feminino, três *C. albicans* e três *C. guilliermondii*; Na faixa etária de 55 a 80 anos, dos seis pacientes do sexo masculino, três *C. albicans*, uma *C. guilliermondii*, uma *C. dubliniensis* e uma *C. parapsilosis* (Figura3). Não houve diferença significativa $\chi^2 = 102,23$ entre faixa etária e espécies isoladas de material de cárie dentária dos sexos masculino e feminino. Ainda não houve considerações feita pela literatura consultada referente a faixa etária, sexo e espécies isoladas. Portanto, provavelmente esta é a primeira vez que foi considerada essa relação.

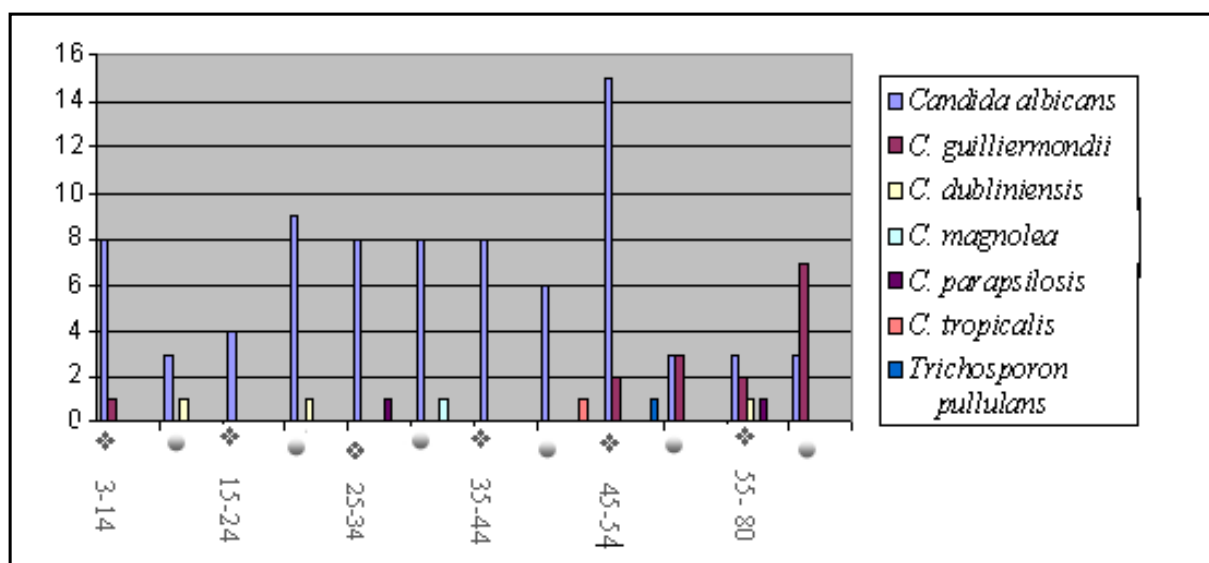


Figura 4. Espécies de leveduras isoladas de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do hospital Universitário Oswaldo Cruz-UPE, Recife, PE, Brasil em relação ao sexo e a faixa etária.

❖ Masculino ● Femenino

5 CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos na presente pesquisa, pode-se inferir:

Ocorreram leveduras em material de cárie dentária de pacientes clinicamente comprometidos e clinicamente sãos;

Pode ser detectada apenas uma espécie de leveduras por amostra de cárie dentária, independente do grupo de pacientes;

Diferentes espécies de leveduras podem ser isoladas de material de cárie dentária de pacientes independente da condição clínica.

Cada espécie isolada pode corresponder a uma amostra de cárie dentária;

C. albicans pode ser isolada de material de cárie dentária de pacientes com neoplasia, com cardiopatia hipertensiva e com cardiopatia congênita.

Entre pacientes com valvopatia, cardite e doença coronariana pode ser prevalente *C. albicans* em amostras de cárie dentária.

A prevalência de *C. albicans* não está relacionada ao sexo e faixa etária, entretanto está a patologia.

O maior número de isolados se encontrou em amostras de material de cárie dentária de pacientes numa faixa etária entre 45 a 54 anos, e a maior diversidade de espécies numa faixa etária de 55 a 80 anos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-ELTEEN KH, ABU-ALTEEN RM. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. **New Microbiol.**, v. 21(1), p. 41-8, 1998.
- AHMAD S, KHAN Z, MUSTAFA AS, KHAN ZU. Epidemiology of *Candida* colonization in an intensive care unit of a teaching hospital in Kuwait. **Med Mycol.**, v. 41(6), p. 487-3, 2003.
- ANDERSON, M.L.; ODDS, F. C. Adherence of *Candida albicans* to vaginal epithelia: significance of morphological form and effect of ketoconazole. **Mycoses**, v.28 (11), p.531-540, 1985.
- ARENDORF TM, WALKER DM. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Arch Oral Biol.**, v.25, p.1-10, 1980.
- BARNETT, J.A.;PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast: characteristic and identification**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1002 p. 2002.
- BARROS LM. **Ocorrência de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em sítios subgengivais e nas mucosas da cavidade bucal: Genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases**. (tese). Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.
- BIRMAN, E. G. et al. *Candida albicans*: frequency and characterization in oral câncer (Stage I) from smokers and drinkers. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.14, p. 101-3, 1997.
- BOAZ, MR et al- A importância de medidas preventivas na profilaxia de infecções em pacientes submetidos a transplante cardíaco nos primeiros 30 dias de pós-operatório. **Braz J Cardiovasc Surg.**, v. 21(2), p. 188-193, 2006.
- BRANCHINI, M.L. et al. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. **J.Clin. Microbiol.**, v.32, p. 452-6, 1994.
- BROWN.D.M.;JABRA-RIZK.M.A.;FALKER,W.A. et al identification of *Candida dubliniensis* in a study of HIV – soropositive pediatric dental patients. Pediatric Dental patients, Chicago, v.22, n.3, p.234-38, 2000.
- BUDTZ-JÖRGENSEN, E. Etiology, pathogenesis, therapy and prophylaxis of yeast infection. **Acta Odontol Scand.**, v. 48, p. 61-69, 1990.
- BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. Estatística básica. 5ª ed. São Paulo: Saraiva, 92 p, 2003.
- CALDERONE RA, FONZI WA. Virulence factors of *C. albicans*. **Trends Microbiology**, v.9, p.327-335, 2001.
- CAMPISI G, PIZZO G, MILLICI ME, MANCUSO S, MARGIOTTA V. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus-infected subjects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 93(3), p. 281-6, 2002.

CANNON, R. D.; HOLMES, A. R.; MASON, A. B.; MONK, B. C. Oral *Candida*: clearance, colonization or Candidiasis. **Journal of Dental Research**, v. 74, p.1152-1161, 1995.

CERQUEIRA, D.F; CASTRO, G.F.; POMARICO, L.; PORTELA M. B.; PRIMO, L.; SOUZA, I.P.R.; SOARES, R.M.A. Lesões de cárie em dentina: fator de risco para *Candida* spp em crianças HIV+. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v.19, supplement (abstract Pa 109), p.124, 2005.

CHENG MF, YANG YL, YAO TJ, LIN CY, LIU JS, TANG RB, YU KW, FAN YH, HSIEH KS, HO M, LO HJ. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species. **BMC Infect Dis.**, v. 5, p.1-5, 2005.

CHIGURUPATI, R., RAGHVAN, S.S.; STUDENPALOVICH, D.A. Pediatric HIV infection and its oral manifestations: a review. **Pediatric Dentist**, v.18 (2), p.106-13, 1996.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M.L.; RICHTMANN, R.; DEROSI, A.; WEY, S. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.34, p.281-286, 1999.

COLOMBO AL, NAKAGAWA Z, VALDETARO F, BRANCHINI MLM, KUSSANO EJU, NUCCI M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v.41, p. 235-239, 2003.

DARWAZEH AM & AL-BASHIR A. Oral candidal flora in healthy infants. **J Oral Pathol Med.**, v. 24, p. 361-364, 1995.

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

DE BACKER MD, MAGEE PT, PLA J. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. **Annu Rev Microbiol.**, v. 54, p. 463-98, 2000.

DE REPENTIGNY L, AUMONT F, BERNARD K, BELHUMEUR P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 68(6), p. 3172-79, 2000.

EDMAN, J. C. Micologia médica. In: BROOKS, G.F. et al. **Microbiologia Médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 45, p. 420-423, 1998.

EPSTEIN JB, HANCOCK PJ, NANTEL S. Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: An outcome-based analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 26(2), p.154-63, 2003.

FERNANDES, L.; ALVES, M. Risco de cárie: teste de risco, diagnóstico e tratamento de pacientes baseados no risco. In: *Odontologia preventiva e social: textos selecionados/Curso de Mestrado em Odontologia Social*. Natal: PROIN. EDUFRN – UFRN, p.73-86, 1997.

FIDEL PL, JR. Immunity to *Candida*. **Oral Dis.**, v. 8(2), p. 69-75, 2002.

FINEGOLD, S.M.& WEXLER,H.M. Therapeutic implications of bacteriologic findings in mixed aerobic-anaerobic infections.Antimicrob. Agents Chemother.,v.32,n.5,p.611-616,1988.

FLAITZ, C. M., HICKS, M. J. Oral candidiasis in children with immune suppression: clinical appearance and therapeutic considerations. **J Dent Chil.**, p. 161-166, 1999.

FOTEDAR R, AL HEDAITHY SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. **Mycoses**, v. 47(3/4), p.150-5, 2004.

GEORGE KS, FALKLER WA, JR. Coaggregation studies of the *Eubacterium* species. **Oral Microbiol Immunol.**, v.7(5), p. 285-90, 1992.

GHANNOUM,M.^a; ABU-ELTEEN,K.H. Pathonegenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v.33,n.6,p.265-82, june1990.

GHANNOUM MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev.** v.13(1),p.122-143, 2000;

GREENSPAN D & GREENSPAN JS. Oral manifestations of Human Immunodeficiency virus infection. **Dent Clin North Amer** ., v. 37(1), p.21-32, 1993.

GROLL AH, DE LUCCA AJ, WALSH TJ. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. **Trends Microbiol.**, v. 6(3), p.117-24, 1998.

GUILHERMETTI E. **Micologia Médica:** Uma área das análises clínicas que está em expansão.RBAC., v. 36(1), p.51-3, 2004.

HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v.5, p.78-111, 1994.

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

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

HÖFLING JF, ROSA EAR. Main techniques employed in the molecular epidemiology of *Candida* species. **Alpe Adria Microbiol J.**, v. 8(1), p.5-23, 1999.

HOOG GS, GUARRO J, GENÉ J, FIGUERAS MJ. Utrech: Centraalbureau voor schimmelcultures. **Atlas of clinical fungi.** 2^a edição, 1126p. 2000.

HOPPE JE, KLINGEBIEL T, NIETHAMMER D. Orointestinal yeast colonization of pediatric bone marrow transplant recipients: surveillance by quantitative culture and serology. **Mycoses**, v. 38, p.51-57, 1995.

HOSSAIN H, AANSAR F, SCHULZ-WEIDNER N, WETZEL WE, CHAKRABORTY T, DOMANN E. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiol Immunol.**, v.18(5), p. 302–8, 2003.

HUBE B, NAGLIK J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiol.**, v. 147(8), p.1997-2005, 2001.

HUSSAIN S, TOLLEMAR J, DOMINGUES E A, BAUMGARTEN K, HUMAN A, PATERSON DL, WAGENER MM, KUSNE S, SINGH N. Changes in the spectrum and risk factors for invasive candidiasis in liver transplant recipients: prospective, multicenter, case-controlled study. **Transplant.**, v.75, p.2023-2029, 2003.

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

JACOB LS, FLAITSZ CM, NICHOLS M, HICKS JM. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. **JADA** v. 129, p.187- 194, 1998.

JAINKITTIVONG A, JOHNSON DA, Yeh CK. The relationship between salivary histatin levels and oral yeast carriage. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 13(3), p.181-7, 1998.

JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B.; WILFERT, C.M. **Zinsser microbiologia**. 20ªed. Buenos Aires: Editora Panamericana, 1995.

JORGE, A. O. C. et al. Influência do uso de aparelhos ortodônticos sobre a presença de *Candida albicans* na cavidade bucal. **Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent.**, São Paulo, v. 41, n.6, p.308-310, nov./dez. 1987.

JORGE, A. O. C.; KOGA-ITO, C.Y.; GONÇALVES, C.R. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva dos pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev. Odont.** Univ. São Paulo, v. 11, n. 4, p. 279-285, out./dez. 1997.

JORGE AOC. Testes microbiológicos de atividade de cárie. In:—. **Microbiologia Bucal**, 2 ed. São Paulo: Santos, cap. 5, p.66-75, 1998.

KAM AP, XU J. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. **Diag Microbiol Infect Dis.**, v. 43, p.19-28, 2002.

KOLENBRANDER, P. E. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. **An Rev Microbiol**, v.54, p.413-37, 2000.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. **Diagnóstico microbiológico- 5a ed.** MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro-RJ, 1465 p, 2001.

KRCMERY, V. & BARNES, A. J. Non-albicans *Candida* spp causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. **J. Hosp. Infect.**, Londres, v.50, p.243-260, 2001.

KURTZMAN, C. P. Yeast systematics – from phenotype to genotype. **Food Technology and Biotechnology**, v. 3(4), p.261-266, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** Sarvier, São Paulo, 1104p. 2002.

LANGLAIS, R. P.; Miller, C. S. **Atlas colorido de doenças comuns da boca.** Guanabara Koogan, 199p. 2002.

LARONE, D. H. Yeasts and yeast like organisms. **In: Medically important fungi: a guide to identification** . 3. ed. Washington ASM Press, Cap. 4, p. 61-89, 1995.

LEUNG WK, DASSANAYAKE RS, YAU JYY, JIN LJ, YAM WC, SAMARANAYAKE LP. Oral colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. **J Clin Microbiol.**, v.38(6), p.2219-26, 2000.

LINDQUIST B. et al., “Dental Location of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Humans Harboring Both Species” *Caries Res.* v. 25, p.146-152, 1991.

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

LOCKHART SR, JOLY S VARGAS K.. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. **J Dent Res.** v.78(4), p.857-868, 1999.

LOESCHE, W. J. **Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay.** Microbiological Reviews, v.50, p.353-380, 1986.

MARREN, P. V.; BEIGHTON, D.; LYNCH, E. Isolation de yeasts de root caries in an elderly population. **J Dent Res.**, v.75, p. 343, 1996.

MARTINS, C.A.P. et al. Presence of *candida* spp. in chronic periodontitis patients. **Cienc Odontol Bras**, v.5, n.3, p. 75-83, set./dez. 2002.

MEDRANO, D.J.A. ; BRILHANTE , R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; RABENHORDT & SIDRIM, J.J.C. Candidemia in a Brazilian Hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Rev. Inst. Med. Trop.S.Paulo**, v. 48(1), p. 17-20, jan-feb, 2006.

MEILLER TF, JABRARIK MA, BAQUI AMA et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV seropositive patients in United States. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod.**, v. 88 (5), p. 573-580, 1999.

MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J.**, v. 31(1), p.1-7, 1998.

MOREIRA, D.; SPOLIDÓRIO, D. M. P.; RODRIGUES, J. A. O.; BORIOLLO, M. F.G.; PEREIRA, C. V.; ROSA, E. A. R.; HÖFLING, J. F. Biotipos de *Candida spp.* na cavidade oral de escolares de diferentes categorias socioeconômicas de Piracicaba-SP, Brasil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v.15, n.3, p.187-195, 2001.

NAJZAR-FLEGER, D.; FILIPOVI, D.; PRPIF, G.; KOBLER, D. *Candida* in root canal in accordance with oral ecology. **J. Int. Endod.**, v. 25, p. 40, 1992.

NAPIMOGA, M. H. **Avaliação do padrão de clonalidade e virulência de *S.mutans* isolados de indivíduos livres de cárie e cárie-ativos.** Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Piracicaba, SP, 62f, 2004.

NIEWERTH M, KORTING HC. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses.** v.44, p.9-10, 2001.

NIKAWA H, HAMADA T, YAMAMOTO T. Denture plaque-past and recent concerns. **J Dentistry.**, v. 26, p. 299-304, 1998.

ODDS FC. Pathogenesis of *Candida* infection. **J American Academic Dermatol.** v.(31), p.S2-S5,1994.

ODDS FC. Introduction and historial note. In: *Candida* and candidosis . London: Bailliere Tindall, cap.1,p.1-15, 1998.

OLLERT MW, WENDE C, GÖRLICH M, MCMULLAN-VOGEL, CG, BORG VON ZEPPELIN M,VOGEL CW, et al.Increase expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from Human Immunodeficiency Viruspositive patients. **J Clin Microbiol.**, v. 33(10), p. 2543-9, 1995.

PATTERSON JE. Epidemiology of fungal infections in solid organ transplant patients. **Transpl Infect Dis.**, v.1(4), p. 229-36, 1999.

PFALLER MA. Epidemiology of fungal infections: The promise of molecular typing. **Clin Infect Dis.**, v.20, p.1535-9, 1995.

PIZZO G, DI FRANCESCO GG, MILLICI ME, GIANGRECO R. Effect of dietary carbohydrates on the in vitro epithelial adhesion of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei*. **New Microbiol.** v. 23(1), p. 63-71, 2000.

PIZZO G, BARCHIESI F, FALCONI L, DI FRANCESCO GG, ARZENIB D, MILLICI ME, et al. Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates. **Arch Oral Biol.** v.47(3), p.189-96, 2002.

PORTELA, M.B.; SOUZA, I.P.R.; COSTA, E.M.M.B.; HAGLER, A.N.; SOARES, R.M.A.; SANTOS, A.L.S. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in Human Immunodeficiency Virus-Positive and health children from Rio de Janeiro, Brazil. **J.Clin. Microbiol.**, Washington, v.42, n.12, p.5925-7, 2004.

POWDERLY WG. Mucosal candidiasis caused by nonalbicans species of *Candida* in HIVpositive patients. **AIDS**; v. 6, p. 6045, 1992.

POWDERLY WG, ROBINSON K, KEATH EJ. Molecular epidemiology of recurrent oral candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-positive patients: evidence for two patterns of recurrence. **J Infect Dis.** v.168(2), p. 463-6, 1993.

RAMIREZ-AMADOR, V.; SILVERMAN Jr.; S.; MAYER P. Et al. *Candida* colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v 84, n.2, p.149-153, aug.1997.

RAMOS GOMEZ FJ et al, Classification, diagnostic criteria, and treatment recommendations for orofacial manifestations and in HIVinfected children. **J Clin Pediatr Dent.**, v.23(2), p. 85-89, 1999.

RAMOS, A. O.; MEDEIROS, A.R.C; PAULISTA, P.P; ABBOUD, C.S.; MENEGUELO, Z.M. Infecção por *Aspergillus* em Aorta Ascendente em Portador de Próteses Aórtica e Mitral. **Arq Bras Cardiol**, v. 81, nº 4, p. 417-8, 2003.

REGO MA, KOGAITO CY, JORGE AOC. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida spp.* in children. **Pesq Odontol Bras.**, v.17(4), p. 3226, 2003.

RICHARDSON, M.D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **J. Antimicrob. Chemo.**, Londres, v. 56, suplemento S1, p. i5-i11, 2005.

RODRIGUEZ-GALAN MC, CORREA SG, IRIBARREN P, SOTOMAYOR CE. Phenotypic and functional changes on phagocytic cells recruited at the site of *Candida albicans* infection after chronic varied stress exposure. **Med Mycol.**, v. 40(5), p. 485-92, 2002.

SAMARANAYAKE, L.P. & Mac FARLANE, T.W. **Oral Candidosis**. London: Ed. Buter Worth Eco Ltd., 265p., 1990.

SAMARANAYAKE YH, SAMARANAYAKE LP. Experimental oral candidiasis in animal models. **Clin Microbiol Rev.**, v.14(2), p. 398-429, 2001.

SEN, B. H.; SAFAVI, K. E.; SAPANGBERG, L. S. W. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v.84, p.68-73, 1997.

SWEENEY MP, BAGG J, BAXTER WP et al. Oral disease in terminally ill cancer patients with xerostomia. **Oral Oncol**, v. 34 (2), p.123-6, 1998.

SIQUEIRA JF, JR., RÔÇAS IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.97(1), p. 85-94, 2004.

SILVA, J.O., FRANCESCHINI, S.S., CANDIDO, R.C. Presença de leveduras em mucosas e fezes de indivíduos aparentemente saudáveis e de pessoas com sintomas de infecção fúngica. **Rev.Inst.Adolfo Lutz**, v.61(2),p.113-120, 2002.

SOARES LF, CASTRO GFBA, SOUZA IPR, PINHEIRO M. Pediatric HIVrelated oral manifestations – a fiveyear retrospective study. **Braz Oral Res**; v.18(1), p.611, 2004.

SPOLIDORIO, D. M. P.; SPOLIDORIO, L. C.; BARBEIRO, R. H.; HÖFLING, J. F.; BERNARDO, W. L. C.; PAVAN, S. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida sp* e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 4, p. 354-358, out./dez. 2001.

STARR JR, WHITE TC, LEROUX BG, LUÍS HS, BERNARDO M, LEITÃO J, et al. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese school children followed for 3 years. **Oral Microbiol Immunol.**, v.17(5), p.304–10, 2002.

STRAUSBAUGH LJ, SEWELL DL, TJOELKER RC, HEITZMAN T, WEBSTER T, WARD TT, PFALLER MA. Comparison of three methods for recovery of yeasts from hands of health-care workers. **J Clin Microbiol.**, v. 34, p. 471-473, 1996.

SULLIVAN DJ, WESTERNENG TJ, HAYNES KA, BENNETT DE, COLEMAN DC. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. **Microbiol.**, v.141,p.1507-21, 1995.

SULLIVAN D, COLEMAN D. *Candida dubliniensis*: an emerging opportunistic pathogen. **Curr Top Med Mycol.**, v.8, p.15–25, 1998.

SULLIVAN D. J. et al. Comparision of the epidemiology drug, resistance mechanism, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Fems Yeast Res.**, v..4,n.4-5,p.369-376, Feb.2004.

SZIEGOLEIT F, SZIEGOLEIT A, WETZEL WE. Effect of dental treatment and/or local application of amphotericin B to carious teeth on oral colonization by *Candida* . **Med Mycol** ., v.37 (5), p.345-50, 1999.

TAMURA NK, GASPARETTO A, SVIDzinski TIE. Evaluation of adherence of *Candida* species to urinary catheters. **Mycopathol** , v.156, p. 269-272, 2003.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Tratado de Cariologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 404 p, 1988.

THYLSTRUP A, FEJERSKOV O. Diferentes conceitos da cárie dentária e suas implicações. In:———. **Cariol Clin**. 2. ed. São Paulo: Ed. Santos, cap. 9, p. 209-17, 1995.

WALSH TJ. HIEMENS JW. ANAISSIE E. Recent progress artd current problems in tratment of invasive fungal infections in neutropenic patients. **Infec Dis Clin North Am**, v.10, p. 365-400, 1996.

WEYNE, S; HARARI, S. Cariologia: implicações e aplicações clínicas. In: BARATIERI, L.N. et al. **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Santos Ed., p.3-29, 2001.

VALLE, DANIELLA DELLA. **Avaliação de um Programa de Promoção de Saúde Bucal utilizando diferentes indicadores**. Rio de Janeiro. Dissertação (Odontologia) Faculdade de Odontologia, 168 p., 2002.

ZAMBON, J. J.; REYNOLDS, H. S.; GENCO, R. J. Studies of the subgingival microflora in patiens with acquired immunodeficiency syndrome. **J Periodontol.** , v.61, p. 699-704, 1990.

ZÖLLNER, M. S. A. C. **Prevalência de *Candida* spp. em lactentes em aleitamento materno e em suas mães**. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 218 f, 2000.

7 ANEXO

7.1 TERMO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1o. andar
Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE
Fone: (81) 2101.1530 - Fone/Fax: (81) 2101.1536

Data: 11.7.2006

Protocolo: _____

Documento recebido:

- | | |
|---|----------------------|
| (☒) | Projeto de Pesquisa |
| () | Emenda(s) |
| () | Efeito(s) Adverso(s) |
| () | Relatório Parcial |
| () | Relatório Atualizado |
| () | Relatório Final |

Pesquisador Principal: Gilmora Ferreira de Araújo.

Nome da Pesquisa:

Isolação de leveduras em cáries dentárias de crianças
atendidas no Ambulatório de Odontologia do Hospital Univer-
sitário Ovídio Cruz - HUOC da Universidade de Pernambuco -
Recife.

Próxima reunião: 25/7/2006.


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Prof. Wilson de Oliveira Jr.
Coordenador

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da pesquisa: Leveduras isoladas de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – HUOC da Universidade de Pernambuco-UPE –Recife-PE-Brasil

Nome do (a) pesquisador (a): Gilmara Ferreira de Araújo.

Endereço: Rua Manoel Pereira de Moraes. Nº162, Santo Antonio, Carpina-PE.

Esta pesquisa tem como objetivo conhecer a diversidade de leveduras isoladas de material de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, além de determinar a espécie prevalente nos processos carióticos e relacionar a diversidade de leveduras sexo e idade. As amostras serão coletadas por um profissional da área de odontologia, através do uso de cureta periodontal esterilizada. As mesmas serão acondicionadas em tubos esterilizados contendo 1mL de água destilada esterilizada adicionada de 50mg de cloranfenicol/L, que serão acondicionadas em baterias térmicas e encaminhadas ao Laboratório da Pós-graduação em Biologia de Fungos, da Universidade Federal de Pernambuco para procedimento do exame direto e cultura., não oferecendo riscos para os pacientes.

OBS 2: Os pacientes, mesmo após a aprovação do presente termo, poderão retirar-se a qualquer momento da pesquisa, sem nenhum prejuízo para os mesmos.

Desta forma eu _____, RG
nº _____, expedido por _____,
abaixo assinado, atesto que li e entendi o conteúdo deste consentimento e aceito de livre e
espontânea vontade participar neste estudo clínico.

Recife, _____ de _____ de 2005.

Nome do pesquisador

Assinatura

Nome do paciente

Assinatura

1ª Testemunha

Assinatura

2ª Testemunha

Assinatura

7.3 FICHA DE CONTROLE DOS PACIENTES DA ODONTOLOGIA

Nome: _____

Idade: _____ Procedência: Zona urbana () Zona rural ()

Filiação: Mãe: _____

Pai: _____

Escolaridade do pai: Analfabeto () 1º grau () 2º grau ()

Da mãe : Analfabeto() 1º grau () 2º grau ()

Endereço: _____

Nº _____ Cidade _____ Fone: _____

1. Queixa principal:

2. História da doença atual

3. Quantas vezes escova os dentes ao dia ? 1 () 2 () 3 ()

4. Realiza exame de rotina nos dentes ?

5. Apresenta problema com seus dentes/ ou gengivas ? Sim () Não ()

Qual? _____

6. Apresenta algum desconforto na boca? Sim () Não ()

7. Sente dificuldade de engolir? Sim () Não ()

8. Apresenta dificuldade de mastigar ? Sim () Não ()

7.4 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO / CLASSIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

Data:

Amostra

Procedência : Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco

Meios	Pm	Mv	Ar	As	Ba	Cl	Bs	Bm	Bbi	Fc	Fov	Fob	P	S	A	R	Outros
																	Macroscopia
Meios	Pm	Mv	Ar	As	Ba	Cl	Bs	Bm	Bbi	Fc	Fov	Fob	Cultura				
													Cor _____ Superfície _____ Brilho _____ Consistência _____ Bordos _____ Obs: _____				
Água Bile de Boi	<u>Clamidósporos</u>			+	-	Agar Gorodkowa		<u>Ascósporos</u>		+	-	BDA + Bile de Boi		Filamentação		+	-
Fontes de Carbono														Fontes de Nitrogênio			
Assimilação	Gli	Gal		Sac	Mal	Lac	Raf	Xil	Treal	Mc	Mb	Metil	Ara	NH3SO4	KNO3		
Fermentação																	
Urease	+	-	Acido acético				+	-	Cápsula		+	-	Caco3		+	-	
Sabourand líquido																	
Observação																	
Classificação	Gênero:																
	Espécie:																

7.5 ARTIGO DE Nº 1 SUBMETIDO A REVISTA BRASILIAN JOURNAL
MICROBIOLOGY

SHORT COMMUNICATION

**LEVEDURAS ISOLADAS DE CÁRIE DENTÁRIA DE PACIENTES ATENDIDOS NO
AMBULATÓRIO DE ODONTOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
OSWALDO CRUZ- HUOC DA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO-UPE-RECIFE-
BRASIL**

Gilmara Ferreira de Araujo^{1*}; Idalina Inês Fonsêca Nogueira Cambuim¹; Lusinete Aciole de Queiroz¹; Fabíola Marques¹

Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco¹, Recife, PE, Brasil.

* Correspondence to:

Rua: Manoel Pereira de Moraes nº162, Santo Antônio, Carpina, Pernambuco, Brasil. 55816-390 Tel.081.2126-8570 Fax:(xx081)2126-8482

E-mail: gilmarafaraujo@yahoo.com.br; e idalinacambuim@hotmail.com

**YEASTS ISOLATED OF THE DENTAL CARIE PATIENTS OF THE ATTENDED
AMBULATORY ODONTOLOGY OF THE UNIVERSITY HOSPITAL OSWALDO
CRUZ - HUOC THE UNIVERSITY OF PERNAMBUCO-UPE-RECIFE-PE-BRAZIL**

RESUMO

Foram realizadas coletas em 100 pacientes atendidos no Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco para identificar leveduras em amostra clínica de cárie dentária. Foram isoladas leveduras em todas as amostras clínicas, sendo 77,23 % de *C.andida albicans*, 14,85 % *C. guilliermondii*, 2,97 % *C. dubliniensis*, 1,98 % *C. parapsilosis*, 0,99 % *C. magnolea*, 0,99 % *C. tropicalis* e 0,99 % *Trichosporon pullulans*.

Palavras-chave: Leveduras, pacientes, *Candida* spp, *Trichosporon* sp.

As leveduras faz parte da microbiota normal humana, que pode provocar candidíase que é considerada uma infecção oportunista. São comumente isoladas da cavidade oral humana, distribuídas em diversos sítios, dentre estes, lesão de cárie dentária e pode provocar doenças quando relacionadas a fatores predisponentes, principalmente quando o paciente está sob terapia antibiótica. Espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes mais freqüentemente isolados, correspondendo a cerca de 80% das infecções fúngicas de origem hospitalar e a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia (8). Até alguns anos atrás *Candida albicans* era considerada uma espécie de maior interesse clínico, contudo, paralelamente ao aumento geral das candidemias, observou-se aumento das infecções de corrente sangüínea por espécies que não *Candida albicans*: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* e *C. lusitaniae* (2), além de espécie de *Trichosporon* que pode causar infecções em humanos semelhantes as candidoses. A forma disseminada, denominados thricosporonosis (aguda ou crônica), os pacientes podem correr risco, principalmente os pacientes imunossupressores. (4,5). Tendo em vista a importância de conhecer uma microbiota presente na cavidade oral, especificamente em lesões de cáries dentárias, o estudo teve como objetivo a identificação de leveduras presentes em lesão de carie dental.. Foram coletadas amostras de lesões de cárie dentária de cem pacientes, atendidos no Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco - Recife, semeada em ágar Sabourand com cloranfenicol. As leveduras foram isoladas, e identificadas por testes morfológicos e bioquímicos. As leveduras foram identificadas de acordo com BARNETT et al. (1), HOOG et al. (3) KREGER-VAN RIJ (6) E LODDER (7).

Foram isoladas 101 leveduras, sendo uma *Candida albicans* predominante entre as espécies de *Candida* com 78 em número de isolados, seguido pela *C.guilliermondii* com 15, *C.dubliniensis* com.. 3, *C. parapsilosis* com.. 2, *C.magnolia* com 1 e *C.tropicalis* com 1, além de 1 isolado de *Trichosporon pullulans* (Tabela 1).

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- 1.Barnett, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. University Press, Cambridge, 2002, 1002p.
- 2.Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kussano EJU, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology** 41: 235-239, 2003.
- 3 Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Utrech: Centraalbureau voor schimmelcultures. **Atlas of clinical fungi**. 2ª edição, 2000
4. Hsu, C.F.; Wang, C.G.; Hung, C.S.; Cheng, S.N., Chen, Y.H.; Chu, M.L. *Trichosporon beigelii* causing oral mucositis and fungaemia: report of one case. **Chung Hua Min Kuo Hsiao Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih**, 39(3):191-194, 1998.
- 5.Krcmery, V.Jr.; Mateicka, F.; Kunova, A. Spanik, S.; Giarfas, J.; Sycova, Z.; Trupl, J. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Support Care Cancer**, 7(1):39-43, 1999
- 6.Kreger-van Rij, N.J.W. The yeast: a taxonomic study. **Elsevier Sci. Publication**, Amsterdam, 1984, 1091p.
- 7.Lodder, J. *The Yeast: a taxonomic study*. **North Holland Publishing Company**, Oxford, 1970, 1385p.

- 8.St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, Noel G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology** , 39: 949-953, 2001.

Tabela 1. Leveduras isoladas de cárie dentária de pacientes atendidos no Ambulatório de odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz

Espécies de leveduras	Frequência
<i>Candida albicans</i>	78
<i>C. guilliermondii</i>	15
<i>C. dubliniensis</i>	3
<i>C. magnolia</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	2
<i>C. tropicalis</i>	1
<i>Trichosporon pullulans</i>	1

SHORT COMMUNICATION

**YEASTS ISOLATED FROM DENTAL CARIE IN PATIENTS ATTENDED IN
CLINIC ODONTOLOGY OF THE UNIVERSITY HOSPITAL OSWALDO CRUZ-
HUOC IN UNIVERSITY OF PERNAMBUCO-UPE-RECIFE-PE-BRAZIL**

Gilmara Ferreira de Araujo*; Idalina Inês Fonsêca Nogueira Cambuim; Ana Beatriz Sotero Siqueira; Lusinete Aciole de Queiroz.

Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

* Correspondence to:

Rua: Manoel Pereira de Moraes nº162, Santo Antônio, Carpina, Pernambuco, Brasil. CEP: 55816-390 Tel.(081)2126-8570 Fax(xx081) 21268482
E-mail: gilmarafaraujo@yahoo.com.br; idalinacambuim@hotmail.com

**YEASTS ISOLATED FROM DENTAL CARIE IN PATIENTS ATTENDED IN
CLINIC ODONTOLOGY OF THE UNIVERSITY HOSPITAL OSWALDO CRUZ-
HUOC IN UNIVERSITY OF PERNAMBUCO-UPE-RECIFE-PE-BRAZIL**

ABSTRACT

Were collect from one patients attended in the Odontology Ambulatory of Hospital Universitário Oswaldo Cruz of University in Pernambuco to identification yeast in sample dental cavity. Yeasts were isolated from one hundred clinical samples. The isolated yeasts were: 77,23% *Candida albicans*, 14,85% *C. guilliermondii*, 2,97% *C. dubliniensis*, 1,98% *C. parapsilosis*, 0,99% *C. magnoleae*, 0,99% *C. tropicalis* and 0,99% *Trichosporon pullulans* .

Keys-word: Yeasts, patients, dental carie, *Candida* spp, *Trichosporon* sp.

**YEASTS ISOLATED FROM DENTAL CARIE IN PATIENTS ATTENDED IN
CLINIC ODONTOLOGY OF THE UNIVERSITY HOSPITAL OSWALDO CRUZ-
HUOC IN UNIVERSITY OF PERNAMBUCO-UPE-RECIFE-PE-BRAZIL**

RESUMO

Foram realizadas coletas em 100 pacientes atendidos no Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco para identificar leveduras em amostras clínicas de material de cárie dentaria. Foram isoladas leveduras em todas as amostras clínicas, sendo 77,23 % de *Candida albicans*, 14,85% *C. guilliermondii*, 2,97% *C. dubliniensis*, 1,98% *C. parapsilosis*, 0,99% *C. magnolia*, 0,99 % *C. tropicalis* e 0,99% *Trichosporon pullulans*.

Palavras-chave: Leveduras, pacientes, cárie dentária, *Candida* spp, *Trichosporon* sp.

Yeast is a part of the normal human microbiota; candidosis can be considered an opportunistic infection. Are commonly isolated from the human oral cavity, distributed in different sites, among them, in dental caries and can cause disease when predisposing factors are present, mainly when the patients is under antibiotic therapy. Species of the genus *Candida* have been the players most often isolated, account for about 80% of fungal infections of origin hospital and are the fourth cause of infection of the bloodstream, leading to the death of around 25 to 38% of patients who develop candidemia (8). Until a few years ago *Candida albicans* was the kind of larger clinical interest, however, parallel to the overall increase in candidemias there was increase in infections of the blood by *Candida* species of non-*albicans* as: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilhermondii* and *C. lusitaniae* (2), in addition to *Trichosporon* specie can cause many human infections similar to candidiasis. The disseminated form, denominated thrichosporonosis (acute or chronic), can be life-threatening in patient with malign diseases, mainly immunosuppressed patients (4, 5). In view of the importance of knowing the microflora present in the oral cavity, specifically in lesions of dental caries, the aim study was the identification presence yeasts in dental caries. Sample clinical material of dental caries was analysed from the one hundred patients, attended in the Ambulatory of Odontology University Hospital Oswaldo Cruz, of University in Pernambuco - Recife, were plated in Sabourand dextrose agar with chloramphenicol, isolated, and identified by morphologic tests and biochemicals. The strains were identified according to Barnett et al. (1), Hoog et al. (3) Kreger-Van Rij (6) and Lodder (7). Were isolation 101 yeasts, such *C. albicans* predominant among *Candida* species with 78 isolates, followed by *C. guilhermondii*, 15; *C. dubliniensis*, 3; *C. magnolia*, 1; *C. parapsilosis*, 2; *C. tropicalis*, 1 and *T. pullulans*, 1 (Table 1).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordination Personal Perfectioning Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Barnett, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. University Press, Cambridge, 2002, 1002p.
2. Colombo AL, Nakagawa Z, Valdetaro F, Branchini MLM, Kussano EJU, Nucci M. Susceptibility profile of 200 bloodstream isolates of *Candida* spp collected from Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology** 41: 235-239, 2003.
3. Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Utrech: Centraalbureau voor schimmelcultures. **Atlas of clinical fungi**. 2^a edição, 2000.
4. Hsu, C.F.; Wang, C.G.; Hung, C.S.; Cheng, S.N., Chen, Y.H.; Chu, M.L. *Trichosporon beigelli* causing oral mucositis and fungaemia: report of one case. **Chung Hua Min Kuo Hsiao Erh Ko I Hsueh Hui Tsa Chih**, 39(3):191-194, 1998.
5. Krcmery, V.Jr.; Mateicka, F.; Kunova, A. Spanik, S.; Giarfas, J.; Sycova, Z.; Trupl, J. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazole. **Support Care Cancer**, 7(1):39-43, 1999
6. Kreger-van Rij, N.J.W. The yeast: a taxonomic study. **Elsevier Sci. Publication**, Amsterdam, 1984, 1091p.
7. Lodder, J. *The Yeast: a taxonomic study*. **North Holland Publishing Company**, Oxford, 1970, 1385p.

8. St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R, Bourgault AM, Libman M, Lemieux C, Noel G. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, 39: 949-953, 2001.

Table 1. Yeasts species in patients attended at the Odontology Ambulatory of Hospital University Oswaldo Cruz

Yeasts species	Frequency
<i>Candida albicans</i>	78
<i>C. guilliermondii</i>	15
<i>C. dubliniensis</i>	3
<i>C. magnolea</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	2
<i>C. tropicalis</i>	1
<i>Trichosporon pullulans</i>	1

7.6 ARTIGO DE Nº 1 SUBMETIDO A REVISTA BRASILIAN JOURNAL
MICROBIOLOGY

PREVALÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* EM CÁRIE DENTARIA DE PACIENTES CARDIOPATAS

Gilmara Ferreira de Araujo^{1*}; Idalina Inês Fonsêca Nogueira Cambuim¹; Lusinete Aciole de Queiroz¹.

Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco¹, Recife, PE, Brasil.

* Correspondence to:

Rua: Manoel Pereira de Moraes nº162, Santo Antônio, Carpina, Pernambuco, Brasil. 55816-390 Tel. 081. 2126-8570 Fax: (xx081) 2126-8482

E-mail: gilmarafaraujo@yahoo.com.br; e idalinacambuim@hotmail.com

PREVALÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* EM CÁRIE DENTARIA DE PACIENTES CARDIOPATAS

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de *Candida* spp em cárie dentária de pacientes cardíacos, apresentando cardiopatia congênita, cardiopatia hipertensiva, cardite, doença coronariana e valvopatia. As amostras de cáries dentárias foram coletadas de 63 pacientes com auxílio de cureta periodontal. O exame direto revelou a presença de células de leveduras em 32 amostras; em seguida as amostras clínicas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de 50mg/L de cloranfericol, foram obtidas 63 culturas de *Candida*, as colônias foram purificadas e identificadas pelas características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas. Foram obtidas quatro espécies de *Candida* sendo 51(79%) *C. albicans*, sete (11%) *C. guilliermondii*, três (5%) *C. dubliniensis*, duas (3%) *C. parapsilosis* e uma (2%) *Trichosporon pullulans*. A espécie prevalente em todas as cardiopatias foi *C. albicans*. A maior diversidade de espécies de *Candida* foi observada nos pacientes com valvopatia. Entretanto, *C. albicans* é o agente responsável pela elevada incidência de infecções fúngicas oportunistas em indivíduos gravemente enfermos e/ou de imunocomprometidos.

Palavras-chave: leveduras; *Candida albicans*; cárie dentária; paciente cardiopata.

INTRODUÇÃO

Leveduras são microorganismos que fazem parte da microbiota humana desde o seu nascimento e têm sido isoladas de vários locais, dentre eles em cárie dentária, que é uma destruição do tecido do dentes causada por ácidos orgânicos proveniente da fermentação microbiana de alimentos hidratos de carbono e que podem se constituir de um reservatório de microorganismos potencialmente invasivos, e também causar infecções superficiais ou sistêmica. As leveduras mais comum encontradas na cavidade bucal pertencem ao gênero *Candida*, e podem estar presentes, entre os homens, como sapróbio ou causar infecções, especialmente quando a sua presença relacionada a fatores como baixa imunidade, desordens endócrinas, tecidos danificados, deficiência de higiene bucal, terapia antibiótica prolongada, fatores nutricionais e propriedades intrínsecas de microorganismos (4). Os biofilmes de *C. albicans* pode ser importante tanto para manifestação de candidíase como para a colonização, em cáries dentárias e bolsas periodontais (6). O objetivo do presente trabalho é o conhecer leveduras isoladas de cárie dentária, objetivando o tratamento odontológico para uma possível prevenção de infecção fúngica oportunista para não haver somatização com doença de base. Uma vez que espécies de *Candida* tem o poder de adesão ao epitélio, invadem tecidos, produzem fatores de virulência e induzem reações inflamatórias (5,2). Pacientes cardiopatas estão sujeitos a desenvolver infecções fúngicas, sendo a candidíase, a infecção mais freqüente nestes pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

No Ambulatório de Odontologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, foi coletado num período de março/2006 a junho/2007 amostras de cárie dentária de sessenta e três pacientes com idade entre três e 78 anos e com diferente cardiopatia. Os 63 pacientes foram organizados em grupos de acordo com a sua cardiopatia: dois apresentavam cardiopatia congênita; nove cardiopatia hipertensiva; catorze, cardite; onze, doença coronariana e vinte e sete, valvopatia. As amostras foram coletadas com cureta periodontal e, em seguida, colocados em tubos esterilizados contendo 1mL de água destilada esterilizada, com 50 mg / L de cloranfenicol. Para exame direto, aliquotas foram extraídas do material em tubos para a visualização de estruturas fúngicas. Para isolar, 0,2 mL foi retirada da suspensão e semeadas em placas de Petri, duplicatas com Agar Dextrose Sabouraud a 50 mg / L de cloranfenicol e mantidas a 30°C e 37°C durante 72 horas. Após o aparecimento de colônias, foram purificadas e, em seguida, identificadas com base na morfofisiologia, de acordo com KURTZMAN; FELL (3) E BARNETT et al (1).

RESULTADOS

Em todas as amostras clínicas foram isoladas espécies de *Candida*, 51 (80,95%) *C. albicans*, 7 (11,11%) *C. guilliermondii*, 3 (4,76%) e *C. dubliniensis* e 2 (3,17%) *C. parapsilosis*. A *C. albicans* foi a espécie mais frequentemente isolada em todas as cardiopatias, seguido por *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*. A maior diversidade de espécie *Candida* foi observada em pacientes com valvopatia, das quais *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* foram isoladas.

DISCUSSÃO

Entre as amostras de cárie dentária deste estudo, 79% foram positivas para *Candida albicans* seguido de *C. guilliermondii* 11%, *C. dubliniensis* 5%, *C. parapsilosis* 3% e *Trichosporon pullulans* 1%. Das espécies isoladas, *C. albicans* foi mais prevalente em todas as cardiopatias. No entanto, não foi confirmada pela literatura consultada. Verificou-se, pela primeira vez, a relação de *Candida sp.* Obtida a partir de material de cárie dentária para com os tipos de cardiopatias. O resultado obtido neste estudo permitiu verificar que *C. albicans* foi a espécie mais frequente em todas as cardiopatias, seguido por *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* *Trichosporon pullulans*. O maior número e maior diversidade de espécie de *Candida* foi observada em pacientes com valvopatia, das quais *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, e *Trichosporon pullulans* (Fig.1). Com base nestes dados, é possível concluir que a alta incidência de *Candida albicans* pode indicar um aumento na possibilidade de um paciente com cardiopatia desenvolver infecções fúngicas, somatizando com a doença de base.

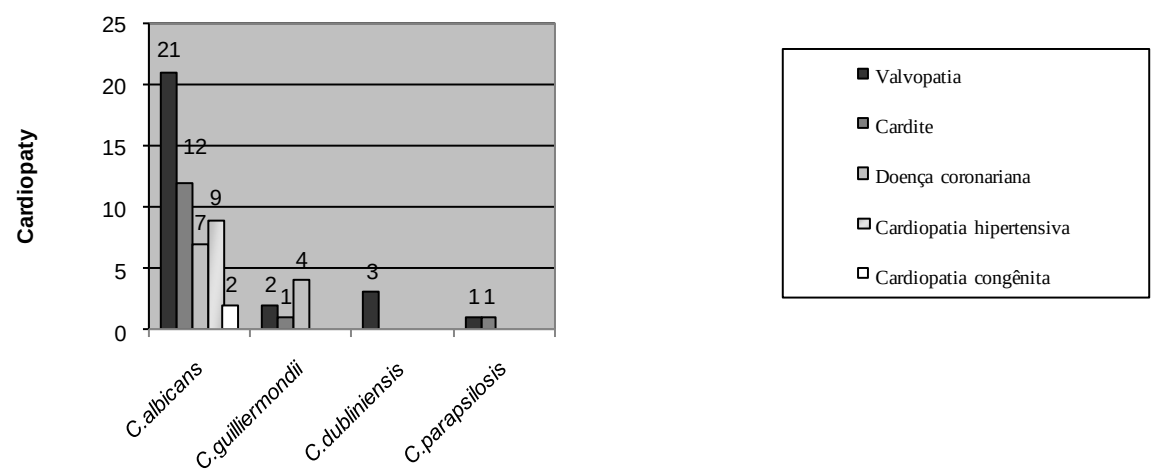
AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. **Yeast: Characteristic And Identification**. 3 Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 1002 P.
2. Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* Yeasts In Chronic Periodontitis Tissues And Subgingival Microbial Biofilms In Vivo. **Oral Dis**. 2004; (10): 106-12.
3. Kurtzman, C. P. *Yeast Systematics – From Phenotype To Genotype*. **Food Tecnology And Biotechnology** 3(4): 261-266, 1998.
4. Moreira, D.; Spolidório, D. M. P.; Rodrigues, J. A. O.; Boriollo, M. F.G.; Pereira, C. V.; Rosa, E. A. R.; Höfling, J. F. Biotipos De *Candida Spp*. Nacavidade Oral De Escolares De Diferentes Categorias Socioeconômicas De Piracicaba-Sp, Brasil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, V.15, N.3, P.187-195, 2001.
5. Reynaud Ah, Nygaard-Ostby B, Boygard Gk, Eribe Er, Olsen I, Gjermo P. Yeasts In Periodontal Pockets. **J Clin Periodontol**. 2001; 28(9): 860-4.
6. Starr Jr, White Tc, Leroux Bg, Luís Hs, Bernardo M, Leitão J, et al. Persistence Of Oral *Candida Albicans* Carriage In Healthy Portuguese School Children Followed For 3 Years. **Oral Microbiol Immunol**. 2002; 17(5): 304–10.

Figura 1. Espécies de *Candida* isoladas de cárie dentária de pacientes portadores de cardiopatia



PREVALENCE OF *CANDIDA ALBICANS* IN THE CARIE DENTAL OF CARDIAC PATIENTS

Gilmara Ferreira de Araujo^{1*}; Idalina Inês Fonsêca Nogueira Cambuim¹; Lusinete Aciole de Queiroz¹.

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

* Correspondence to: gilmarafaraujo@yahoo.com.br

Rua: Manoel Pereira de Moraes nº162, Santo Antônio, Carpina, Pernambuco, Brasil. 55816-390 Tel. 081. 2126-8570 Fax: (xx081) 2126-8482

PREVALENCE OF *CANDIDA ALBICANS* IN THE DENTAL CARIE OF CARDIACS**PATIENTS****ABSTRACT**

The aim of this study was to observe the prevalence of *Candida* spp in the dental cavity of cardiac patients, who presented congenital cardiopathy, hypertensive cardiopathy, carditis, coronarial disease, and valvopathy. The samples were collected from 63 patients with the use of periodontal curette. Direct examination revealed the presence of yeast cells in 32 samples; then, the samples were seeded in Sabouraud Dextrose Agar with 50mg/L of Chloramphenicol. Sixty-three cultures of *Candida* were obtained, being 51(80.95%) *C. albicans*, 7(11.11%) *C. guilliermondii*, 3(4.76%) *C. dubliniensis* and 2 (3.17%) *C. parapsilosis*. The prevalent species in all cardiopathies was *C. albicans*. A higher diversity of *Candida* specie was observed in patients with valvopathy. However, *C. albicans* is the agent responsible for the high incidence of opportunistic fungal infeccctions in immunocompromised patients.

Key words: yeast; dental carie; *Candida albicans*; patients cardiacs.

PREVALÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* EM CÁRIE DENTÁRIA DE PACIENTES CARDÍACOS

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar a prevalência de *Candida* spp em cárie dentária de pacientes cardíacos, apresentando cardiopatia congênita, cardiopatia hipertensiva, cardite, doença coronariana e valvopatia. As amostras de cáries dentárias foram coletadas de 63 pacientes com auxílio de cureta periodontal. O exame direto revelou a presença de células de leveduras em 32 amostras; em seguida as amostras clínicas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose acrescido de 50mg/L de cloranfericol, foram obtidas 63 culturas de *Candida*, as colônias foram purificadas e identificadas pelas características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas. Foram obtidas quatro espécies de *Candida* sendo 51(80,95%) *C. albicans*, sete (11,11%) *C. guilliermondii*, três (4,76%) *C. dubliniensis* e duas (3,17%) *C. parapsilosis*. A espécie prevalente em todas as cardiopatias foi *C. albicans*. A maior diversidade de espécies de *Candida* foi observada nos pacientes com valvopatia. Entretanto, *C. albicans* é o agente responsável pela elevada incidência de infecções fúngicas oportunistas em indivíduos gravemente enfermos e/ou de imunocomprometidos.

Palavras-chave: leveduras; *Candida albicans*; cárie dental; pacientes cardíacos.

INTRODUCTION

Yeasts are microorganisms which make part of human microbiota since birth and have been isolated from varied places, such as dental cavity, which represents a destruction of teeth tissue caused by organic acids provinent from microbial fermentation of food carbohydrates and that may constitute a reservatory for potentially invasive microorganisms, and also cause superficial or systemic infections. The most ordinary yeasts found on buccal cavity belong to the genus *Candida*, and may be present, in men, as saprobic or causing infections, specially when their presence is linked to factors related to the host, as low immunity, endocrine disorder, tissue harm, poor oral hygiene, long-term antibiotic therapy, nutritional factors, and properties inherent from microorganisms (4). Biofilms containg *C. albicans* may be important for candidiasis manifestation and colonization process, both in dental cavities and in periodontal pocket (6). The objective of the present work is the knowledge on the yeasts found on dental cavities, aiming the odontologic treatment for a possible prevention of a opportunistic infection somatization with the basis disease. For *Candida* specie being able to adhere to the epithelium, invade tissue, produce virulence factors and induce inflammatory reactions (5,2), cardiopathy patients are subjected to fungal infectious processes, being spotlighted candidiasis, the most frequent infection in these patients.

MATERIAL AND METHODS

Collect took place at the Odontology Ambulatory of Hospital Universitário Oswaldo Cruz, from march/2006 to june/2007. Samples of dental cavities from sixty-three patients with different cardiopathies, between the ages of three and 78 years old. The 63 patients were gathered in groups according to their cardiopathy: two presented congenital cardiopathy, nine, hypertensive cardiopathy, fourteen, carditis, eleven, coronarial disease and twenty-seven, valvopathy . The samples were collected with the use of a periodontal curette, and then placed in sterilized tubes containing 1mL of distilled sterilized water, with 50mg/L of cholamphenicol. For direct examination, aliquotes were taken from the material in the tubes for visualization of fungal structures. For isolating, 0,2 mL out of the suspension was taken and seeded in duplicate, on Sabouraud Dextrose Agar medium with 50mg/L of chloramphenicol in Petri dishes, and kept at 30°C and 37°C for 72 hours. After colonies appeared, they were purified and then identified based on morphophysiology, according to Kurtzman; Fell (3) and Barnett et al (1).

RESULTS

Especie of *Candida* were isolated in all clinical samples, being 51(80.95%) *C. albicans*, 7(11.11%) *C. guilliermondii*, 3(4.76%) *C. dubliniensis* and 2 (3.17%) *C. parapsilosis*. (Table 1) .In relation to the isolated specie, *C. albicans* was the most frequently found in all cardiopathies, followed by *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* and *C. parapsilosis*. A higher diversity of *Candida* specie was observed in patients with valvopathy, from which *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, e *C. parapsilosis* were isolated .

DISCUSSION

Among the samples from dental cavities in this study, 80.95% were positive to *Candida albicans* followed by 11.11% to *C. guilliermondii*, 4.76% to *C. dubliniensis* and 3,17% to *C. parapsilosis*. (Table1). Out of the isolated specie, *C. albicans* was the most prevalent in all cardiopathies (Table2). However, it was not confirmed by the consulted literature. It was verified, for the first time, the relation of *Candida* sp. obtained from dental cavities material to the kinds of cardiopathies.

The results obtained in this paper allowed verify that *C. albicans* was the most frequent species in all cardiopathies, followed by *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* and *C. parapsilosis*. A higher diversity of *Candida* specie was observed in patients with valvopathy, from which *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, and *C. parapsilosis* were isolated . Based on these data, it is possible to conclude that the high incidence of *C. albicans* may indicate an increase on the possibility of a patient with cardiopathy develop fungal infection, somatizing with his basis pathology.

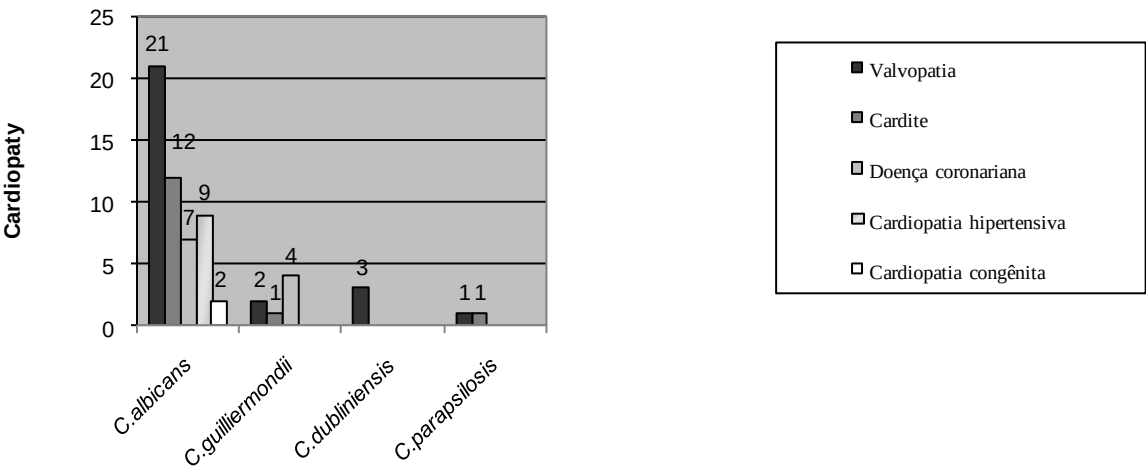
ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Coordination Personal Perfectioning Superior (CAPES).

REFERENCES

1. Barnett, J.A.; Payne, R.W.; Yarrow, D. *Yeast: Characteristic And Identification*. 3 Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2002, 1002 P.
2. Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* Yeasts In Chronic Periodontitis Tissues And Subgingival Microbial Biofilms In Vivo. **Oral Dis**. 2004; (10): 106-12.
3. Kurtzman, C. P. *Yeast Systematics – From Phenotype To Genotype*. *Food Tecnology And Biotechnology* 3(4): 261-266, 1998.
4. Moreira, D.; Spolidório, D. M. P.; Rodrigues, J. A. O.; Boriollo, M. F.G.; Pereira, C. V.; Rosa, E. A. R.; Höfling, J. F. Biotipos De *Candida Spp*. Nacavidade Oral De Escolares De Diferentes Categorias Socioeconômicas De Piracicaba-Sp, Brasil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, V.15, N.3, P.187-195, 2001.
5. Reynaud Ah, Nygaard-Ostby B, Boygard Gk, Eribe Er, Olsen I, Gjermo P. Yeasts In Periodontal Pockets. **J Clin Periodontol**. 2001; 28(9): 860-4.
6. Starr Jr, White Tc, Leroux Bg, Luís Hs, Bernardo M, Leitão J, et al. Persistence Of Oral *Candida Albicans* Carriage In Healthy Portuguese School Children Followed For 3 Years. **Oral Microbiol Immunol**. 2002; 17(5): 304–10.

Figure 1 Specie *Candida* isolation dental carie of cardiac patients



7.7 COMPROVANTES DE ENVIO DOS ARTIGOS DE Nº 1 E 2

Nº1 PREVALENCE OF *CANDIDA ALBICANS* IN THE DENTAL CAVITY OF CARDIAC PATIENTS

To the Brazilian Journal of Microbiology. Your manuscript has been assigned number 1495.
At this moment the Editors are dealing with your manuscript for peer-review.

Nº2 YEASTS ISOLATED FROM DENTAL CARIE IN PATIENTS ATTENDED IN CLINIC ODONTOLOGY OF THE UNIVERSITY HOSPITAL OSWALDO CRUZ- HUOC IN UNIVERSITY OF PERNAMBUCO-UPE-RECIFE-PE-BRAZIL

To the Brazilian Journal of Microbiology. Your manuscript has been assigned number 1795.
At this moment the Editors are dealing with your manuscript for peer-review.

7.7 NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA BRASILIAN JOURNAL MICROBIOLOGY

Trabalho de pesquisa relata os resultados de pesquisa original ainda não publicada. O texto deve ter de 12 a 15 páginas impressas, em espaço duplo, além das referências bibliográficas, tabelas e figuras pertinentes. Um Resumo com Título e Palavras-chave em português também devem ser incluídos.

Nota breve é um relato conciso de novas e importantes descobertas. A Nota Breve deve ser redigida de acordo com as instruções para a preparação de Trabalho de Pesquisa, mas sem as divisões em tópicos. Os Resumos em português e em inglês devem conter no máximo 50 palavras. Tabelas e Figuras devem limitar-se a duas tabelas ou duas figuras, ou uma tabela e uma figura. A designação short communication aparecerá no topo do trabalho. O autor deve indicar que o manuscrito é uma nota breve, permitindo que o texto seja avaliado de maneira apropriada.

Mini-revisão - Artigos de revisão serão sobre temas de interesse geral na área de microbiologia, escritos por especialistas convidados. Além dos resumos em inglês e em português, o texto poderá ter também um índice.

Preparação do texto

1. Todos os manuscritos devem ser datilografados em espaço duplo, com amplas margens, com as páginas numeradas em seqüência. Trabalhos de pesquisa devem ter no máximo 15 páginas impressas, incluindo figuras e tabelas. Notas breves devem ter no máximo 6 páginas.
2. Todos os manuscritos devem ser redigidos em inglês. Os Editores recomendam que, antes de ser submetido, o texto seja cuidadosamente revisado por alguém fluente em inglês. Manuscritos em inglês precário não serão aceitos.
3. O texto deve ser organizado em tópicos, conforme descrito no próximo parágrafo. O nome dos tópicos deve ser digitado em letras maiúsculas (ABSTRACT, INTRODUCTION etc.). A citação de tabelas e de figuras deve iniciar com maiúsculas (as shown in Table 1..., as presented in Fig. 2..., etc.).

4. A abreviação de palavras e de símbolos deve seguir as recomendações da IUPAC-IUB Commission. O Sistema Métrico deve ser adotado em todo o texto.
5. Como regra, as referências devem ser citadas por seus números. Excepcionalmente, quando autores são mencionados no texto, a menção deve ser feita de acordo com os seguintes exemplos: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith et al. (número) mentioned that... Não utilizar letras maiúsculas.
6. Aos autores dos trabalhos aceitos para publicação será solicitado o envio de um disquete de 3 1/2" contendo o trabalho digitado em um processador de texto adequado para PC. Esse material pode ser enviado também por correio eletrônico.

ORGANIZAÇÃO

PÁGINA DE TÍTULO: Uma página separada deve conter o título do trabalho, o nome completo (inclusive o primeiro nome e as iniciais intermediárias) e a afiliação de cada autor. Um asterisco deve indicar o autor para correspondência. Os números de telefone e fax e o endereço eletrônico, quando disponível, devem ser assinalados no pé da página. A página de título não deve ter nenhum texto. O título deve ser o mais conciso possível e indicar claramente o objetivo do trabalho, não devendo conter abreviações. Expressões do tipo "Effects of...", "Influence of...", "Study on..." etc. devem ser evitadas. O título deve ser preparado com muito cuidado pois ele é utilizado nos sistemas de busca.

ABSTRACT: Deve ser apresentado em uma página separada, limitando-se a no máximo 250 palavras. Ele deve resumir o conteúdo básico do trabalho, devendo ser compreensível mesmo sem a consulta do texto completo. Um abstract não deve conter referências, tabelas ou abreviações incomuns. Abstracts devem ser preparados com muito cuidado pois são publicados em textos de referência e lidos por pessoas que não têm acesso ao trabalho completo. Três a cinco keywords também devem ser apresentados.

RESUMO: Resumo é o abstract redigido em português. Sua preparação deve seguir as recomendações para a preparação do abstract em inglês. O resumo deve ter também um título em português. As regras para o título em português são as mesmas para o título em inglês (ver acima). Três a cinco palavras-chave também devem ser apresentadas. O resumo e o título em português também devem ser apresentados em página separada.

INTRODUÇÃO: Deve iniciar em página nova e fornecer ao leitor informações suficientes para que os resultados relatados no trabalho possam ser avaliados sem consulta à literatura. Entretanto, a introduction não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve também dar subsídios para a compreensão dos objetivos do trabalho que está sendo apresentado.

MATERIAIS E MÉTODOS: Esse tópico deve fornecer informações suficientes para a repetição do trabalho. Descrição repetida de detalhes de técnicas anteriormente publicadas deve ser evitada. Quando um método publicado é modificado pelos autores, essas modificações devem constar do texto. A origem de reagentes, meios de cultura e equipamentos (companhia, cidade, estado, país) deve ser mencionada. Nomes comerciais e marcas registradas também devem ser indicados. A utilização de subtópicos geralmente facilita a leitura e a compreensão desse item.

RESULTADOS: Esse tópico deve, através de texto, tabelas ou figuras, fornecer os resultados experimentais. Caso um tópico relativo à Discussion seja incluído, evitar a excessiva interpretação dos resultados, que deverá ser feita na Discussion. Caso Results e Discussion sejam combinados em um único tópico, os resultados devem ser discutidos no texto quando adequado. Tabelas devem ser numeradas independentemente das figuras, devendo-se utilizar números arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto. A localização mais adequada das tabelas e figuras deve ser assinalada.

DISCUSSÃO: Deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações disponíveis.

AGRADECIMENTOS: Esse tópico é opcional e deve vir após a discussão. Destina-se a agradecimentos por apoio financeiro e pessoal.

REFERÊNCIAS: A lista de referências bibliográficas deve ser apresentada em ordem alfabética, de acordo com o sobrenome do primeiro autor. Todos os autores devem ser mencionados. As referências devem ser numeradas em ordem crescente. Cada referência deve ser citada no texto por seu número. Os nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com o sistema utilizado pelo Biological Abstracts ou Chemical Abstracts. Todas as referências mencionadas na lista devem ser citadas no texto, assim como todas as referências citadas no texto devem constar da lista. Seguir os seguintes exemplos:

a. Artigo em revista

Campos, L.C.; Whittam, T.S.; Gomes, T.A.T.; Andrade, J.R.C.; Trabulsi, L.R. *Escherichia coli* serogroup 0111 includes several clones of diarrhaegenic strains with different virulence properties. *Infect. Immun.* , 62:3282-3288, 1994.

b. Trabalho ou capítulo em livro

Nelson, E.B. Current limits to biological control of fungal phytopathogens. In: Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G.; Knudsen, G. (eds). *Handbook of applied mycology: soils and plants*. Marcel Dekker, New York, 1991, p.327-355.

c. Livro pelos autores

Salyers, A.A.; Whitt, D.D. *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*. ASM, Washington, 1994, 418p.

Referências como personal communication ou unpublished data devem ser evitadas, embora algumas vezes elas sejam necessárias. Nesses casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências bibliográficas. Referências a respeito de trabalhos accepted for publication ou in press podem ser utilizadas. No entanto, referências de trabalhos submitted ou in preparation não devem ser utilizadas.

Tabelas

As tabelas não devem estar no meio do texto. Cada tabela deve ser apresentada em uma página separada e numerada em seqüência empregando números arábicos. O título da tabela deve aparecer no topo, e descrever de maneira clara as informações apresentadas. Títulos e subtítulos devem ser concisos, apresentando os dados em colunas e linhas, cuidadosamente arranjadas.

Figuras

As figuras devem ser identificadas com números arábicos. Dados apresentados em tabelas não devem ser repetidos nas figuras. A legenda deve vir no pé da figura.

Cópias

O autor indicado receberá gratuitamente quinze cópias do trabalho. Cópias adicionais, pagas, devem ser requisitadas no retorno da prova gráfica corrigida.