

FERNANDA BELLO COSTA DE SOUZA

**ESTUDO DA COLONIZAÇÃO E VARIABILIDADE GENÉTICA DE LEVEDURAS
DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS COM
SÍNDROME DE DOWN**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de Concentração: Microbiologia - Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vânia Aparecida Vicente

Co-orientador: Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz

CURITIBA

2007

Universidade Federal do Paraná

Sistema de Bibliotecas

Souza, Fernanda Bello Costa

Estudo da colonização e variabilidade genética de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de crianças com Síndrome de Down.
ix; 91f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Vânia Aparecida Vicente

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica).

1. *Candida* 2. Síndrome de Down I. Título II. Vicente, Vânia Aparecida III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica).

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar dedico este trabalho e toda a minha vida a DEUS, que esteve comigo ao longo desta jornada, me fortalecendo a cada momento, me carregando no colo nos momentos difíceis e derramando bênçãos no meu caminho e na vida da minha família.

Aos meus pais, Juraci e Terezinha, por mais uma vez terem demonstrado que são os melhores pais do mundo, sempre me incentivando, me apoiando e torcendo por mim através dos seus gestos e orações. Essa vitória é nossa!

Ao meu marido Marcos... Você foi a pessoa que primeiro plantou esse desejo no meu coração, quando eu ainda não imaginava os caminhos a seguir. Obrigada pelo carinho, amor, apoio e incentivo nestes dois anos. Obrigada por existir e estar ao meu lado. Eu te amo!

A minha irmã Flávia, por sempre estar ao meu lado, por tornar minha vida mais feliz.

A minha vózinha, que sempre vibrou com cada conquista. Mesmo longe, sei que a senhora hoje vibra por mais esta! Saudades...

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Vanete Soccol, pela coragem e determinação com que coordena o Programa de Mestrado. Sua dedicação incansável torna possível o nosso crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada.

A Prof.^a Dr.^a Vânia Vicente, minha orientadora, pelo incentivo, apoio, e dedicação destinadas a este projeto. Seus ensinamentos e esforços ao longo do trajeto muito contribuíram para meu aperfeiçoamento e realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, carinho, orientação e empenho. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz, pela confiança depositada em mim, por aceitar me guiar em mais um projeto. Pelos ensinamentos, apoio e palavras de incentivo. Obrigada.

A Cirurgiã-Dentista Vera Carneiro. O carinho com que você trata as crianças “especiais” inspira todos ao seu redor... Obrigada pelo seu exemplo de vida, apoio, compreensão e amizade.

A todos os funcionários do Ambulatório da Síndrome de Down, pelo apoio e carinho com que me acolheram durante suas rotinas de trabalho. Muito obrigada.

A Cirurgiã-Dentista Francisca Berenice Dias Gil e a todos os funcionários do Ambulatório de Pediatria Preventiva, pelo acolhimento e ajuda prestados durante o trabalho.

A Rosângela e a Marissol, pela supervisão na prática laboratorial, pelo apoio incondicional e pela amizade. Vocês são pessoas especiais.

A Nanci, Emília, Lili, Cida e Adriana, da equipe do Laboratório de Micologia, obrigada pelo acolhimento carinho, amizade e ensinamentos. Obrigada por fazerem meus dias de trabalho mais felizes.

A Dicler, sua calma e seu jeito meigo me fizeram perceber que seria possível atingir meus objetivos. Obrigada pelo apoio desde o início desta trajetória.

A colega de curso e profissão, Mônica, pela paciência, pelas dicas e ensinamentos. Obrigada pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Colombo, pela gentileza em ceder as linhagens referências usadas na pesquisa.

Ao Prof. Walter Boerger e sua equipe de estagiários, pela acolhida no Laboratório de Ecologia Molecular, empréstimo de equipamentos e ajuda oferecida.

Aos professores do Programa de mestrado, pelos valiosos ensinamentos e exemplos de profissionalismo, ética e competência.

Aos colegas e amigos do curso de mestrado, pelo apoio e incentivo durante todo o período, em especial Josiane e Ana Cristina pela amizade.

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia, Eduardo, Isadora, Paulo, pela constante colaboração.

A todas as crianças que participaram do estudo, vocês são todas especiais!

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Vá até onde puder ver. Quando lá chegar, poderá ver ainda mais longe.

Johann Wolfgang Von Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 SÍNDROME DE DOWN.....	5
3.2 <i>Candida</i> spp.	11
3.2.1 Identificação das Espécies do Gênero <i>Candida</i>	12
3.2.2 Colonização por <i>Candida</i> spp.	15
3.2.3 Candidoses, fatores de virulência e aspectos imunológicos do hospedeiro.....	19
3.2.3.1 Aspectos Clínicos das Candidoses Bucais	20
3.3 SÍNDROME DE DOWN X <i>Candida</i> spp.	22
3.4 MARCADORES MOLECULARES	24
3.4.1 Marcadores RAPD.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 MEIOS DE CULTURA.....	29
4.1.1 Ágar Saboraud Dextrose	29
4.1.2 Ágar Batata Dextrose – BDA.....	29
4.1.3 Ágar Hicrome <i>Candida</i> (Himedia ®).....	29
4.1.4 Ágar Fubá com Tween 80	30
4.1.5 Meio para Assimilação de Carboidratos.....	30
4.1.6 Meio para Assimilação de Nitrato.....	30
4.2 SOLUÇÕES REAGENTES	30
4.2.1 Solução Salina.....	30
4.2.2 DNA polimerase	30
4.2.3 dNTP.....	31
4.2.4 Gel de Agarose (0,8%).....	31
4.2.5 Gel de Agarose (1,4%).....	31
4.2.6 Oligonucleotídeos iniciadores (<i>Primers</i>).....	31
4.2.7 Tampão da amostra	31
4.2.8 Tampão CTAB.....	32
4.2.9 Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X) - pH 8,0	32
4.2.10 Solução de Brometo de Etídio.....	32
4.3 ESTERILIZAÇÃO	32
4.4 LINHAGENS UTILIZADAS.....	33
4.5 CASUÍSTICA	33
4.6 EXAME CLÍNICO	33
4.7 COLETAS SALIVARES.....	34
4.8 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> NA SALIVA.....	34
4.9 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>CANDIDA</i>	34
4.9.1 Formação do Tubo Germinativo.....	35
4.9.2 Ágar Hicrome <i>Candida</i> ® (Himedia).....	36
4.9.3 Sistema API 20 C AUX® (BioMérieux)	36
4.9.4 Microcultivo de Leveduras.....	37
4.9.5 Assimilação de Carboidratos (Auxonograma) e Nitrogênio	38
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS ENCONTRADOS.....	40
4.11 EXTRAÇÃO DO DNA.....	40
4.12 SEQUENCIAMENTO	40
4.12.1 PCR.....	41
4.12.2 Reação de Sequenciamento.....	42

4.12.3 Precipitação do DNA a ser seqüenciado	42
4.12.4 Seqüenciamento e análise das seqüências.....	42
4.13 VARIABILIDADE GENÉTICA.....	43
4.13.1 Amplificação do DNA por RAPD	43
4.13.2 Eletroforese	44
4.13.3 Análise da Variabilidade Genética	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS	45
5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA.....	61
6. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICES.....	78
APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	79
APÊNDICE 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	81
APÊNDICE 3 - FICHA DE ANAMNESE E EXAME CLÍNICO.....	83
APÊNDICE 4 - SEQÜÊNCIA CONSENSO - ISOLADO PC32	85
APÊNDICE 5 - SEQÜÊNCIA CONSENSO - ISOLADO SD44	87
APÊNDICE 6 - SEQÜÊNCIA CONSENSO - ISOLADO SD3 ₁	89
ANEXO 1 - ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO "BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY"	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS PELAS LEVEDURAS ISOLADAS (AUXONOGRAMA).....	39
TABELA 2 – PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD	43
TABELA 3 – ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS PELAS LEVEDURAS ISOLADAS (API 20 C AUX [®])	48
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> ..	51
TABELA 5 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> NOS GRUPOS ESTUDADOS	52
TABELA 6 – SUBGRUPOS FORMADOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA	55
TABELA 7 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> NOS SUBGRUPOS AVALIADOS	57
TABELA 8 – FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> NOS SUBGRUPOS AVALIADOS	57
TABELA 9 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURA DO GÊNERO <i>Candida</i> X SEXO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	60
TABELA 10 – LINHAGENS UTILIZADAS NO ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> , POR MARCADORES RAPD	61

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	35
FIGURA 2 – CARACTERÍSTICAS DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS EM MEIO CROMOGÊNICO.....	36
FIGURA 3 – CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLOGICAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	38
FIGURA 4 – ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS E NITROGÊNIO PELAS LEVEDURAS ISOLADAS	39
FIGURA 5 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GENERO <i>Candida</i> NOS GRUPOS AVALIADOS	45
FIGURA 6 – CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROFORMOLÓGICAS DE LEVEDURAS DO GENÊRO <i>Candida</i>	47
FIGURA 7 – CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	49
FIGURA 8 – FREQUÊNCIA DE LEVEDURAS ISOLADAS NOS SUBGRUPOS.....	56
FIGURA 9 – PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO O <i>PRIMER</i> OPX 14	62
FIGURA 10 – DENDOGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENETICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD DAS LINHAGENS DESCRITAS NA TABELA 12 UTILIZANDO COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA	63
FIGURA 11 – ANÁLISE DA SIMILARIDADE ENTRE AS LEVEDURAS ISOLADAS – GRÁFICO BIDIMENSIONAL.....	65
FIGURA 12 – ANÁLISE DA SIMILARIDADE ENTRE AS LEVEDURAS ISOLADAS – GRÁFICO TRIDIMENSIONAL	66

LISTA DE ABREVIATURAS

% id – Porcentagem de identificação

µl - Microlitro

µm – Micrômetro

AP-PCR - *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*

ATCC - *American Type Culture Collection*

Atm - Atmosfera

BDA – Ágar Batata Dextrose

CIA - Clorofórmio-álcool isoamílico

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio (*Cationic hexadecyl trimethyl ammonium*)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA - Ácido etileno diamino tetracético (*Ethylenediaminetetracetate*)

EPM – Escola Paulista de Medicina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Vírus*)

IgA – Imunoglobulina classe A

IgG – Imunoglobulina classe G

kb: Quilo base

LEMI – Laboratório Especial de Micologia

M.O. – microscopia óptica

min - minutos

ml - mililitro

mm - milímetro

mM – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

NK – células *natural killers*

NTSYS - *Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*

pb - Pares de bases

PFGE – Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH - Potencial hidrogeniônico

RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA*)
REA - Análise de enzima de restrição
rpm - Rotações por minuto
SD - Síndrome de Down
SDA – Saboraud Dextrose Agar
TCD⁴ – linfócitos T
TCR/CD3 – Receptor CD3 de célula T
TE - TRIS-EDTA
TEB -TRIS-EDTA-ácido bórico
Th1/ Th2 – linfócitos T auxiliares
TRIS - Tris-(hidroximetil)-aminometano
UFC - Unidade formadora de colônia
UFPR – Universidade Federal do Paraná
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo
UPGMA - *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*
UTI – Unidade de Tratamento Intensivo
UV - Radiação ultravioleta

RESUMO

Crianças com Síndrome de Down apresentam um comprometimento do sistema imunológico, o que as torna mais predispostas à colonização por leveduras do gênero *Candida*, em especial *C. albicans*. Este estudo buscou determinar a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na saliva de crianças com Síndrome de Down (grupo 1), comparando com crianças sem a síndrome (grupo 2). Os isolados foram submetidos à análise da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD. Foram coletadas amostras salivares da cavidade bucal de 51 crianças com Síndrome de Down e de 50 crianças sem a síndrome, todas com idades entre 0 e 6 anos. As amostras coletadas foram diluídas, semeadas em Agar Sabouraud Dextrose e incubadas a 30°C por 48 horas. Para a identificação das leveduras isoladas foram usados métodos distintos: Formação do Tubo Germinativo, Ágar Hicrome *Candida*[®] (Himedia), Sistema API 20 C AUX[®] (BioMérieux), Microcultivo de leveduras, provas de Assimilação de Carboidratos e Assimilação de Nitrogênio. Foram isoladas leveduras do Gênero *Candida* em 51% dos pacientes com Síndrome de Down, sendo que 81,5% dos isolados eram de *C. albicans*. Apenas 5 crianças (10%) sem síndrome tinham a cavidade bucal colonizadas por leveduras do gênero *Candida*, com a espécie *C. albicans* a mais prevalente (40%). Também foram investigadas as prevalências em relação à idade dos pacientes, sendo que a mesma foi mais alta na faixa etária dos 24 a 47 meses (subgrupo B), com 80% no grupo 1 e 12% no grupo 2. O subgrupo C, formado por crianças entre 48 e 72 meses, apresentou a segunda maior prevalência nos grupos 1 e 2, com 63,6 e 11,1%, respectivamente. A menor prevalência foi encontrada no subgrupo A (0 a 23 meses), com 28% para o grupo 1 e 8% para o grupo 2. Quando comparados os subgrupos do grupo de crianças com Síndrome de Down, foi encontrada diferença significativa entre os subgrupos A e B ($p=0,011$), diferença limítrofe entre A x C ($p=0,051$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupo B x C. Para a verificação da variabilidade genética dos isolados, foi feita a extração do DNA total das leveduras isoladas com o uso de CTAB e ultra-som associados. Para o RAPD foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores OPA 10, OPX 11, OPX 12, OPX 14, OPX 17 e OPX 19 e as bandas foram analisadas com o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA foi utilizado para a construção dos dendrogramas. A consistência dos agrupamentos foi verificada por *Bootstrap*. Os resultados permitem concluir que crianças com Síndrome de Down apresentam uma alta frequência de colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*, sendo representada principalmente pela espécie *C. albicans* e com ocorrência maior na faixa etária de 24 a 72 meses. A análise feita por meio dos marcadores RAPD mostrou a alta variabilidade genética existente entre as espécies de *Candida* e dentro de uma mesma espécie.

Palavras-Chave: Síndrome de Down; *Candida*; *Candida albicans*; RAPD.

ABSTRACT

Children with Down's syndrome (DS) are more predisposed to have *Candida* yeasts, especially *C. albicans*, in their oral cavity, probably due to an immunologic deficit. The aim of this study was to verify the presence of *Candida* yeasts in the saliva of children with Down's syndrome and also verify their genetic variability, using the RAPD technique. Fifty –one children with Down's syndrome and 50 children without the syndrome were included in the study. They were all aged between 0 and six years and samples were taken using a sterile cotton swab. The saliva samples were diluted, applied to Sabouraud's dextrose agar and incubated for 48 hours at 30°C. *Candida* yeasts were identified using the gem-tube test, the yeast identification system API 20 C AUX[®] (BioMèrieux), microscopical characteristics and substrate assimilation tests. The proportion of subjects colonized with *Candida* yeasts in the oral cavity was significantly higher in the DS group (51%), than in the control group (10%). *C. albicans* was the most frequently species isolated in both groups (80% and 40%). The subjects were subdivided into three age groups (in months): 0 – 23 (A), 24-47 (B) and 48-72 (C). For the group A, the frequency of candidal carriage was low (28% for the DS children and 8% for the control group), while for the group B, the frequency was higher (80 and 12%). In the group C, the frequency was decreased (63,6, and 11,1%). Statistical analysis showed a significantly higher frequency of candidal isolation from DS infants of group B and C compared to group A. The Total DNA extraction was carried out using the CTAB buffer and associated sonication. RAPD reactions used the OPA 10, OPX 11, OPX 12, OPX 14, OPX 17 and OPX 19 oligonucleotide primers. The software NTSYS was used for polymorphism analysis using the Jaccard coefficient and the UPGMA method was used for the construction of dendrograms. The consistency of different groupings was evaluated by bootstrap. The results of the present study showed a higher prevalence of oral candidal carriage in children with DS and *C. albicans* was the most isolated yeast, with higher frequency in children between 24 and 72 months. The RAPD markers showed a higher degree of variability between the species and within the same species.

Key Words: Down's Syndrome, *Candida*, *Candida albicans*, RAPD.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down foi descrita pela primeira vez, em 1866, por Langdon Down e sabe-se hoje que é a alteração cromossômica mais comum em humanos, resultado de uma trissomia do cromossomo 21. Os pacientes portadores da Síndrome de Down apresentam alterações fenotípicas clássicas e também algumas desordens sistêmicas importantes, dentre as quais, alterações no sistema imunológico (MUSTACCHI e RAZONE, 1990; SCHAWRTZMAN, 1999; PILCHER, 2001).

O sistema imune em pacientes com Síndrome de Down apresenta diferentes anormalidades, como menor capacidade de quimiotaxia e fagocitose dos neutrófilos, deficiência na ativação das células T, deficiência de anticorpos, baixa contagem de linfócitos T CD4⁺, funções de células NK reduzidas, diminuição na expansão dos linfócitos T e B e alterações no timo (de tamanho menor e com variações histológicas), que podem alterar o processo de maturação dos linfócitos T (LAROCA et al., 1990; TRINCADO et al., 1988; SCOTESSE et al., 1998; RIBEIRO et al., 2003; ZALDIVAR-CHIAPA et al., 2005; de HINGH et al., 2005).

O sistema estomatognático nos portadores da síndrome também apresenta anormalidades em diferentes aspectos. São exemplos destas anormalidades: alterações no complexo crânio – facial, com desenvolvimento menor em alguns ossos, mau posicionamento da língua e maior prevalência de alterações como língua fissurada e geográfica e hipotonicidade dos músculos orbiculares, deixando os lábios entreabertos e sujeitos a fissuras, especialmente nas comissuras labiais (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001; SCULLY et al. 2002). Além disso, o fluxo e a composição da saliva podem estar alterados nos pacientes com Síndrome de Down (JARA et al. 1991; COGULU et al. 2006; YARAT et al. 1999; SIQUEIRA et al. 2005). As anomalias dentárias também são freqüentes, com atraso na erupção dos dentes, alterações na seqüência de erupção e na morfologia dos elementos dentários

(REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001). Algumas alterações na microbiota bucal destes pacientes também podem ser verificadas. As crianças portadoras da Síndrome apresentam uma maior colonização pelas bactérias causadoras da doença periodontal, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (STABHOLZ, 1991). Já o *S. mutans*, bactéria etiológica da cárie, apresenta menor frequência de colonização em pacientes com SD (SREEDEVI e MUNSHI, 1998). Além destes dois microrganismos, diferentes estudos mostraram que leveduras do gênero *Candida*, em especial *C. albicans*, são encontradas com maior frequência na cavidade bucal destes pacientes (CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; VIEIRA et al., 2005).

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas microrganismos comensais, participando da microbiota normal de diferentes sítios do organismo humano: cavidade bucal, tubo digestivo, intestino, orofaringe, ânus, vagina e pele (ODDS, 1988). A prevalência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças e adultos jovens saudáveis pode variar de 5 a 70%, sendo que cerca de 80% dos isolados são de *C. albicans*, seguidos das espécies de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. famata* e *C. tropicalis* (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; AKDENIZ et al., 2002; KADIR et al.).

Quando há desequilíbrio entre o binômio parasito/hospedeiro as leveduras têm seu potencial de proliferação aumentado, passando da forma comensal para a forma parasitária, podendo causar danos ao hospedeiro (ODDS, 1984; FOTOS e HELLSTEIN, 1992; SIDRIN e MOREIRA, 1999). Uma gama de fatores locais e/ou sistêmicos podem facilitar este desequilíbrio e favorecer a instalação dos processos infecciosos causados pelas leveduras do gênero *Candida*, entre eles destacam-se os quadros de imunodeficiências, deficiências nutricionais, presença de tumores malignos, xerostomia, mucosites, uso de próteses, dieta, alterações endócrinas e uso de determinados medicamentos (ODDS, 1984; FOTOS e HELLSTEIN, 1992).

Diferenças entre as características morfológicas e bioquímicas entre as leveduras do gênero *Candida* sempre foram usados na identificação das espécies isoladas. Contudo a metodologia tradicional apresenta algumas limitações, como

o tempo de trabalho longo e o poder de discriminação dos métodos utilizados. O aumento do número de pacientes imunocomprometidos devido ao vírus HIV, à terapia contra o câncer e o aumento no sucesso nos transplantes fez com que houvesse um aumento na incidência de candidoses muco - cutâneas e sistêmicas causadas por diferentes espécies de *Candida*. Sendo assim tornou-se necessário técnicas de identificação mais precisas e rápidas (OTERO et al., 1995; RESENDE et al., 2004).

Com o advento da PCR (reação em cadeia da polimerase) em biologia molecular, diversos estudos começaram e ser feitos no intuito de verificar as características genotípicas e a variabilidade genética existente entre as espécies e dentro de uma mesma espécie de *Candida*. Atualmente técnicas como RAPD, que utilizam o princípio da PCR, têm sido usadas na identificação de leveduras e em estudos epidemiológicos sobre diversidade genética (LEHMANN, LIN e LASKER, 1992; ROBERT et al., 1995; CLEMONS et al., 1997; WALTIMO et al., 2001; ANSARI et al., 2003; BAUTISTA et al., 2003; PINTO et al., 2004).

Dentro deste contexto, o presente estudo se propôs a comparar a ocorrência e a variabilidade genética, por meio de marcadores RAPD, de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de crianças com Síndrome de Down, comparando com crianças sem a síndrome.

2 OBJETIVOS

1. Isolar e identificar amostras de leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal de crianças com e sem Síndrome de Down e comparar a ocorrência entre os grupos;
2. Verificar a frequência das espécies de leveduras do gênero *Candida* em crianças com Síndrome de Down, comparando com crianças sem a síndrome;
3. Estudar o perfil da variabilidade genética, por meio de marcadores RAPD, nas leveduras isoladas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SÍNDROME DE DOWN

A Síndrome de Down (SD) pode ser definida como uma cromossopatia, ou seja, uma doença cujo quadro clínico é explicado pela presença de um cromossomo 21 extra, caracterizando assim uma trissomia. Tal fato ocorre freqüentemente por erro durante a divisão celular, denominado não-disjunção, associado à meiose materna ou paterna. Em cerca de 95% dos casos de SD, a trissomia do 21 é simples, com o cariótipo mostrando três cromossomos livres. Em 1,5 a 3% dos afetados, um dos três cromossomos 21 está ligado a outro cromossomo, como resultado de uma fusão denominada de translocação cromossômica. Há ainda cerca de 2% a 3% de casos em que ocorrem duas linhagens celulares em um mesmo cariótipo: uma normal e outra trissômica, condição esta chamada de mosaicismo (MUSTACCHI e RAZONE, 1990; SCHAWRTZMAN, 1999).

A incidência da Síndrome em recém-nascidos vivos está em torno de 1:600 a 1:800 nascimentos, sendo a idade materna avançada o principal fator de risco. (MUSTACCHI e RAZONE, 1990; SCHAWRTZMAN, 1999).

Os pacientes portadores da trissomia do 21 apresentam alterações fenotípicas clássicas ao nascimento, que quando consideradas em conjunto, são sinais patognomônicos desta desordem. São alguns destes sinais: face achatada, fendas palpebrais oblíquas, excesso de pele no pescoço, ponte nasal achatada, orelhas de implantação baixa, prega transversal palmar única, sulco entre o hálux e o segundo artelho, micrognatia, hiperelasticidade articular e hipotonia muscular generalizada, entre outros. (MUSTACCHI e RAZONE, 1990; SCHAWRTZMAN, 1999; PILCHER, 2001).

Além das alterações fenotípicas os portadores da síndrome podem apresentar diferentes alterações sistêmicas, sendo a deficiência mental uma delas. Os pacientes apresentam ainda deficiências de crescimento e excesso de peso em relação à altura. As alterações endocrinológicas, em especial a disfunção da tireóide e o hipogonadismo, são comuns nos portadores desta

trissomia. Associadas freqüentemente à SD estão as cardiopatias congênitas, sendo a incidência de cerca de 40%. Há ainda maior incidência de Prolapso da Válvula Mitral, acometendo cerca de 50% dos pacientes. São achados comuns entre os pacientes com SD os problemas oftalmológicos de refração (miopia, hipermetropia e astigmatismo), o estrabismo e também o aparecimento de pequenas manchas de coloração pálida na íris (manchas de Brushfield), sendo estas alterações benignas. A perda auditiva pode ser observada freqüentemente nestes indivíduos e podem ser uma das causas das dificuldades de linguagem nas crianças com a síndrome. As malformações gastrintestinais congênitas são bastante freqüentes na SD, sendo a atresia duodenal e a doença de Hirschsprung as mais importantes (PILCHER, 2001; SCHAWRTZMAN, 1999; MUSTACCHI e RAZONE, 1990).

Portadores da Síndrome apresentam maior susceptibilidade a infecções, principalmente no trato gastrintestinal e respiratório. A incidência de leucemias neste grupo de paciente é cerca de 20 vezes maior que em crianças sem a patologia (PILCHER, 2001; SCHAWRTZMAN, 1999; MUSTACCHI e RAZONE, 1990). CARLSEDT et al. (1996) analisaram os históricos médicos de 110 crianças e jovens, com idades entre 0 e 21 anos, sendo que 55 eram portadoras da SD. O estudo foi feito através de entrevista com os responsáveis e os autores verificaram que nove dentre as crianças com SD apresentavam mais de dez infecções a cada ano, contra nenhuma do grupo controle, diferença esta significativa. As infecções acometiam principalmente o trato respiratório superior. Estudos realizados mostraram diferentes anormalidades no sistema imunológico destes pacientes.

TRINCADO et al. (1988) avaliaram grupos de pacientes com diagnóstico clínico e citogenético de SD. Todos eles apresentavam histórias de infecções recorrentes, principalmente no trato respiratório, além de infecções gastrintestinais, urinárias e lesões de candidose mucocutâneas. As funções dos neutrófilos polimorfonucleares nestes pacientes também foram avaliadas através de diferentes experimentos *in vitro* e os resultados mostraram que a capacidade de adesão e motilidade destas células eram diminuídas. Já a capacidade de fagocitose frente a leveduras de *C.albicans* não mostrou diferenças significativas

em relação ao grupo controle. SCOTESSE et al (1998) estudaram um grupo de 40 pacientes, com idades entre 4 e 16 anos, sendo 20 pacientes portadores da SD e 20 pacientes sem a síndrome. Foram realizados diferentes experimentos *in vitro* e os resultados mostraram que a ativação das células T nos portadores da SD apresenta deficiências devido a transdução parcial de sinais ao complexo TCR/CD3, receptor desta célula. RIBEIRO et al. (2003) avaliaram aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais em um grupo com 49 pacientes com Síndrome de Down, com idades entre um e 12 anos, que apresentavam infecções graves e/ou recorrentes. O estudo foi feito a partir de uma revisão dos prontuários médicos de pacientes que freqüentaram o Ambulatório de Alergia e Imunologia do Departamento de Pediatria da FMUSP–SP entre janeiro de 1990 e julho de 1999. Trinta e um dos 49 participantes do estudo estavam dentro do critério adotado para infecções repetidas, que incluía: 3 ou mais episódios de pneumonia, 4 ou mais episódios de otite, 5 infecções de tonsilas, 12 ou mais episódios de rinfaringite dentro do período de 1 ano, além de 4 ou mais episódios de sinusite em 6 meses. A avaliação imunológica mostrou dois casos de deficiência do anticorpo IgG2, dois casos de baixa contagem de linfócitos CD4+ e cinco casos em que as funções das células NK estavam reduzidas.

ZALDIVAR-CHIAPA et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar as respostas frente ao tratamento cirúrgico e não cirúrgico de periodontites moderadas a severas em pacientes com SD. Além disso, os autores também avaliaram a função de células polimorfonucleares nestes pacientes. Catorze pacientes com SD, com idades entre 17 e 30 anos, tiveram dois quadrantes da cavidade bucal tratados através de raspagem e alisamento (procedimento não-cirúrgico) e os outros dois quadrantes tratados cirurgicamente. Também foram realizados testes imunológicos com o objetivo de avaliar a capacidade de quimiotaxia e fagocitose dos neutrófilos destes pacientes frente a um grupo controle formado por nove indivíduos sem SD, com idade entre 24 e 28 anos. Os resultados mostraram melhoras significativas em ambos os tipos de tratamento, com diminuição do índice de placa bacteriana e profundidade das bolsas periodontais. Os pacientes com SD apresentaram atividades de quimiotaxia e

fagocitose dos neutrófilos diminuídas em comparação ao grupo controle, diferenças estas estatisticamente significativas.

DE HINGH et al. (2005) avaliaram 96 crianças com SD, com idade entre 1 e 20 anos com o objetivo de comparar a população de linfócitos entre estes pacientes e pacientes da mesma faixa etária sem SD. Os resultados mostraram que 88% das crianças com SD apresentavam população de linfócitos abaixo do décimo percentil de normalidade e 61% apresentavam valor abaixo do quinto percentil. Além disso, os autores verificaram diminuição na expansão dos linfócitos T e B nas crianças com SD nos primeiros anos de vida. O grupo de pacientes com SD, com idade entre 9 e 15 meses apresentou média na contagem de linfócitos que está abaixo da média em crianças sem a SD nos primeiros dias de vida. Os resultados encontrados sugerem alterações intrínsecas na resposta humoral nos pacientes portadores da síndrome, que podem ser explicadas pelas alterações de timo descritas nestes pacientes: timo freqüentemente menor e com variações histológicas nas porções medulares e corticais, podendo prejudicar a maturação dos linfócitos T (LAROCA et al., 1990).

A cavidade bucal dos pacientes com SD também apresenta certos desvios quanto ao desenvolvimento dos ossos do crânio, da dentição, oclusão dental, doença periodontal e cárie (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001).

Os portadores da SD apresentam menor crescimento dos ossos do crânio, sendo estes mais delgados e com fechamento tardio das fontanelas. O terço médio da face está diminuído devido ao menor crescimento da maxila, deixando a face achatada. O palato apresenta altura normal, mas é mais estreito e curto. A mandíbula apresenta crescimento normal, conferindo ao paciente uma relação de prognatismo maxilo-mandibular, mal-oclusão freqüente nos pacientes com a síndrome. A maioria dos pacientes apresenta má postura da língua, sendo esta projetada para fora devido a um conjunto de fatores, como a hipotonicidade dos músculos orbiculares, dimensões diminutas da cavidade bucal, hiperelasticidade ou ausência do freio lingual e obstruções nasais, alteração comum na SD. Este mau posicionamento da língua pode representar dificuldade adicional às funções respiratórias, da fala e mastigação. Além disso, pode ser

observada a presença de língua fissurada, língua geográfica e hipertrofia papilar. (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001).

Os lábios geralmente estão entreabertos e sujeitos a ação da saliva devido a protrusão da língua e respiração bucal, causando irritações e fissuras nos cantos destes, proporcionando maior facilidade para a instalação de processos infecciosos. Assim a queilite angular pode ser detectada com certa frequência nessa população, podendo estar associada a *C.albicans* (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001).

SCULLY et al. (2002) examinaram 77 pacientes portadores da SD e verificaram a presença de queilite angular e fissuras labiais em 52% dos indivíduos, sendo que 77% das lesões foram positivas para o isolamento de *C.albicans*. Os pacientes com SD podem também apresentar diminuição do fluxo salivar devido ao hábito da respiração bucal, contudo estudos realizados mostram resultados conflitantes. JARA et al. (1991) e COGULU et al. (2006) não acharam diferenças significativas no fluxo salivar quando compararam pacientes com e sem SD. YARAT et al. (1999) e SIQUEIRA et al. (2005) verificaram uma diminuição do fluxo salivar em pacientes com SD, quando comparado com pacientes sem a patologia.

As anomalias dentárias são freqüentes, e os portadores da SD apresentam em geral hipodontia ou oligodontia, afetando principalmente os incisivos laterais permanentes. Alterações morfológicas, como fusões e geminações também são mais comuns nos indivíduos com SD. Os portadores da SD apresentam ainda atraso significativo na erupção dos dentes decíduos e permanentes, além da seqüência de erupção ser alterada. (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001). GARCIA e AVILA (2003) estudaram a erupção dental em crianças de 1 a 12 anos com SD comparando com grupo controle. Os autores verificaram que antes do primeiro ano de vida, as crianças com SD não apresentavam nenhum dente na cavidade bucal e que a dentição decídua só se tornava completa entre os três e quatro anos nestas crianças.

Uma menor incidência de lesões de cáries tem sido verificada nos portadores da SD. Tal fato pode ser explicado pelo atraso na erupção dos dentes,

pela maior distância entre os dentes devido a microdontia ou agenesia de alguns elementos dentários (PILCHER, 2001) e características salivares (REY e BIRMAN, 1990).

STABHOLZ (1991) verificaram uma menor prevalência de cárie em pacientes com SD quando comparados com pacientes sem a síndrome e pacientes com retardo mental. A contagem de colônias de *S.mutans* isoladas da saliva também foi menor no grupo com SD. MORINUSHI, LOPATIN e TANAKA (1995) verificaram baixos índices de cáries e altos níveis do anticorpo IgM em crianças e adolescentes com SD. LEE et al. (2004) e COGULO et al. (2006) verificaram menor prevalência de lesões de cárie e maiores níveis salivares de IgA, o anticorpo específico para *S.mutans*, nos pacientes portadores de SD. YARAT et al. (1999) não encontraram diferenças significativas na atividade de cárie em um grupo de pacientes com SD quando comparados com um grupo controle de crianças sem a síndrome.

A composição salivar dos indivíduos com SD tem sido bastante estudada, porém os resultados têm se mostrado conflitantes. SIQUEIRA et al. (2005) verificaram que a capacidade tampão da saliva é maior nos pacientes com SD, prevenindo assim as quedas de pH e seus efeitos na cavidade bucal. COGULU (2006), YARAT (1999) e JARA et al. (1991) não encontraram diferenças quanto ao pH e capacidade tampão salivar em pacientes com e sem SD. Ainda de acordo com YARAT (1999), as concentrações salivares de proteínas e ácido siálico estão aumentadas nos portadores da SD, enquanto JARA et al. (1991) afirmam que concentrações de cloreto, bicarbonato e sódio não apresentam alterações, enquanto que a concentração de potássio está diminuída nestes indivíduos.

Outro aspecto de interesse odontológico na SD é a alta prevalência de doença periodontal. Nestes indivíduos a doença ocorre precocemente, tem progressão rápida e características de periodontite severa, com perdas ósseas generalizadas. Alterações freqüentes na anatomia dentária, maloclusões, alterações histológicas no tecido periodontal, alterações no sistema imune são algumas das várias causas que podem explicar esta maior prevalência (REULAND-BOSMA e VAN DIJK, 1986).

BARR-AGHOLME et al. e AMANO et al. (2000) verificaram que crianças com SD têm a cavidade bucal mais precocemente colonizada por bactérias envolvidas na patogênese da doença periodontal e estes patógenos são isolados com maior frequência do sulco gengival de pacientes com SD quando comparados com indivíduos sem a síndrome. IZUMI et al. (1989) verificaram menor capacidade de quimiotaxia dos neutrófilos de pacientes com SD quando comparados a pacientes sem SD. Além disso, os autores verificaram uma relação positiva entre o menor índice de quimiotaxia dos neutrófilos e maior perda óssea na cavidade bucal dos pacientes com SD.

SREEDEVI e MUNSHI (1998) investigaram a relação existente entre o status da saúde periodontal, a frequência de isolamento de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (bactéria considerada como principal patógeno da doença periodontal) e atividade de quimiotaxia dos neutrófilos de 35 pacientes com SD, com idades entre 6 e 14 anos. Os resultados mostraram altos índices de inflamação gengival nos pacientes com SD. Além disso, em 54,3% dos pacientes com SD ocorreu o isolamento de *A. actinomycetemcomitans*, contra 5% do grupo controle. A atividade de quimiotaxia dos neutrófilos foi significativamente menor no grupo de indivíduos com SD.

3.2 *Candida* spp.

As leveduras são fungos unicelulares, geralmente arredondados que se reproduzem por brotamentos e originam blastósporos. Nos meios de cultura são caracterizadas como colônias de aspecto glabroso, mucóide e com variação de tonalidades. Em especial as colônias do gênero *Candida* variam da tonalidade bege ao branco e são denominadas de hialinas. Ao microscópico as leveduras são caracterizadas por numerosas estruturas redondas ou ovaladas, unicelulares, com algumas apresentando brotamentos (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

As leveduras mais comuns na cavidade bucal são as leveduras do gênero *Candida*, formado por mais de 150 espécies. As leveduras do gênero *Candida* são consideradas fungos imperfeitos, pois apesar de serem encontradas predominantemente na forma assexuada, apresentam poucas formas sexuadas

de reprodução. Sendo assim estão incluídas na divisão *Deuteromycota*, Classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* do reino *Fungi* (LACAZ et al., 2002). Ao microscópio óptico as leveduras do gênero *Candida* se apresentam como células globosas, ovaladas, alongadas ou com filamentos denominados de pseudo-hifas, todas Gram-positivas. Existem ainda algumas espécies que apresentam a capacidade de formar hifas verdadeiras (FOTOS e HELLSTEIN, 1999).

3.2.1 Identificação das Espécies do Gênero *Candida*

A identificação clássica das leveduras do gênero *Candida* compreende diferentes etapas: isolamento, prova do tubo germinativo, microcultivo e provas bioquímicas de assimilação e fermentação de carboidratos e assimilação de nitrogênio (ODDS, 1988; SANDVÉN, 1990; SIDRIN e MOREIRA, 1999). Ainda é possível fazer a identificação das leveduras através do uso de meios cromogênicos, métodos comerciais e análise de DNA (ODDS e BERNAERTS, 1994; PFALLER, HOUSTON e COFFMANN, 1996; SIDRIN E MOREIRA, 1999; GÜNDES, GULENC e BINGOL, 2001; SILVA e CANDIDO, 2005; LEHMANN, LIN e LASKER, 1992; STEFFAN et al., 1997; MELO et al., 1998; BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003). O isolamento das leveduras do gênero *Candida* é feito em Ágar Sabouraud Dextrose e o seu crescimento é favorecido em temperaturas variando entre 20° C e 38°C e com pH entre 2,5 e 7,5. As colônias de *Candida* são caracterizadas pelo formato esférico, coloração branco-fosca, aspecto de porcelana (brilhante) e cremosas, apresentando diâmetro entre um e oito mm e odor característico (BARBIERI, 2005).

A primeira prova realizada para a identificação das leveduras do gênero *Candida* é a verificação da formação ou não do tubo germinativo. O tubo germinativo é definido como uma extensão filamentosa da célula leveduriforme com metade da largura e comprimento de três a quatro vezes o diâmetro da célula mãe (KONEMAN et al., 2001). Pode ser considerado excelente teste para a identificação presuntiva de *C.albicans*, isto porque o índice de positividade desta espécie para tal teste é de cerca de 94 a 97%. As outras espécies de *Candida* não produzem tubo germinativo, podendo apresentar prolongamentos que são

pseudo-hifas, como por exemplo, a *C. tropicalis*. (ODDS, 1988; SIDRIN E MOREIRA, 1999).

O microcultivo da levedura em Ágar fubá com Tween 80 visa diferenciar as distintas estruturas de reprodução assexuada formadas durante o crescimento do fungo. Quando incubadas em baixa tensão de oxigênio, as leveduras do gênero *Candida* podem produzir filamentos, que são as pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. A presença ou não destes filamentos podem auxiliar na identificação das espécies.

Além da morfologia são também utilizadas provas de assimilação de carboidratos, as quais se baseiam na capacidade que as leveduras apresentam de utilizar certos carboidratos como fonte de carbono. Além disso, a capacidade das leveduras de fermentarem determinados açúcares, produzindo gás carbônico, são parâmetros importantes para a diferenciação das espécies (ODDS, 1988; SIDRIN E MOREIRA, 1999).

Os métodos laboratoriais tradicionais para a identificação das diferentes espécies de leveduras são bastante laboriosos e leva-se muito tempo para chegar a um resultado final. A fim de facilitar este processo existem hoje no mercado diferentes métodos para se realizar o processo de identificação. Os mais utilizados na rotina de laboratório são os métodos comerciais, que podem ser manuais ou automatizados e os meios cromogênicos. Estes métodos são de fácil realização e interpretação, além de oferecer os resultados em menor tempo (SIDRIN E MOREIRA, 1999; GÜNDES, GULENC e BINGOL, 2001; SILVA e CANDIDO, 2005). Os meios cromogênicos são utilizados para o isolamento primário de leveduras, que desde seu crescimento inicial demonstram diferentes colorações de colônias, dependendo da espécie (SIDRIN E MOREIRA, 1999). São exemplos de meios cromogênicos: o Albicans ID[®] (BioMérieux), o CHROMagar Candida[®] (CHROMagar Company) e o Hicrome Candida[®] (HIMEDIA). Os meios cromogênicos têm como vantagens a identificação presuntiva das leveduras de forma rápida e a facilidade em detectar culturas mistas, com diferentes espécies de *Candida* (ODDS e BERNAERT, 1994; PFALLER, HOUSTON E COFFMANN, 1996). Já os métodos comercializados têm como princípio básico a assimilação de diferentes carboidratos por meio das

diferentes espécies de leveduras. A leitura é feita por turvação do meio, reação colorimétrica ou mudança do indicador de pH.

São exemplos de métodos comerciais manuais conhecidos no mercado: API 20 C AUX[®] (BioMérieux), ID 32C[®] (BioMérieux), Fungichrom I[®] (International Microbio), Candifast[®] (International Microbio), entre outros (SIDRIN E MOREIRA, 1999; GÜNDES, GULENC e BINGOL, 2001). Alguns trabalhos existentes na literatura avaliaram e/ou compararam a desempenho de diferentes métodos. SHEPPARD et al. (1998) compararam dois sistemas de identificação de leveduras: API 20 C AUX[®] e o Auxacolor[®] (Sanofi Diagnostics Pasteur) e os resultados mostraram que um número maior de isolados foi corretamente identificada pelo Auxacolor[®] em comparação ao API 20 C AUX[®]. Os autores também afirmam que a leitura do primeiro seria mais fácil para o observador. SMITH et al. (1999) compararam a desempenho do API 20 C AUX[®] com o RapID Yeast Plus System[®] (InnovativeDiagnostic Systems) e os resultados mostraram que a porcentagem de identificações corretas pelo primeiro foi de 99, 1% e do segundo de 97, 2%, mostrando que ambos os métodos são seguros.

GÜNDES, GULENC e BINGOL (2001) compararam três sistemas comerciais pra a identificação de leveduras, API 20 C AUX[®] (BioMérieux), Fungichrom I[®] (International Microbio) e Candifast[®] (International Microbio). Os resultados mostraram que o melhor índice de acerto foi do sistema Fungichrom I[®], com 95,6%. Em segundo, o API 20 C AUX[®], com um índice de 82, 7% e em terceiro ficou o Candifast[®] com 82,7%. Estaticamente não houve diferenças significativas entre os dois primeiros métodos. SILVA e CANDIDO (2005) avaliaram o sistema API 20 C AUX[®] para a identificação de 50 leveduras previamente identificadas pela metodologia clássica. O sistema identificou corretamente 46 (92%) das 50 leveduras analisadas, sendo que 76% (38) não precisaram de testes adicionais e em 16% (8) houve a necessidade dos mesmos. Apesar de suas limitações o sistema API 20 C AUX[®] é amplamente utilizado nas rotinas laboratoriais e vários trabalhos da literatura usam o mesmo sistema para a identificação de leveduras (CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; JIN et al., 2004; KADIR et al., 2005).

3.2.2 Colonização por *Candida* spp.

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos comensais que participam da microbiota normal de diferentes sítios do organismo humano. Diversas são as espécies de *Candida* que têm sido isoladas de sítios anatômicos distintos: cavidade bucal, tubo digestivo, intestino, orofaringe, ânus, vagina e pele (ODDS, 1988). Na cavidade bucal as leveduras são encontradas principalmente no dorso da língua, onde características anatômicas como a presença de papilas filiformes, forame cego e fissura mediana atuam como sítios que favorecem o desenvolvimento do microrganismo (ARENDORF e WALKER, 1980). Podem ser encontradas também no palato, mucosa jugal e mucosa vestibular da cavidade bucal (CARLSTEDT et al., 1996; RIBEIRO et al., 2002; VIEIRA et al., 2005).

C. albicans é a espécie mais comumente isolada na cavidade bucal, mas outras espécies também já foram isoladas, sendo as mais freqüentes: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, entre outras (FOTOS e HELLSTEIN, 1992; KADIR et al., 2005).

A ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças e adultos jovens saudáveis pode variar de 5 a 70% (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; AKDENIZ et al., 2002; KADIR et al., 2005). Diferentes estudos mostram diferentes resultados que podem ser explicados pela variação dos métodos de coleta, origem das amostras, meios de cultura, subgrupos estudados e métodos de análise (FOTOS e HELLSTEIN, 1992). Cerca de 80% dos isolados de leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal são de *C. albicans*, seguidos das espécies de *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. famata* e *C. tropicalis* (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; AKDENIZ et al., 2002; KADIR et al., 2005).

As espécies de *Candida* são consideradas microrganismos comensais, habitando normalmente a cavidade bucal. Quando há um desequilíbrio entre o binômio parasito/hospedeiro as leveduras podem então adquirir caráter patogênico e causar danos ao hospedeiro (ODDS, 1988; FOTOS e HELLSTEIN, 1992; SIDRIN e MOREIRA, 1999). Existem diferentes fatores locais e sistêmicos que predispõem a ruptura deste equilíbrio e favorecem a instalação dos processos infecciosos causados pelas leveduras do gênero *Candida*, entre eles

destacam-se os quadros de imunodeficiências, deficiências nutricionais, presença de tumores malignos, xerostomia, mucosites, uso de próteses, dieta, alterações endócrinas e uso de determinados medicamentos (antibióticos, esteróides, drogas citotóxicas e psicotrópicas) (ODDS, 1988; FOTOS e HELLSTEIN, 1992).

O uso de antibióticos, principalmente os de amplo espectro, causa eliminação de bactérias que fazem parte da microbiota normal do hospedeiro e competem com as leveduras pelos sítios de colonização e nutrientes, o que facilita a multiplicação e colonização destas (ODDS, 1988; FOTOS e HELLSTEIN, 1992).

A composição da dieta também pode favorecer a colonização por leveduras do gênero *Candida*. JIN et al. (2004) verificaram que a presença da sacarose facilita a adesão de *C.albicans* ao biofilme existente na cavidade bucal. KADIR et al. (2005) verificaram que crianças, entre zero e dois anos, que faziam uso exclusivo de aleitamento materno não eram colonizadas por leveduras do gênero *Candida*, enquanto que 18,5% das crianças que usavam mamadeiras eram colonizadas por leveduras do mesmo gênero. FRAIZ (1999) afirma que a mamadeira é um veículo facilitador para a inclusão de açúcar na dieta das crianças de menor idade. Os resultados encontrados nos estudos corroboram com a hipótese de que o açúcar presente na dieta facilita a colonização por *Candida* spp. Tal fato pode ser explicado por duas hipóteses: os carboidratos da dieta são metabolizados por bactérias presentes na cavidade bucal, formando ácidos que diminuem o pH e assim favorecem o crescimento das espécies de *Candida* (KADIR et al., 2005) e a presença de carboidratos na dieta faz com que as leveduras tenham uma maior capacidade de adesão e formação do biofilme, por meio de mecanismos ainda não elucidados (JIN et al., 2004).

Fatores mecânicos, como uso de próteses, chupetas e presença de lesões de cáries cavitadas facilitam a colonização por leveduras do gênero *Candida*, pois alteram o ambiente bucal criando novos sítios de retenção de biofilme. DARWAZEH e AL-BASHIR (1995) mostraram em seu estudo maior frequência de isolamento de leveduras do gênero *Candida* em crianças que faziam uso de chupetas.

AKDENIZ et al. (2002) não acharam diferenças significativas no isolamento de *C. albicans* em relação aos hábitos de dieta, uso de chupeta e mamadeiras e pH salivar. Já a presença de lesões de cárie foi um fator importante no isolamento das leveduras. Entre as crianças que apresentavam mais de quatro dentes cariados 69,2% tinham suas cavidades bucais colonizadas por *C. albicans*. Apenas 5% dos pacientes sem cárie eram colonizados pelo microrganismo. Os autores ainda verificaram que o microrganismo estava presente em 16 dos 20 canais radiculares analisados, mostrando um novo sítio de colonização da *C. albicans*.

Outro fator que deve ser considerado é a idade. No período neonatal há susceptibilidade aumentada à colonização por leveduras do gênero *Candida* e à candidose devido à imaturidade do sistema imune e à falta de microbiota bucal balanceada (ODDS, 1988; SCHERMA et al, 2004). DARWAZEH e AL-BASHIR (1995) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de 206 crianças, com idades entre 2 e 11 meses e sua relação com o tipo de aleitamento (materno, artificial ou misto). A frequência de isolamento nos grupo variou de 40 a 46,8%, não representando diferença estatisticamente significativa.

ZÖLLNER e JORGE (2003) coletaram amostras salivares de um grupo de lactentes, com idades até 5 meses, sendo que 55 faziam aleitamento natural (não faziam uso de chupetas e mamadeiras) e 30 utilizavam aleitamento artificial. Os resultados mostraram que no primeiro grupo foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 19 (34,55%) das amostras coletadas. No segundo grupo foram isoladas 20 (66,67%) amostras de leveduras do gênero *Candida*, diferença estatisticamente significativa. Nos dois grupos a espécie mais freqüente foi a *C. albicans* (57,89 e 46,1%, respectivamente), seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*.

SCHERMA et al. (2004) investigaram amostras da cavidade bucal de 100 recém-nascidos nas suas primeiras 24 horas de vida e verificaram o isolamento de leveduras do gênero *Candida* em apenas 3 (3%) amostras coletadas. Trinta crianças foram acompanhadas durante quatro meses e mensalmente se faziam coletas de amostras salivares. Com 30 dias de vida, 13 (20,3%) bebês tinham sua

cavidade bucal colonizadas por leveduras do gênero *Candida*, aos 60 dias, 29,7%, aos noventa dias 32,8% e aos 120 dias, 17,2%. De todas as amostras isoladas, 44,6% eram de *C. albicans*, seguida por *C. tropicalis* (33,8%).

A ocorrência de *Candida* spp. na cavidade bucal de 300 crianças, com idades entre 0 e 12 anos foi estudada por KADIR et al. (2005). Neste estudo também foi investigada a relação entre o aleitamento materno ou uso de mamadeira como fator local para colonização pelas leveduras. Os resultados mostraram que 26,3% das crianças eram colonizadas por alguma espécie de *Candida*, sendo que 22,3% (80% dos isolados) apresentavam *C. albicans*, enquanto 3,9 % eram colonizadas por outras espécies (*C. parapsilosis*, *C. Krusei*, *C. Kefyr*, *C. famata* e *C. tropicalis*). Dividindo - se em grupos foi possível verificar que nas crianças entre zero e 5 anos (grupo A) a frequência de isolamento de *Candida* spp. foi de 17%. O grupo B era formado por crianças com idades entre 6 e 8 anos e mostrou uma frequência de *Candida* spp. de 50,8%. O terceiro grupo (grupo C), formado por crianças entre 9 e 12 anos, mostrou uma prevalência de 27,9%. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo B com os grupos A e C. As crianças do grupo B apresentam uma fase de transição na dentição, com a esfoliação dos dentes decíduos e erupção dos permanentes, o que pode facilitar a colonização por leveduras do gênero *Candida*. As crianças com idades entre zero e dois anos foram divididas em dois grupos: aquelas que faziam aleitamento materno exclusivo (grupo 1) e as que faziam aleitamento materno e também usavam mamadeiras com outros leites e/ou líquidos (grupo 2). Dezoito por cento das crianças do grupo 2 eram colonizadas por leveduras do gênero *Candida*, enquanto que no grupo 1 nenhuma criança apresentou colonização pelo microrganismo. Pelos resultados encontrados, alguns autores afirmam que o aleitamento materno pode conferir ao lactente proteção contra a colonização por *Candida*, já que o mesmo contém fatores de resistência, como a lactoferrina, lisozima, leucócitos e imunoglobulinas, em especial IgA, que inibem a adesão e conseqüente desenvolvimento destes microrganismos (FOTOS e HELLSTEIN, 1992; ZÖLLNER e JORGE, 2003; SCHERMA et al., 2004; KADIR et al, 2005).

3.2.3 Candidoses, fatores de virulência e aspectos imunológicos do hospedeiro

A candidose é a infecção fúngica oportunista mais freqüente, tendo um espectro bastante extenso, indo desde manifestações locais em mucosas, como a mucosa bucal, até quadros sistêmicos com a invasão de diferentes órgãos (SIDRIM, 1999). Na cavidade bucal a simples presença de leveduras não é sinônimo da doença, mas a doença em si é invariavelmente precedida pela colonização (SCHARDOSIMI e CHERUBINI, 2004). Com o desequilíbrio no sistema de defesa do hospedeiro e presença de fatores predisponentes (redução do fluxo salivar, uso de prótese, entre outros) as leveduras têm seu potencial de proliferação aumentado, passando de sua forma comensal para a forma parasitária. As leveduras são geralmente encontradas em mucosa na forma de células ovais apresentando brotamento. A forma invasiva do fungo consiste na formação do pseudomicélio, ou seja, a presença de hifas septadas com blastoconídios nas constrictões das mesmas (GOMPertz e CEBALLOS, 1991).

A virulência da *Candida* está relacionada a diferentes fatores, sendo o principal a sua capacidade de adesão às células epiteliais, que ocorre principalmente pela presença de hifas e tubos germinativos, no caso da espécie *C.albicans*. Sabe-se que o poder de adesão dos tubos germinativos é maior, o que provavelmente explique a prevalência de colonização por *C.albicans* e seu maior potencial patogênico. As leveduras desta espécie podem ainda se aderir às bactérias da cavidade bucal, dispostas principalmente na forma de placa bacteriana sobre os elementos dentários (ODDS, 1988).

BARBIERI (2005) analisou a aderência entre *C. albicans* e *S. mutans in vitro* e verificou que houve aumento considerável no desenvolvimento dos dois microrganismos quando estes eram cultivados juntos, porém a *C. albicans* sozinha também apresentou capacidade de aderência à estrutura dentária, mesmo com ausência de biofilme bacteriano.

As hifas e pseudo-hifas, próprias de algumas espécies de *Candida*, podem ter comprimento maior que 200µm, o que dificulta a fagocitose, principal meio de defesa do organismo contra este tipo de infecção (SIDRIM, 1999). Algumas espécies de *Candida*, incluindo a *C.albicans*, são produtoras de enzimas

hidrolíticas, como as proteinases ácidas e as fosfolipases, que facilitam sua penetração no tecido subjacente. Também produzem ácidos, em especial o piruvato e o lactato, que baixam o pH do meio e ativam as enzimas ácidas (ODDS, 1988).

Em indivíduos imunologicamente saudáveis, os mecanismos de defesa do hospedeiro são suficientes para prevenir infecções pela *Candida*. Apesar da realização de diversos estudos, há poucas respostas elucidativas sobre os mecanismos específicos usados pelo sistema imune contra a *Candida* (REPENTIGNY, LEWANDOWSKI e JOLICOEUR, 2004). Sabe-se que para a manutenção da saúde bucal contra as candidoses, as respostas imunes (celular e humoral) estão envolvidas. Na resposta imune celular, considerada a mais importante, os antígenos (*Candida*) são apresentados às células T pelas células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células de Langerhans, queratinócitos e células dendríticas). As células T CD4⁺ auxiliares (Th1 e Th2) passam então a produzir citosinas (interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral) que ajudam a eliminar o agente agressor através da estimulação de outras células, da fagocitose e da quimiotaxia (CANTORNA e BALISH, 1991; NEWMAN e HOLLY, 2001; FARAH et al., 2002). A resposta imune humoral ocorre pela produção de anticorpos IgA, que estão presentes na saliva e se ligam às superfícies das leveduras do gênero *Candida*, impedindo assim sua adesão as células epiteliais da mucosa (COOGAN, SWEET e CHALLACOMBE; 1994). A saliva ainda apresenta em sua composição outros fatores microbianos como lisozima, lactoperoxidases, polipeptídios ricos em histidina, calprotectinas, lactoferrina, histatinas, mucinas, células fagocitárias e outras glicoproteínas, que mantêm o equilíbrio ecológico oral, sendo considerada o primeiro agente de defesa na cavidade bucal (COOGAN, SWEET e CHALLACOMBE; 1994; EDDGERTON, 1998; ROSS e HERZBERG, 2001).

3.2.3.1 Aspectos Clínicos das Candidoses Bucais

As candidoses bucais apresentam-se sob aspectos clínicos variados, e quando avaliadas pela sua evolução, podem apresentar-se sob duas formas: aguda ou crônica. As formas agudas subdividem-se em pseudomembranosas ou

eritematosas, e as crônicas em pseudomembranosas, hiperplásicas, eritematosa, queilite angular e candidose mucocutânea crônica (SIDRIM, 1999; LACAZ et al, 2002; AZUL e TRANCOSO, 2006) Destacam-se os tipos pseudomembranoso e eritematoso, conhecidos pela sua maior freqüência em crianças.

A candidose pseudomembranosa é a manifestação clássica e mais comum em crianças. Geralmente aguda, pode, quando não tratada, evoluir para um quadro crônico. As lesões se caracterizam por placas esbranquiçadas, semelhantes a “leite coalhado”, localizadas em qualquer região da cavidade bucal, especialmente na língua e no palato. Tais placas são constituídas, em grande parte, de pseudomicélio e epitélio descamado, com erosão mínima da mucosa. As placas são facilmente removidas por raspagem, deixando abaixo um tecido eritematoso e sensível. Na maioria dos casos as lesões se limitam a cavidade bucal, mas outras vezes se propagam a orofaringe, esôfago e estômago. (ODDS, 1988; SIDRIM, 1999; e LACAZ, 2002).

A candidose eritematosa caracteriza-se pela presença de zonas difusas, vermelhas e cujos limites são, normalmente mal definidos. Localiza-se preferencialmente na superfície dorsal da língua, podendo também ser encontrada no palato. Tal como a candidose pseudomembranosa, existe na forma aguda ou crônica, sendo acompanhada, algumas vezes, por sensação de queimadura.

Diferentes estudos verificaram a prevalência de alterações bucais em crianças, entre elas a candidose. BALDANI, LOPES e SCHEIDT (2001) examinaram a cavidade bucal de 200 crianças entre zero e 24 meses e os resultados mostraram que 2,5% das crianças estudadas apresentavam candidose e esta foi encontrada com maior freqüência em crianças de zero a três meses. BEZERRA e COSTA (2000) analisaram 1042 fichas clínicas de pacientes de zero a cinco anos que haviam sido atendidos em uma clínica pública, na cidade de Natal. Os resultados mostraram que 2,3% das crianças continham em suas fichas anotações sobre a presença de lesões bucais em dias de consulta, sendo que 6% das lesões eram de candidose. As lesões foram observadas em crianças de zero a três meses e estavam localizadas no dorso da língua. YARED et al. (2001) avaliaram 730 bebês na faixa etária de zero a 300 dias e encontraram uma

prevalência de 12,9% de crianças acometidas por candidose da forma pseudomembranosa aguda. A maioria destas crianças tinham entre 0 e 90 dias. DECONINCK et al. (2003) acompanharam a rotina de consultório de 35 odontólogos por um período de seis meses. Foram atendidos ao total 354 pacientes, com idades entre zero e seis anos. As lesões bucais encontradas com maior frequência foram as aftas ulceradas, em 27% dos pacientes, seguida pela candidose oral, que afetou 15% dos pacientes. 47% dos pacientes com candidose tinham entre zero e quatro anos.

3.3 SÍNDROME DE DOWN X *Candida* spp.

São poucos os trabalhos da literatura que buscaram investigar a relação entre a SD e a colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*. Os trabalhos existentes mostram resultados semelhantes, com pacientes com SD apresentando uma colonização destes microrganismos significativamente maior que em pacientes sem a Síndrome. As alterações anátomo-fisiológicas existentes na cavidade bucal dos portadores da SD, a dificuldade motora, infecções respiratórias recorrentes, alterações na resposta imunológica, maior prevalência de doença periodontal, estão entre as possíveis causas citadas por diferentes autores (CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; LINOSSIER et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; VIEIRA et al., 2005).

CARLSTEDT et al. (1996) avaliaram a ocorrência de diferentes espécies de *Candida* na cavidade bucal de um grupo de 55 crianças e adolescentes com SD (34 meninos e 21 meninas), com idade entre 0 e 21 anos. O grupo controle era formado por 55 crianças e adolescentes sem SD, com idade semelhante, sendo 34 meninos e 21 meninas. Os participantes da pesquisa foram submetidos ao exame clínico e coleta de saliva, por meio de *swabs*, de quatro regiões distintas da cavidade bucal (mucosa vestibular direita e esquerda, palato e dorso posterior da língua). Os resultados mostraram que 69% dos pacientes com SD eram colonizados por *C.albicans* e 40% apresentavam lesões de candidose (pseudomembranosa ou eritematosa). Dezenove crianças (35%) do grupo controle eram colonizadas por *C.albicans*, sendo que só uma apresentava lesões

de candidose. Três pacientes com SD apresentaram colonização por outras espécies de *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*) e um paciente controle apresentou colonização por *C. tropicalis*. A distribuição das leveduras na cavidade bucal e o número de colônias isoladas também variaram entre os grupos. Nos pacientes com SD a distribuição das colônias foi similar entre o palato, a língua, mucosa vestibular e o número de colônias isoladas foi significativamente maior. Os pacientes do grupo controle apresentaram uma maior distribuição de células na língua e mucosa vestibular.

SCULLY et al. (2002) examinaram 77 pacientes portadores da SD, sendo 40 do sexo masculino e 37 do sexo feminino. O grupo compreendia pacientes ingleses e espanhóis, de todas as idades, com diferentes tipos de trissomia do cromossomo 21, sendo que alguns viviam em instituições e outros em casa. Realizou-se a avaliação clínica a fim de se verificar a presença de fissuras labiais ou queilite angular. A seguir coletaram-se amostras de saliva, por meio de *swabs*, de 50 pacientes estudados. As amostras eram coletadas de diferentes regiões da cavidade bucal (palato duro, dorso de língua e lesões labiais, quando presentes). Os resultados mostraram que 27% dos indivíduos estudados apresentavam fissuras labiais e 25%, queilite angular. Foram isoladas leveduras de *C. albicans* da cavidade bucal de 28 pacientes (56%) sendo que a maioria dos isolados (77,3%) era de pacientes que apresentam fissuras labiais ou queilite angular.

LINOSSIER et al (2002) realizaram um estudo com a intenção de estabelecer a relação quantitativa existente entre o nível de *Streptococcus mutans* e *C. albicans* em crianças com SD, comparando com pacientes com retardo mental e pacientes controle. Participaram do estudo um total de 166 crianças e adolescentes, com idades entre 5 e 19 anos, sendo que 49 destes eram portadores da SD, 60 apresentavam retardo mental e 57 formavam o grupo controle. Fez-se a estimulação do fluxo salivar com uma solução de ácido cítrico a 1% e a coleta de cerca de 0,5 ml de secreção salivar em tubos de vidro. As amostras isoladas foram submetidas a um experimento de agregação para se observar a aderência do *S. mutans* à levedura de *C. albicans*. Os resultados demonstraram que existe um aumento diretamente proporcional entre a quantidade de leveduras e bactérias isoladas nos três grupos. Os pacientes dos

grupos SD e com retardo mental apresentaram uma maior expressão geométrica de *C. albicans* em comparação ao grupo controle.

RIBEIRO et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de verificar a ocorrência de leveduras do tipo *C. albicans* produtoras de fosfolipase na saliva de crianças com SD. A fosfolipase é uma enzima extracelular produzida pelas leveduras de *C. albicans* e pode estar relacionada à virulência deste microrganismo. Participaram do estudo 60 crianças, com idade entre zero e 10 anos, sendo que 30 eram portadoras da SD. As crianças foram submetidas ao exame clínico odontológico quando se fez a coleta da secreção salivar da mucosa jugal por meio de *swabs* esterilizados. Foram isoladas leveduras de *C. albicans* da saliva de 83,3% das crianças portadoras de SD e destas 88% eram produtoras de fosfolipase. Das crianças sem SD foram isoladas cinco amostras de *C. albicans* (16,7%), sendo que quatro (80%) eram produtoras de fosfolipase.

VIEIRA et al. (2005) realizaram uma pesquisa com o objetivo de verificar a ocorrência de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com SD. Participaram do estudo 70 crianças com idades entre 0 e 10 anos, sendo 35 portadoras da SD e as demais crianças desprovidas desta síndrome. As amostras foram coletadas com *swabs* esterilizados da mucosa jugal das crianças participantes do estudo. Os resultados mostraram que 85,7% das crianças com SD eram colonizadas por *C. albicans* enquanto que apenas 17,1% das crianças sem a síndrome apresentaram colonização por *C. albicans*, diferença esta estatisticamente significativa.

3.4 MARCADORES MOLECULARES

A variabilidade genética entre microrganismos pode ser verificada através de análises de suas características fenotípicas ou pela análise do genótipo, ou seja, seu material genético. As análises fenotípicas tradicionais se baseiam em um certo número de características expressas pelos microrganismos e é realizada por meio de caracterizações morfológicas e provas bioquímicas, o que muitas vezes pode ser insuficiente para uma identificação precisa, devido à limitação dos métodos. Atualmente, a análise do genótipo de microrganismos vem sendo

amplamente utilizada, seja na identificação direta de espécies isoladas, seja para verificar a variabilidade genética entre espécies distintas ou dentro de uma mesma espécie.

As técnicas de biologia molecular eram limitadas até meados da década de 1980, quando surgiu uma nova metodologia para clonagem e detecção do material genético. Denominada de reação em cadeia da polimerase (PCR), esta nova metodologia é baseada em uma reação de replicação *in vitro*, na qual se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial (SILVA - PEREIRA, 2003).

O processo de amplificação envolve repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA molde (92° a 95°C), anelamento dos iniciadores às suas seqüências complementares (35° a 60°C) e extensão dos oligonucleotídios anelados por uma enzima DNA polimerase (72°C). A princípio a escolha de uma enzima polimerase que resistisse às altas temperaturas necessárias para a desnaturação da fita molde representou uma limitação da técnica. Nesse sentido o isolamento de uma enzima polimerase (*Taq* polimerase) de uma bactéria (*Thermus aquaticus*) resistente às altas temperaturas promoveu o grande impacto da técnica (SILVA - PEREIRA, 2003).

Uma vez que os produtos recém-sintetizados também são complementares e capazes de se ligar aos iniciadores (*primers*), após desnaturação térmica, cada ciclo sucessivo essencialmente dobra a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. O resultado é o acúmulo exponencial do fragmento específico de DNA aproximadamente a 2^n , onde n é o número de ciclos realizados (POWER, 1996; SILVA - PEREIRA, 2003).

Atualmente, uma variedade de técnicas em biologia molecular explora o princípio da PCR, entre elas a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

3.4.1 Marcadores RAPD

Nesta técnica um único *primer*, com aproximadamente 10pb, é usado para amplificar o DNA a ser estudado, por uma reação de PCR. A grande

vantagem da técnica é a não necessidade do conhecimento prévio do DNA a ser analisado. A seleção do *primer* é arbitrária e a sua ligação é feita em sítios não específicos (POWER, 1996; PINTO et. al., 2004). Além disso, a técnica tem alta capacidade de discriminação e é considerada fácil de ser realizada (PINTO et al., 2004).

A técnica vem sendo questionada quanto a sua dificuldade de reprodução, problemas técnicos durante os passos e a dificuldade de se analisar os resultados. Neste sentido, diferentes pesquisas vêm trabalhando para aperfeiçoar a metodologia e diminuir os riscos de possíveis falhas (HOLMBERG e FERROZE, 1996; SANSFORIANO, 2001).

CLEMONS et al. (1997) avaliaram a variabilidade genética de isolados de *C. albicans* de três localidades diferentes por meio de três técnicas distintas de biologia molecular: Análise de Enzima de Restrição (REA), RAPD e Eletroforese em campo pulsado (PFGE). Os resultados mostraram que as técnicas de RAPD e REA têm melhor poder de discriminação que PFGE, além da técnica de RAPD ser mais rápida e precisar de menores quantidades de DNA extraído. Os 102 isolados de *C. albicans* apresentaram alta variabilidade genética, com 58 perfis genéticos diferentes (RAPD). Os isolados da Europa e Estados Unidos foram agrupados, enquanto que os de Singapura ficaram em grupo distinto. Resultados semelhantes foram encontrados por BOSTOCK et al. (1993), DIAZ-GUERRA et al. (1997), RIBOT et al. (2000), mostrando que isolados de *C. albicans* apresentam grande variabilidade genética, que pode ser observada por meio de marcadores RAPD. Os resultados encontrados reforçam o uso desta técnica para estudos de variabilidade genética destes microrganismos.

A variabilidade genética entre isolados de leveduras do gênero *Candida* vem sendo alvo de diversos estudos. ROBERT et al. (1995) avaliaram a variabilidade genética entre 84 amostras de *C. albicans*, isoladas de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), por meio de marcadores RAPD, comparando com amostras isoladas de outros pacientes internados em outras áreas do mesmo hospital. Os resultados mostraram que entre os 84 isolados de pacientes da UTI (18), havia apenas 7 perfis genéticos diferentes, enquanto que

as outras amostras mostraram 22. Os resultados encontrados mostraram que a RAPD é de grande valor para estudos epidemiológicos.

WALTIMO et al. (2001) isolaram 37 amostras de *C. albicans* de canais radiculares de 37 pacientes com periodontite apical. As amostras foram avaliadas quanto ao fenótipo por meio de perfil enzimático, assimilação de açúcar e resistência ao ácido bórico. O primeiro teste mostrou quatro fenótipos diferentes, o segundo nove e o terceiro dois, resistente ou sensível. Uma combinação dos resultados mostrou que as amostras apresentavam 14 fenótipos distintos. Os marcadores RAPD mostraram 31 genótipos diferentes, mostrando o alto polimorfismo genético da espécie.

Outros trabalhos buscaram verificar, através dos marcadores RAPD, se leveduras do tipo *C. albicans* isoladas de sítios anatômicos diferentes apresentam o mesmo perfil genético. ANSARI et al. (2003) isolaram leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal e das fezes de 108 crianças, divididas em dois grupos: grupo controle, formado por crianças sem cárie e grupo de estudo formado por crianças com lesões cariosas. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas das amostras salivares, em 2% das crianças do primeiro grupo e em 67% do segundo grupo, mostrando que lesões de cárie representam um nicho ecológico para o desenvolvimento de leveduras. Também foi encontrada maior prevalência de leveduras nas fezes das crianças com cárie (59%), contra 2% do grupo controle. Um total de 55 amostras de pacientes co-infectados (33) foram submetidas à análise gênica, por RAPD. Trinta e três amostras apresentavam perfis genéticos idênticos entre amostras isoladas da cavidade bucal e fezes.

CERIKÇIOGLU et al. (2004) isolaram leveduras do gênero *Candida* de diferentes sítios anatômicos (orofaringe, axilas, umbigo, reto e sangue) de 134 recém-nascidos prematuros com baixo peso internados em uma UTI entre 1999 e 2002. Foram avaliadas a atividade das enzimas proteinase e fosfolipase das leveduras isoladas. Os resultados mostraram que 48,5% (65) dos bebês eram colonizados por leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente (80%). Quatro dos 65 recém-nascidos colonizados por leveduras desenvolveram candidemia, ou seja, infecção do sangue pelas leveduras. A análise da variabilidade genética, realizada por meio de marcadores RAPD, entre

os isolados do sangue e os isolados de outros sítios anatômicos mostrou que em um mesmo paciente os isolados eram idênticos. Foi verificada também uma alta atividade das enzimas hidrolíticas (proteínase e fosfolipase) nos isolados das crianças com candidemia.

Atualmente diferentes estudos avaliam o uso da RAPD para a identificação direta de leveduras do gênero *Candida*. RESENDE et al. (2004) isolaram e identificaram fenotipicamente 242 amostras de leveduras do gênero *Candida*, sendo que as amostras (37) das espécies mais frequentes (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*), 15 amostras que foram de difícil identificação pelo fenótipo e linhagens ATCC foram submetidas à análise do polimorfismo genético e à identificação, por meio de RAPD. Os resultados mostraram 100% de compatibilidade entre a primeira identificação (fenótipo) e os agrupamentos do RAPD, mostrando que este método pode ser usado para a identificação direta de *Candida* spp.

GIAMMANCO et al. (2005) avaliaram 28 amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de 18 pacientes com HIV e verificaram, através da análise do fenótipo, que todas as amostras apresentavam o mesmo padrão de assimilação de açúcar. A análise de resultados da RAPD mostrou que quase todos os pacientes apresentavam perfis genéticos diferentes, mostrando mais uma vez o polimorfismo genético da espécie. LEHMANN, LIN e LASKER (1992), STEFFAN et al. (1997), MELO et al. (1998), e BAUTISTA-MUÑOZ et al. (2003) afirmam que os marcadores RAPD podem ser usados como marcadores para descrições taxonômicas e identificação direta de *Candida* spp. em investigações epidemiológicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA

4.1.1 Ágar Saboraud Dextrose - SDA

Peptona	10g
Dextrose	40g
Agar	15g
Água destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6

4.1.2 Ágar Batata Dextrose – BDA

Infusão de Batatas	200ml
Dextrose	20g
Ágar	15g
Água destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 5,6.

4.1.3 Ágar Hicrome Candida (Himedia ®)

Digestão péptica do tecido animal	15g
Fosfato dipotássico de hidrogênio	1g
Mistura cromogênica	11,22g
Clorafenicol	0,5g
Agar	15g
Água destilada	1000ml

O pH final foi ajustado para 7,2.

4.1.4 Ágar Fubá com Tween 80 (SIDRIM e MOREIRA, 1999)

Fubá de milho	40g
Ágar bacteriológico	20g
Tween 80	12ml
Água destilada	1000ml

4.1.5 Meio para Assimilação de Carboidratos (SIDRIM e MOREIRA, 1999)

Yeast Nitrogen Base (Difco [®])	6,7g
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	1000ml

4.1.6 Meio para Assimilação de Nitrato (SIDRIM e MOREIRA, 1999)

Yeast Carbon Base (Difco [®])	6,7g
Ágar bacteriológico	20g
Água destilada	1000ml

4.2 SOLUÇÕES REAGENTES

4.2.1 Solução Salina

NaCl	8,5g
Água destilada	1000ml

4.2.2 DNA polimerase

A Taq DNA polimerase utilizada nas reações de amplificação foi a da marca Invitrogen, na concentração de 5U/ μ L.

4.2.3 dNTP

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM), foram diluídos em água ultrapura a 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,2mM de cada dNTP.

4.2.4 Gel de Agarose (0,8%)

Agarose	0,8g
Tampão TEB 1X	100ml

4.2.5 Gel de Agarose (1,4%)

Agarose	1,4g
Tampão TEB 1X	100ml

4.2.6 Oligonucleotídios iniciadores (*Primers*)

Os *primers* foram diluídos em água ultrapura autoclavada usando o peso molecular do *primer* individual dado pelo fornecedor. Os *primers* diluídos foram mantidos a -20°C.

4.2.7 Tampão da amostra

Sacarose	40g
Azul de bromofenol	0,25g
Água destilada	100ml

Os ingredientes foram solubilizados e mantidos a 4°C.

4.2.8 Tampão CTAB

Tris-base	2,42g
Cloreto de sódio	8,2g
Na-EDTA	0,74g
CTAB	2g
Água destilada	80ml
pH:7,5	

A solução foi aquecida para que o Na-EDTA e o CTAB fossem dissolvidos e o volume completado para 100mL com água destilada autoclavada.

4.2.9 Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X) - pH 8,0

Tris-base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M	20ml
Água destilada	500ml

4.2.10 Solução de Brometo de Etídio

Foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas. A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, foram diluídos em 3 μ L de água destilada.

4.3 ESTERILIZAÇÃO

Os meios de cultura e soluções foram esterilizados em autoclave, com pressão atmosférica de 1 atm por 20 min. Vidrarias foram autoclavadas por 40 min. Frascos, ponteiras e tubos tipo *ependorf* foram autoclavados à pressão de 1 atmosfera, por 15 min e os procedimentos diferenciados foram especificados em cada item. Todo material contaminado foi esterilizado antes do descarte.

4.4 LINHAGENS UTILIZADAS

Foram utilizadas linhagens de leveduras do Gênero *Candida*, isoladas da saliva de crianças atendidas nos Ambulatório de Síndrome de Down e de Pediatria Preventiva do Hospital de Clínicas da UFPR, além de crianças atendidas em uma Unidade Básica de Saúde da Região Metropolitana de Curitiba (Colombo – PR). Também foram usadas as linhagens ATCC 750 de *C. tropicalis*, 6258 de *C. krusei* e 22019 de *C. parapsilosis*, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Arnaldo Colombo do Laboratório Especial de Micologia - LEMI da EPM/UNIFESP. A linhagem ATCC 10231 de *C. albicans* utilizada foi gentilmente cedida pela bióloga Rosângela Lameira Pinheiro, Setor de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

4.5 CASUÍSTICA

Fizeram parte do estudo 101 crianças com idades entre zero e 6 anos. O estudo realizado foi um estudo de caso-controle, constituído de dois grupos. O primeiro (grupo 1) foi formado por 51 crianças portadoras da Síndrome de Down que freqüentavam o ambulatório de Síndrome de Down do Hospital de Clínicas da UFPR e selecionadas primeiramente de acordo com as características do serviço. O grupo 2 foi formado por 50 crianças sem SD que eram atendidas no Ambulatório de Pediatria Preventiva do Hospital de Clínicas da UFPR e em uma Unidade Básica de Saúde da região metropolitana de Curitiba, Colombo – PR. Buscou-se a semelhança deste grupo em relação à idade do grupo 1. Os critérios de inclusão adotados foram: não utilização de antibióticos no dia da coleta, condições gerais de saúde normais, ausência de lesões na mucosa bucal e permissão dos responsáveis através do termo de consentimento informado (Apêndice 1). O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Apêndice 2).

4.6 EXAME CLÍNICO

Primeiramente foi realizado o preenchimento de uma ficha clínica (Apêndice 3) que continha dados de identificação do paciente, condições gerais

de saúde e uso de medicamentos. As crianças foram avaliadas por um único observador, que verificou a ausência de lesões na mucosa bucal.

4.7 COLETAS SALIVARES

Foram realizadas coletas salivares com auxílio de *swabs* de algodão esterilizados (Fabrimed®). Este foi o método mais indicado devido a pouca idade das crianças participantes do estudo (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; CARLSTEDT et al., 1996; RIBEIRO et al., 2002; SCULLY et al, 2002; SCHARDOSIMI e CHERUBINI, 2004; KADIR et al., 2005; VIEIRA et al., 2005). A coleta foi feita passando-se o *swab* por diferentes regiões da cavidade bucal (dorso de língua, palato, mucosa vestibular e mucosa jugal). Os *swabs* com amostras de saliva eram então depositados em tubos contendo cinco ml de solução salina esterilizada. Os tubos foram mantidos em recipientes térmicos com gelo e as amostras foram processadas em até duas horas após a coleta.

4.8 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* NA SALIVA

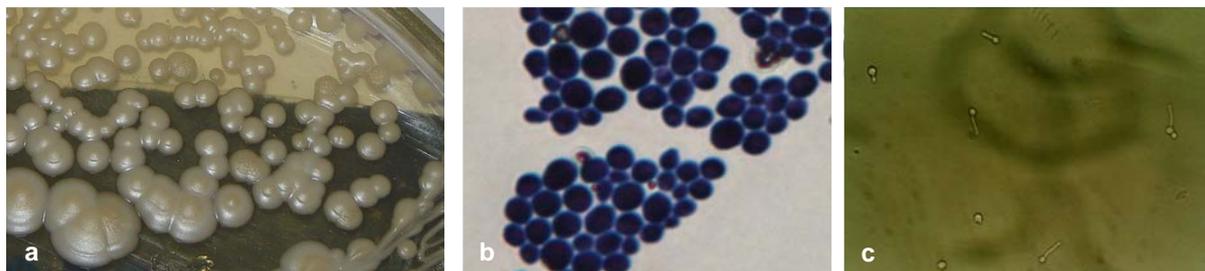
As amostras foram processadas no laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da UFPR. Os tubos contendo os *swabs* eram colocados no agitador magnético (Vortex QL-901/Biomixer) para homogeneização da solução. O conteúdo era então diluído a 10^{-1} em novo tubo contendo solução salina esterilizada e novamente homogeneizado em agitador magnético. A partir desta diluição, 0,1 ml de cada amostra foram semeadas (em estrias) em placa de Petri contendo o meio Ágar Saboraud Dextrose. As placas foram incubadas a 30°C por um período de 48 horas até sete dias.

4.9 IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Após o período de incubação era verificado se houve o desenvolvimento de colônias de leveduras. A primeira análise era realizada pelas características macroscópicas das colônias que apresentaram crescimento. As colônias de

Candida spp. têm como características serem esféricas, de coloração branco-fosca, com aspecto de porcelana, aspecto cremoso, diâmetro entre 1 a 8 mm e odor característico (Figura 1a). As colônias que apresentavam tais características eram submetidas à Coloração de Gram e observadas em microscópio óptico (Nikon/YS2-T) (Figura 1b). Confirmada a presença de leveduras, uma colônia de cada placa era repicada para um tubo contendo BDA e outro tubo contendo SDA. Todos os isolados foram mantidos em Ágar Sabouraud Dextrose e repicados, em média, uma vez por mês. Para a identificação das leveduras isoladas foram usados métodos distintos: Formação do Tubo Germinativo, Ágar Hicrome *Candida*[®] (Himedia), Sistema API 20 C AUX[®] (BioMérieux), Microcultivo de leveduras, provas de Assimilação de Carboidratos e Assimilação de Nitrogênio.

FIGURA 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*



FONTE: O autor

- a – Macromorfologia das leveduras do gênero *Candida* - esféricas, coloração branco-fosca, aspecto cremoso
- b – Micromorfologia de leveduras do gênero *Candida* (*C. albicans*) em 1000X em M.O.
- c – Formação do tubo germinativo em 400X em M.O.

4.9.1 Formação do Tubo Germinativo

Para a realização deste teste foram utilizadas colônias novas (24 horas) repicadas em BDA. Utilizou-se 0,5 ml de plasma humano depositado em tubo esterilizado, acrescido de traços de dextrose e uma alçada da amostra a ser analisada. O tubo foi então incubado em estufa a 37°C por três horas. Para a

visualização, uma gota da cultura em suspensão foi colocada entre lâmina e lamínula e observada em microscópio óptico (Nikon/YS2-T) (Figura 1c).

4.9.2 Ágar Hicrome Candida[®] (Himedia)

Todas as leveduras isoladas foram também repicadas em meio cromogênico. Colônias novas (24-48horas) repicadas em SDA foram repicadas, em estrias, em placas de Petri contendo o meio com a mistura cromogênica. Os resultados eram observados pelo crescimento das colônias, com 24 a 48 horas, em cores distintas (Figura 2). Segundo as instruções do produto as leveduras de *C. albicans* ficam da cor verde clara, as colônias de *C. tropicalis* ficam da cor azul clara. A *C. krusei* tem aspecto branco cremoso e a *C. glabrata* cresce com a coloração icor rosa.

FIGURA 2 - CARACTERÍSTICAS DO CRESCIMENTO DAS COLÔNIAS EM MEIO CROMOGÊNICO



FONTE: O autor

- a – Crescimento de *C. albicans* em meio cromogênico (verde clara)
- b – Crescimento de *C. krusei* em meio cromogênico (branca cremosa)
- c – Crescimento de *C. tropicalis* em meio cromogênico (azul clara)

4.9.3 Sistema API 20 C AUX[®] (BioMérieux)

Para a realização deste teste foram utilizadas colônias novas (24 horas) repicadas em SDA. Primeiramente era feita a transferência de uma pequena quantidade da colônia para um tubo contendo cerca de um ml de solução fisiológica esterilizada (API NaCl 0,85%) e então a diluição era ajustada a uma

turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland. Em seguida 100 μ L desta suspensão eram adicionadas ao meio basal do sistema API 20C Aux (API C Medium) e homogeneizado (Vortex QL-901/Biomixer). A seguir gotas desta suspensão eram usadas para preencher os 20 poços do painel de identificação, que eram formados por 19 carboidratos diferentes (D-glucose, glicerol, cálcio-2-ceto-gluconato, L-arabinose, D-xilose, adonitol, xilitol, D-galactose, inositol, D-sorbitol, Metil- α -D-glucopiranosido, N-acetil-glucosamina, D-celobiose, D-lactose, D-maltose, D-sacarose, D-trealose, D-melezitose e D-rafinose) e um controle negativo. O painel era então incubado em câmara úmida previamente preparada por 72 horas, quando se fazia a leitura. Era considerado como resultado positivo a presença de opacidade (turvação) nos poços, enquanto os resultados negativos eram mostrados pela ausência de opacidade. Obteve-se assim um código de quatro dígitos, cuja interpretação foi realizada com o auxílio do programa de identificação **apiweb**TM. Foram considerados os resultados que apresentaram identificações consideradas como excelente ou muito boa (%id entre 100 e 97%) (SILVA e CANDIDO, 2005).

4.9.4 Microcultivo de Leveduras

As amostras que obtiveram valor de identificação menor que o valor estabelecido no sistema API 20 C AUX[®] ou aquelas que geraram dúvidas, foram submetidas à prova de microcultivo. Para a realização desta prova foram usadas colônias de 24 horas repicadas em SDA. Foram preparadas duas lâminas para cada amostra. Em cada uma das lâminas era distribuído o meio Ágar fubá com Tween 80, previamente aquecido. Esperava-se o meio solidificar e com auxílio de uma alça de platina contendo uma pequena quantidade da amostra a ser analisada, fez-se duas estrias sobre cada lâmina. Por sobre a lâmina, depositou-se uma lamínula e ambas foram incubadas dentro de uma placa de Petri de 150 X 20 mm de diâmetro, em estufa a 30°C por 48 horas (SIDRIM e MOREIRA, 1999). Para a leitura, levou-se a lâmina ao microscópio óptico (Nikon/YS2-T), para verificação das estruturas formadas (Figura 3).

FIGURA 3 – CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*



FONTE: O autor

- a – Micromorfologia de levedura *C. krusei* em aumento de 1000 X em M.O.
 b – Micromorfologia de levedura *C. albicans* em aumento de 1000 X em M.O.
 c – Micromorfologia de levedura *C. parapsilosis* em aumento de 1000 X em M.O.

4.9.5 Assimilação de Carboidratos (Auxonograma) e Nitrogênio

Para a realização das provas foram usadas colônias novas (24 horas) repicadas em SDA. Primeiramente foi feita uma diluição da amostra em água esterilizada. Em uma placa de Petri de 150 X 20 mm de diâmetro, foram vertidos cerca de dois ml da diluição da amostra e cerca de 40 ml dos meios de cultura. Fez-se movimentos circulares com as placas a fim de homogeneizar o inóculo. Foram preparadas quatro placas para cada amostra, sendo que três eram para o teste de assimilação de carboidratos e uma para o teste de assimilação do nitrogênio. Após a solidificação dos meios foram adicionados quatro carboidratos, na forma de discos de papel já impregnados com o açúcar ou o açúcar *in natura*, em cada canto das três placas destinadas para o teste de assimilação de carboidratos. Os açúcares utilizados foram: dextrose (Laborclin[®]), lactose (Laborclin[®]), sacarose (Laborclin[®]), maltose (Laborclin[®]), galactose (Laborclin[®]), inositol (Laborclin[®]), celobiose (Enterofar II[®]), melobiose (Enterofar II[®]), xilose (Enterofar II[®]), trealose (Laborclin[®]), rafinose (Merck's Praparete[®]) e dulcitol (Laborclin[®]). Na placa para o teste de assimilação do nitrogênio colocou-se nos extremos opostos da placa uma pequena quantidade de nitrato de potássio e peptona (controle positivo) (SIDRIM e MOREIRA, 1999). Os resultados eram observados pela formação de um halo ao redor dos carboidratos e da fonte de nitrogênio, indicando sua assimilação ou não

(Figura 4) e o padrão de comportamento era verificado de acordo com KONEMAN e ROBERTS (1985) (Tabela 1).

FIGURA 4 – ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS E NITROGÊNIO PELAS LEVEDURAS ISOLADAS



FONTE: O autor

a e b – Assimilação de carboidratos por levedura isolada (*C. albicans*)

c- Teste de assimilação de nitrogênio

TABELA 1 – ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS PELAS LEVEDURAS ISOLADAS (AUXONOGRAMA)

	Assimilação												
	Dextrose	Maltose	Sacarose	Lactose	Galactose	Melbiose	Celbiose	Inositol	Xylose	Rafinose	Trealose	Dulcitol	KNO ₃
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>C. rugosa</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

* Variação da espécie

FONTE: KONEMAN e ROBERTS (Modificado)

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS ENCONTRADOS

Para a comparação dos dados foram utilizados os testes não-paramétricos “Mann-Whitney”, “Comparação entre duas Proporções” (através do software “*Primer of Biostatistics*”), “Qui-Quadrado” e “Exato de Fisher” (pelo Epi-Info). O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$). Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de Tabelas e gráficos.

4.11 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com VICENTE (2000) modificado por MOREIRA (2006). As amostras foram previamente repicadas para Ágar Batata Dextrose e incubadas por 48h a 30°C. Após este período, de três a cinco alçadas das culturas foram transferidas a um tubo contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite 2:1, em 600 μ L de CTAB. Em seguida foram aplicados dois pulsos (de 30 seg) de ultra-som (potência 70), com intervalos de 30 seg entre cada pulso, sob banho de gelo, utilizando desruptor de célula ultrassônico (marca Unique).

Foram, então, adicionados 400 μ L de CTAB e as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Após atingir temperatura ambiente, foram adicionados 1000 μ L de clorofórmio e os tubos centrifugados a 12000 rpm por sete minutos. O sobrenadante foi transferido a outro tubo, ao qual foram adicionados mais 1000 μ L de CIA e a centrifugação repetida. Cerca de 2000 μ L de álcool 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e os tubos incubados a - 20°C por 24 horas para precipitação dos ácidos nucleicos. Após este período foram centrifugados a 12000 rpm por sete minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com álcool 70% gelado e repetida a centrifugação a 12000 rpm por mais sete minutos. O álcool foi retirado e os tubos vertidos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado (cerca de 15 minutos). Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de água ultrapura para ressuspender o DNA. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24h e

armazenados a - 4°C. A integridade foi verificada mediante eletroforese em gel de agarose 0,8%, e visualizada com brometo de etídio em luz UV.

4.12 SEQÜENCIAMENTO

Três isolados foram ainda submetidos à reação de seqüenciamento para a confirmação dos resultados obtidos por meio dos diferentes métodos de identificação previamente utilizados. O processo de seqüenciamento envolve diferentes etapas que serão descritas a seguir:

4.12.1 PCR

O DNA das amostras previamente extraído foi amplificado com os pares de primers V9G (5'TTACGTCCCTGCCCTTTGTA3') e LS266 (5'GCATTCCCAAACAACACTCGACTC 3'). Para a reação de PCR foi utilizado um volume de 50µl contendo 12ng do DNA extraído, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 0,2 mM para um *mix* de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada *primer*, 10 mM de tampão da enzima. A reação de amplificação consistiu de 30 ciclos (30 segundos de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 56°C, 1 min de síntese a 72°C), utilizando 2 min para desnaturação inicial e 3 min de extensão final (Termociclador Mastercycler gradient)

Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,6% (utilizando 5 µl da amostra e 3 µl do corante) para visualização. O marcador de peso molecular utilizado foi o *Ladder* de 200pb.

Posteriormente foi realizada a purificação dos produtos de PCR. Foi adicionado 50 µL de polietilenoglicol (PEG) aos 50 µl de reação de PCR. Em seguida o material foi transferido para um tubo tipo *ependorf* de 0,5 ml e incubado a 37°C por 30 min. O material foi centrifugado por 20min a 11337 x *g* e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 125 µl de etanol 80% gelado e o material foi novamente centrifugado por 2 min a 11337 x *g*. O sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados 125 µl de Etanol 96% (gelado) pela parede do tubo e retirado em seguida. O sobrenadante foi descartado e o etanol

96% evaporado em bomba a vácuo (Univapo 100 ECH) por 10min a 70°C. O material foi ressuspendido em 15 µl de água ultrapura e mantido em temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

4.12.2 Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento, foram utilizados os *primers* ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'). Para cada reação foi utilizado foi utilizado 0,5 µl do *bigdie* terminador (ABI PRISM BigDye Terminators v 3.0 da Applied Biosystems), 1 a 3 µl do produto de PCR purificado (aproximadamente 10 ng, item 4.12.1), 0,5 µl do *primer*, 0,5 µl do tampão e água ultrapura a completar 10 µl. O programa de amplificação (Termociclador Mastercycler personal) constituiu de 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 min a 60°C. Após 25 ciclos foi realizada a refrigeração a 8°C.

4.12.3 Precipitação do DNA a ser seqüenciado

Os 10 µl do DNA amplificado de acordo com o item 4.12.2 foram transferidos para tubos tipo *ependorfs* de volume de 0,5 mL e 40 µL de isopropanol 75% foi adicionado, homogeneizado e deixado à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida o material foi centrifugado por 25 min a 13000 rpm. O isopropanol foi removido e adicionado 200 µL etanol 70% não gelado. Nova centrifugação por 5 min a 7558 g foi realizada. O etanol foi cuidadosamente removido visando a preservação do precipitado. Posteriormente as amostras foram secas em bomba a vácuo (Univapo 100 ECH) por 45 min. a 60°C, e mantidas na ausência de luz.

4.12.4 Seqüenciamento e análise das seqüências

Após a secagem completa do DNA precipitado (item 4.12.3), o mesmo foi ressuspendido em 10 a 20 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), solução indicada para o seqüenciador utilizado. Depois da dissolução, as soluções de DNA foram transferidas para a placa de seqüenciamento e mantidas em termociclador (Mastercycler personal) por 2 minutos a 95°C para desnaturação. A

reação de seqüenciamento foi realizada no seqüenciador modelo 3130 da *Applied Biosystems*. A análise da qualidade das seqüências obtidas, a construção das seqüências consenso e o alinhamento das seqüências foram realizados usando o programa *Bioedit* versão 7.0.2 (TIPPMANN, 2004). A comparação com as seqüências existentes no *GenBank* foi feita utilizando-se o programa BLAST do NCBI como alinhador. A identificação da espécie analisada foi baseada na seqüência com o maior índice de similaridade.

4.13 VARIABILIDADE GENÉTICA

4.13.1 Amplificação do DNA por RAPD

Para a amplificação do DNA, foram utilizadas as condições descritas por VICENTE (2000), modificado, utilizando uma mistura contendo, além da amostra de DNA, os seguintes elementos: 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, 0,4 mM para cada dNTP, 4,0 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 0,4 mM de *primer*, 10 mM de tampão da enzima 1X e 12 ng de DNA para 11 μ L de reação. A reação de amplificação consistiu de 40 ciclos com as seguintes condições: 1 min a 92°C; 1,5 min a 37°C e 2 min a 72°C, utilizando 4 min a 92°C para desnaturação inicial e 3 min a 72°C de extensão final. Os oligonucleotídios utilizados foram da linha Operon Technologies® e suas respectivas seqüências podem ser visualizadas na Tabela 2.

TABELA 2 - PRIMERS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE RAPD

Oligonucleotídio	Seqüência 5' – 3'
OPA 10	5' GTGATCGCAG 3'
OPX 11	5' GGAGCCTCAG 3'
OPX 12	5' TCGCCAGCCA 3'
OPX 14	5' ACAGGTGCTG 3'
OPX 17	5' GACACGGACC 3'
OPX 19	5' TGGCAAGGCA 3'

FONTE: Operon Technologies®

4.13.2 Eletroforese

Os produtos resultantes da amplificação por RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4%, submetidos à corrida eletroforética realizada sob voltagem constante de 3V/cm. O padrão de peso molecular utilizado foi o de 100 pb (DNA *Ladder* 100 pb, Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (15 min) e as bandas observadas com auxílio de um transluminador de luz ultravioleta.

4.13.3 Análise da Variabilidade Genética

Para a análise do polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, foi utilizado o *software* NTSYS (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs*). As bandas resultantes da amplificação foram analisadas com base em variáveis binárias, onde 0 indica ausência de banda e 1 presença. Utilizando o *software* NTSYS, a partir da matriz binária obtida, foi construída uma matriz de similaridade utilizando o coeficiente de Jaccard (J). Este coeficiente permite calcular similaridades com base em variáveis binárias. As bandas foram consideradas como variáveis enquanto as linhagens como unidades. O coeficiente foi calculado segundo a fórmula $J=M/P$, onde M é o número de concordâncias positivas, e P o número total de variáveis, menos as concordâncias negativas. A partir da matriz de similaridade, as unidades foram agrupadas através do método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), para a construção dos dendogramas. A confiabilidade dos grupamentos foi verificada pela análise *bootstrap* com 10000 reamostragens. (MOREIRA, 2006) Para o estudo foram utilizadas 31 amostras isoladas e as quatro linhagens referência ATCC; totalizando 35 amostras.

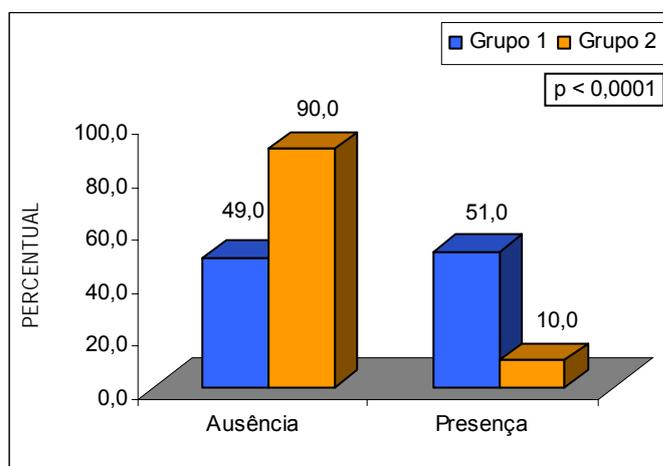
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DAS LEVEDURAS ISOLADAS

Participaram do presente estudo 101 crianças com idades entre zero e 6 anos, classificados em dois grupos: grupo 1, formado por crianças portadoras da SD (n = 51), e grupo 2, formado por crianças sem SD (n= 50). A análise dos dados referentes aos grupos mostrou que os dois eram similares, sem diferenças estatísticas entre as variantes idade ($p=0,794$) (Mann-Whitney) e sexo ($p=0,136$) (Qui-Quadrado) dos participantes.

Existem poucas pesquisas na literatura sobre a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças com SD, sendo que os mesmos variam quanto à metodologia e as características dos grupos estudados (CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; VIEIRA et al., 2005). Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que em 51% (26) das crianças com SD foi possível isolar leveduras do Gênero *Candida* das amostras coletadas, enquanto que no grupo 2 foram isoladas leveduras em apenas 5 crianças (10%), diferença esta estatisticamente significativa ($p<0,0001$) pelo teste do Qui-Quadrado (Figura 5).

FIGURA 5 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* NOS GRUPOS AVALIADOS



FONTE: O autor

Ao total foram isoladas e identificadas 32 amostras de leveduras, sendo 27 isolados de crianças com SD (uma criança deste grupo apresentou colonização por duas espécies diferentes) e 5 de crianças sem SD.

As amostras salivares eram semeadas em SDA e as colônias que apresentavam crescimento e desenvolvimento característico de leveduras do gênero *Candida* (Figura 6a, 6b) eram coradas pela técnica de Gram (Figura 6d, 6e, 6f). Após esta primeira confirmação do isolamento, as colônias presuntivamente identificadas como *Candida* spp. eram submetidas a testes complementares de identificação. Inicialmente era realizada a prova da formação do tubo germinativo (Figura 6c). As espécies que formavam o tubo germinativo eram identificadas presuntivamente como *C. albicans*, enquanto as outras eram consideradas *Candida* não albicans.

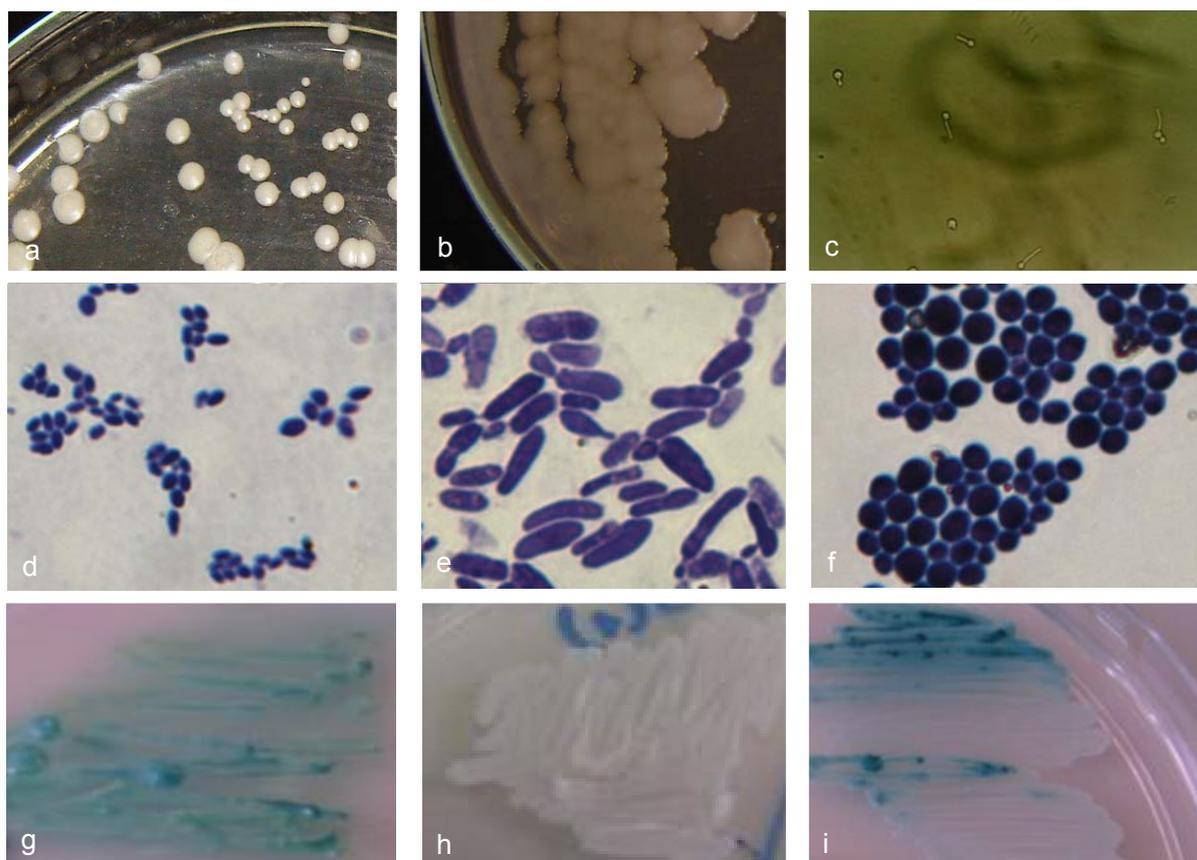
A avaliação do crescimento em Ágar contendo mistura cromogênica (Ágar Hicrome Candida[®]) revelou presuntivamente as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (Figura 6g, 6h, 6i). Este teste apresentou algumas limitações, tais como a identificação de apenas quatro espécies e a semelhança das cores dificultava sua interpretação, indicando assim a necessidade do uso de métodos mais precisos.

Todos os isolados foram submetidas ao Sistema API 20 C AUX[®] (BioMérieux), teste bioquímico que avalia a assimilação de diferentes carboidratos pelas leveduras. Os resultados das leituras realizadas, com a assimilação ou não dos carboidratos pelas leveduras e o resultado do teste, com sua porcentagem de identificação, estão na Tabela 3.

Um isolado não foi identificado (SD3₁), outras obtiveram valores de porcentagem de identificação menores que o estabelecido (entre 97 e 100%) e algumas geraram dúvidas durante a leitura (Tabela 3). Então se fez necessário a utilização de métodos adicionais de identificação. Os isolados SD3₁, SD3₂, SD24, SD22, PC2, PC11, PC32 e PC38 foram submetidas ao microcultivo, visando as suas identificações pela observação das estruturas morfológicas formadas durante o crescimento do fungo (Figura 7a, 7b, 7c).

Dois isolados (PC2 e PC 38) foram ainda submetidas ao teste de assimilação de carboidratos tradicional (auxonograma) e ao teste de assimilação do nitrogênio, para a confirmação da espécie (Figura 7a, 7b, 7c).

FIGURA 6 – CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROFORMOLÓGICAS DE LEVEDURAS DO GENÉRO *Candida*



FONTE: O autor

- a – Macromorfologia de colônias de leveduras *C. albicans*
 b – Macromorfologia de colônias de leveduras *C. krusei*
 c – Formação do tubo germinativo em aumento de 400 X em M.O.
 d – Coloração de Gram em leveduras *C. guilliermondii* (1000 X em M. O.)
 e – Coloração de Gram em leveduras *C. krusei* (1000 X em M. O.)
 f – Coloração de Gram em leveduras *C. albicans* (1000 X em M. O.)
 g, h, i – Aspectos das colônias de leveduras do gênero *Candida* em ágar cromogênico (g - *C. albicans*, h - *C. krusei* e i - *C. tropicalis*)

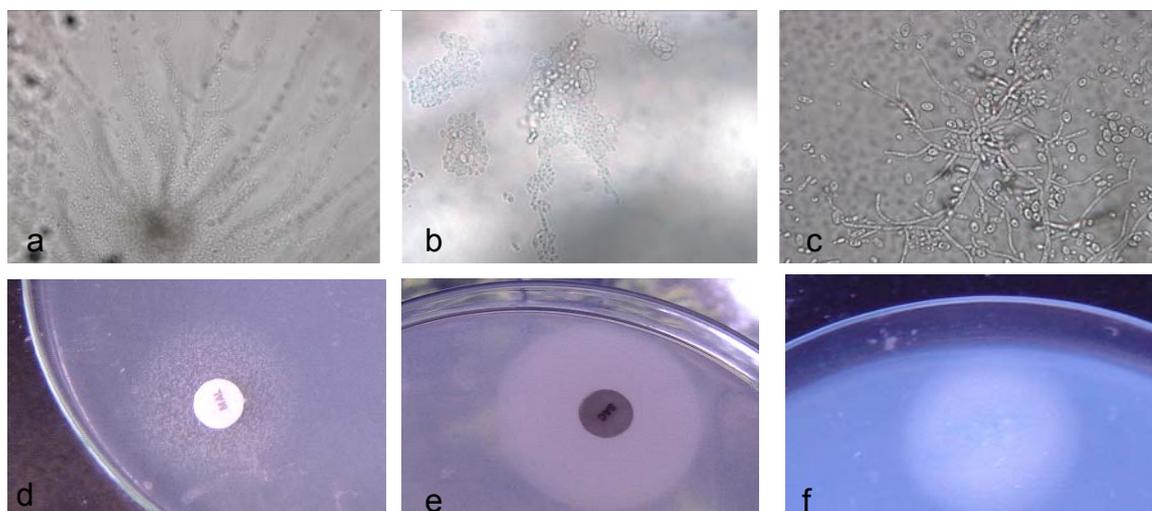
TABELA 3 – ASSIMILAÇÃO DE CARBOIDRATOS PELAS LEVEDURAS ISOLADAS (API 20 C AUX®)

Nomenclatura dos isolados*	D-glucose	Glicerol	Cálcio-2-Cetogluconato	L-arabinose	D-xilose	Adonitol	Xilitol	D-galactose	Inositol	D-sorbitol	Metil- α -D-glucopiranosid	N-acetil-glucosamina	D-celobiose	D-lactose	D-maltose	D-sacarose	D-trealose	D-melezitose	D-rafinose	Tubo germinativo	Identificação	Porcentagem
SD3(1)	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	----- **	----**
SD3(2)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>C. guilliermondi</i>	99,7%
SD5	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>C. famata</i>	99,6%
SD6	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	97,4%
SD11	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	97,4%
SD15	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD17	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD18	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD21	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	<i>C. albicans</i>	98,7%
SD22	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>C. guilliermondi</i>	99,1%
SD24	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	93,9%
SD26	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	<i>C. albicans</i>	99,4%
SD28	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD33	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>C. albicans</i>	97,2%
SD35	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,1%
SD36	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD38	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	<i>C. guilliermondi</i>	99%
SD40	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	<i>C. albicans</i>	97,2%
SD42	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD43	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	97,4%
SD44	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD45	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	97,4%
SD46	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD48	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	98,2%
SD49	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	<i>C. albicans</i>	99,6%
SD51	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	97,4%
SD52	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	99,3%
PC2	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. tropicalis</i>	79,2%
PC11	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	<i>C. parapsilosis</i>	98,9%
PC32	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>C. dubiliniensis</i>	99,9%
PC36	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. albicans</i>	99,2%
PC38	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	<i>C. tropicalis</i>	95,7%

* SD – levedura isolada de paciente com SD, PC – levedura isolada de paciente sem SD

** levedura não identificada pelo método

FIGURA 7 – CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E DE CRESCIMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*



FONTE: O autor

a, b, c – Micromorfologia de leveduras do gênero *Candida* (a - *C. albicans*, b - *C. krusei* e c – *C. parapsilosis*) (400 X em M.O.)

d – Halo indicando a assimilação da maltose
 e – Halo indicando a assimilação da sacarose
 f – Halo indicando a assimilação da peptona

Três isolados foram submetidos à reação de seqüenciamento para verificação da identidade obtida (SD3₁, SD44 e PC32). O isolado SD3₁ não foi identificado pelo sistema API 20 C AUX[®] (BioMérieux), necessitando então de uma confirmação precisa dos achados do microcultivo, que sugeriam a identificação do isolado como *C. krusei*. O isolado PC32 foi identificado como *C. dubliniensis* (99%) pela utilização do sistema API 20 C AUX[®] (BioMérieux). Porém, a baixa freqüência de isolamento desta espécie da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (SULLIVAN et al., 2004; MIRHENDI et al., 2005) além da sua semelhança morfológica e fenotípica com a espécie *C. albicans* (SULLIVAN et al., 1995; KHAN et al., 2004; MOSCA et al., 2005), sugeria outros métodos de confirmação para a identificação. Sendo assim seqüências da região ITS dos isolados SD3₁, SD44 e PC32 foram utilizadas como suporte para esta identificação. As seqüências obtidas foram comparadas a seqüências depositadas no *GenBank* pelo programa BLAST e os resultados mostraram 100% de analogia entre a seqüência do isolado PC32 com seqüência de *C. dubliniensis* depositada no *GenBank* (Apêndice 4), 99% de analogia

entre a amostra SD44 e seqüência de *C. albicans* (Apêndice 5) e 99% de analogia entre a amostra SD3₁ e seqüência de *Issatchenkia orientalis*, forma telomórfica de *C. Krusei* (Apêndice 6).

A espécie *C. dubliniensis* foi identificada e descrita pela primeira vez por SULLIVAN et al. em 1995, sendo inicialmente recuperada da cavidade bucal de pacientes infectados pelo vírus HIV.

C. dubliniensis é considerada como patógeno emergente, associada principalmente à colonização e à infecção da cavidade bucal de pacientes infectados pelo vírus HIV (SULLIVAN et al., 1995; VARGAS e JOLY, 2002; KHAN et al., 2004; MOSCA et al., 2005), porém já foi recuperada com menor freqüência de outros sítios anatômicos, de indivíduos saudáveis e em casos de infecção sistêmica (SILVA et al., 2003; MOSCA et al., 2005; CHAVASCO et al., 2006).

Existem semelhanças morfológicas e fenotípicas entre as espécies *C. dubliniensis* e *C. albicans*, sendo que as duas formam tubo germinativo e produzem clamidósporos. Sendo assim a identificação precisa destas duas espécies é importante do ponto de vista epidemiológico e no tratamento de pacientes infectados (SULLIVAN et al., 1999; MARTINEZ et al., 2002; KHAN et al., 2004; MOSCA et al., 2005).

Baseado nas características das leveduras isoladas e pelos resultados obtidos por meio dos diferentes métodos de identificação utilizados, foi possível identificar todas as 32 amostras isoladas. A distribuição das espécies encontradas em cada grupo (crianças com e sem SD) está representada na Tabela 4.

TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Crianças com SD			Crianças sem SD		
Pacientes	Nomenclatura dos Isolados†	Identificação dos isolados	Pacientes	Nomenclaturas dos Isolados**	Identificação dos isolados
1		SC	1		SC
2			2	PC 2	<i>C.albicans</i>
3	SD 3 ₁	<i>C. Krusei</i> + <i>C. guilliermondii</i>	3		SC
	SD 3 ₂				
4		SC	4		SC
5	SD 5	<i>C. famata</i>	5		SC
6	SD 6	<i>C.albicans</i>	6		SC
7			7		SC
9			9		SC
10			10		SC
11	SD 11	<i>C.albicans</i>	11	PC 11	<i>C. parapsilosis</i>
12		SC	12		SC
13		SC	13		SC
14		SC	14		SC
15	SD 15	<i>C.albicans</i>	15		SC
16		SC	16		SC
17	SD 17	<i>C.albicans</i>	17		SC
18	SD 18	<i>C.albicans</i>	18		SC
19		SC	19		SC
20		SC	20		SC
21	SD 21	<i>C.albicans</i>	21		SC
22	SD 22	<i>C.guilliermondii</i>	22		SC
23		SC	23		SC
24	SD 24	<i>C.albicans</i>	24		SC
25		SC	25		SC
26	SD 26	<i>C.albicans</i>	26		SC
27		SC	27		SC
28	SD 28	<i>C.albicans</i>	28		SC
29		SC	29		SC
30		SC	30		SC
31		SC	31		SC
32		SC	32	PC 32	<i>C. dubliniensis</i>
33	SD 33	<i>C.albicans</i>	33		SC
34		SC	34		SC
35	SD 35	<i>C.albicans</i>	35		SC
36	SD 36	<i>C.albicans</i>	36	PC 36	<i>C.albicans</i>
37		SC	37		SC
38	SD 38	<i>C.guilliermondii</i>	38	PC 38	<i>C.tropicalis</i>
39		SC	39		SC
40	SD 40	<i>C.albicans</i>	40		SC
41		SC	41		SC
42	SD 42	<i>C.albicans</i>	42		SC
43	SD 43	<i>C.albicans</i>	43		SC
44	SD 44	<i>C.albicans</i>	44		SC
45	SD 45	<i>C.albicans</i>	45		SC
46	SD 46	<i>C.albicans</i>	46		SC
47		SC	47		SC
48	SD 48	<i>C.albicans</i>	48		SC
49	SD 49	<i>C.albicans</i>	49		SC
50		SC	50		SC
51	SD 51	<i>C.albicans</i>	51		SC
52	SD 52	<i>C.albicans</i>			

* amostras de leveduras isoladas de pacientes com Síndrome de Down (SD); **amostras de leveduras isoladas de pacientes sem Síndrome de Down (PC); SC: sem crescimento de leveduras.

Entre as 27 amostras de leveduras isoladas no grupo de crianças com SD, 22 (81,5%) eram da espécie *C. albicans*. Comparando as diferentes frequências entre a *C. albicans* e as outras espécies isoladas do grupo 1, foi verificada uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,011$). Além disso, foram isoladas neste grupo leveduras de *C. guilliermondii* (11,11%), *C. famata* e *C. krusei*. No grupo 2, verificou-se as leveduras: *C. albicans* (40%), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. (Tabela 5).

TABELA 5 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* NOS GRUPOS ESTUDADOS

<i>Candida</i> spp.	Crianças com SD		Crianças sem SD		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Ausência	25	49,0	45	90,0	70	69,3
Presença	26	51,0	05	10,0	31	30,7
• <i>C. albicans</i>	22	81,5	02	40,0	24	75
• <i>C. dubliniensis</i>	-	-	01	20,0	01	3,12
• <i>C. famata</i>	01	3,7	-	-	01	3,12
• <i>C. guilliermondii</i>	03	11,11	-	-	03	9,37
• <i>C. parapsilosis</i>	-	-	01	20,0	01	3,12
• <i>C. tropicalis</i>	-	-	01	20,0	01	3,12
• <i>C. krusei</i>	01	3,7	-	-	01	3,12
TOTAL	51	100,0	50	100,0	101	100,0

Total (independente do grupo) → $p < 0,0001$ (Proporções).

Crianças com SD 1 x Crianças sem SD (ausência x presença) → $p < 0,0001$ (Qui-Quadrado).

Espécie (*C. albicans* x Outra espécie) → $p = 0,011$ (Fisher).

Os resultados aqui encontrados assemelham-se aos obtidos em outros estudos, mostrando sempre uma diferença significativa na ocorrência de *Candida* spp. entre crianças com e sem SD. CARLSTEDT et al. (1995), SCULLY (2002), RIBEIRO et al (2002) e VIEIRA et al (2005) apresentaram resultados semelhantes com a frequência de isolamento de leveduras do gênero *Candida* variando entre 69% a 84,6% nas crianças com SD e 6% a 35% nos grupos controles, sendo *C. albicans* a espécie mais comumente isolada (cerca de 80%). CARLSTEDT et al. (1995) também verificaram que a densidade de colônias isoladas (UFC) também era significativamente maior no grupo com SD ($p < 0.001$). No presente estudo não foi quantificado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), pois a mesma é feita multiplicando-se o número de colônias isoladas pelo fator de diluição. O uso de swabs impossibilita padronizar a quantidade de saliva a ser diluída, sendo assim não foi possível analisar este aspecto.

A freqüência de isolamento de leveduras no grupo de crianças sem SD foi de 10% estando de acordo com os resultados encontrados por DARWAZEH e AL-BASHIR (1995), AKDENIZ et al (2002) e KADIR (2004), com 5 a 48%. A espécie mais freqüente no grupo de crianças sem SD também foi a *C. albicans*, com 40%. Outros estudos realizados com crianças sem SD também apontam a *C. albicans* como a espécie mais freqüentemente isolada, com porcentagens de isolamento variando entre 44 e 67% (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; ZÖLLNER e JORGE, 2003; SCHERMA et al., 2004; KADIR et al., 2005). A prevalência da espécie *C. albicans* pode ser explicada pelo fato do tubo germinativo, característico desta espécie, ter maior poder de adesão às células epiteliais e aos elementos da placa bacteriana (ODDS, 1988; SIDRIM, 1999). Estas características da espécie sugerem vantagem no momento de colonização do sitio anatômico.

Além da espécie *C. albicans*, outras espécies também foram isoladas nos dois grupos avaliados (Tabela 5). Nas crianças com SD a segunda maior ocorrência foi de leveduras da espécie *C. guilliermondii*, com três amostras isoladas. Foram ainda encontradas *C. krusei* e *C. famata*, que somadas representaram 18,5% dos isolados. CARLSTEDT et al. (1996) também verificou o isolamento de espécies diferentes de *C. albicans* em crianças com SD, encontrando isolados de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis*, sendo que as mesmas somavam 7,3% dos isolados.

Nas crianças sem SD foram encontradas no presente trabalho, além da *C. albicans*, leveduras das espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*, com uma amostra isolada de cada uma. DARWAZEH e AL-BASHIR (1995), ZÖLLNER e JORGE (2003), SCHERMA et al. (2004) e KADIR et al. (2005) encontraram em crianças sem SD, isolados de *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. cerevisae*, sendo que a soma destas amostras representavam entre 33 e 56%. Estes resultados mostram que apesar da *C. albicans* ser a espécie mais prevalente na cavidade bucal, outras espécies deste gênero também são colonizadoras deste sitio anatômico.

A maior freqüência de colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida* em pacientes com SD pode ser explicada por diferentes hipóteses. A primeira seria de que as alterações do sistema estomatognático causados pela cromossopatia facilitam a colonização por estes microrganismos. A má postura de língua e maior ocorrência de língua fissurada e geográfica podem representar sítios

de colonização mais propícios para a levedura, visto que características anatômicas normalmente encontradas dorso da língua (papilas filiformes, forame cego e fissura mediana) já atuam como sítios que favorecem o desenvolvimento do microrganismo (ARENDORF e WALKER, 1980). Os lábios geralmente entreabertos e sujeitos a ação da saliva devido a protrusão da língua e respiração bucal predispõem a ocorrência de lesões e fissuras labiais, o que por sua vez facilita a instalação de processos infecciosos associada às leveduras do gênero *Candida* (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001; SCULLY et al., 2002). Os pacientes com SD podem também apresentar uma diminuição do fluxo salivar devido ao hábito da respiração bucal (YARAT et al., 1999; SIQUEIRA et al., 2005). Além disso, a composição salivar pode estar alterada (SIQUEIRA et al., 2005; YARAT, 1999; JARA et al., 1991). Sabe-se que a saliva é considerada o primeiro agente de defesa na cavidade bucal por ter em sua composição diferentes fatores antimicrobianos, como anticorpos (IgA) e enzimas (CHALLACOMBE, 1994; EDDGERTON, 1998; ROSS e HERZBERG, 2001). No caso de colonização da cavidade bucal a saliva atua impedindo a aderência da levedura ao epitélio, tanto por sua ação mecânica, como pela produção de IgA, que se liga a superfície do microrganismo, impedindo sua adesão (COOGAN, SWEET e CHALLACOMBE; 1994).

Apesar dos fatores locais citados acima poderem influenciar, a explicação mais aceita para justificar a maior colonização por *Candida* da cavidade bucal de crianças com SD reside no fato das mesmas serem imunocomprometidas (CARLSTEDT et al, 1995; RIBEIRO et al., 2002; VIEIRA et al, 2005). Diferentes estudos realizados mostram anormalidades no sistema imune destes pacientes. De um modo geral, as crianças com SD apresentam infecções recorrentes, principalmente do trato respiratório superior (TRINCADO et al., 1988; CARLSEDT et al. 1996; RIBEIRO et al., 2003). Alguns estudos avaliaram a capacidade de adesão, quimiotaxia e fagocitose dos neutrófilos em pacientes com SD e os resultados mostraram que estas funções estão diminuídas nos pacientes com SD (TRINCADO et al., 1988; IZUMI et al. 1989; SREEDEVI e MUNSHI, 1998; ZALDIVAR-CHIAPA et al., 2005). Funções reduzidas das células NK, deficiências de anticorpos, baixa contagem de linfócitos T e B e deficiências na ativação das células T também foram relatadas nestes pacientes (SCOTESSE et al., 1998; RIBEIRO et al., 2003; HINGH et al., 2005).

Em indivíduos imunocompetentes a resposta imune celular e humoral são suficientes para controlar a colonização e prevenir infecções pela *Candida*. Apesar de não se saber exatamente os mecanismos específicos usados pelo sistema imune contra a *Candida* (REPENTIGNY, LEWANDOWSKI e JOLICOEUR, 2004) alguns estudos desvendaram algumas estratégias. Os antígenos (*Candida*) são apresentados às células T pelas células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células de Langerhans, queratinócitos e células dendríticas). As células T CD4 + auxiliares (Th1 e Th2) passam então a produzir citosinas (interleucinas, interferons e fatores de necrose tumoral) que ajudam a eliminar o agente agressor através da estimulação de outras células, da fagocitose e da quimiotaxia (CANTORNA e BALISH, 1991; NEWMAN e HOLLY, 2001; FARAH et al., 2002). Sendo assim, um baixo número de células de defesa ou falhas na ativação das mesmas pode facilitar a colonização por leveduras do gênero *Candida*, como acontece em pacientes com SD (CARLSTEDT et al., 1995; SCULLY, 2002; RIBEIRO et al., 2002; VIEIRA et al., 2005).

A ocorrência de leveduras isoladas também foi avaliada nas diferentes faixas etárias dos participantes e para isso os dois grupos (1 e 2) foram divididos em subgrupos. O primeiro (subgrupo A) era formado por crianças com idades entre dois meses e 23 meses. O subgrupo B era formado por crianças com idades entre 24 e 47 meses e subgrupo C, por crianças com idades entre 48 e 72 meses. A distribuição entre os subgrupos foi homogênea, sem diferença significativa (Tabela 6).

TABELA 6 – SUBGRUPOS FORMADOS DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

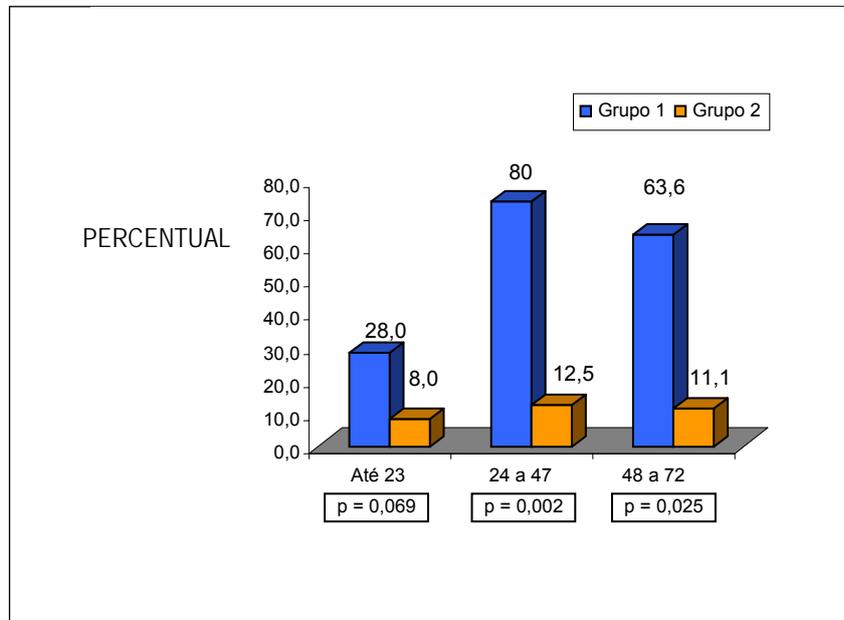
FAIXA ETÁRIA (meses)	Crianças com SD		Crianças sem SD		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Até 23 (A)	25	49,0	25	50,0	50	49,5
24 a 47 (B)	15	29,4	16	32,0	31	30,7
48 a 72 (C)	11	21,6	09	18,0	20	19,8
TOTAL	51	100,0	50	100,0	101	100,0

P = 0,895 (Qui-Quadrado).

A análise estatística mostrou diferença significativa na prevalência de isolamento de leveduras do gênero *Candida* entre os grupos 1 e 2 nas faixas etárias de 24 a 47 meses ($p=0,002$) e de 48 a 72 meses ($p= 0,025$). Na faixa etária de até 23 meses, embora no grupo 1 a prevalência de leveduras isoladas tenha sido de

28% e no grupo 2 de apenas 8%, a diferença não apresentou significância estatística (Figura 8).

FIGURA 8 – FREQUÊNCIA DE LEVEDURAS ISOLADAS NOS SUBGRUPOS



FONTE: O Autor

Também foi comparada a prevalência de isolamento de leveduras do gênero *Candida* entre os subgrupos (A, B e C) de cada grupo (1 e 2) separadamente. Foi constatado que no Grupo 2 o comportamento entre as faixas etárias foi semelhante, sem diferenças significativas. No grupo 1 houve diferença estatisticamente significantes entre os subgrupos A e B (28% e 80%) ($p=0,011$). Quando comparados os subgrupos A e C (28 e 63,6%) houve uma diferença significativa ($p=0,050$), com a probabilidade considerada limítrofe. Entre os subgrupos B e C (80 e 63,6%) não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,457$) (Tabela 7).

TABELA 7 – OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* NOS SUBGRUPOS AVALIADOS

FAIXA ETÁRIA / <i>Candida</i> spp.	GRUPO 1		GRUPO 2		TOTAL		VALOR DE p
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Até 23 meses (subgrupo A)	25	49,0	25	50,0	50	49,5	0,069 ⁽¹⁾
• Ausência	18	72,0	23	92,0	41	82,0	
• Presença	07	28,0	02	8,0	09	18,0	
24 a 47 meses (subgrupo 2)	15	29,4	16	32,0	31	30,7	0,002 ⁽²⁾
• Ausência	03	20	14	87,5	17	54,8	
• Presença	12	80	02	12,5	14	45,2	
48 a 72 meses (subgrupo 3)	11	21,6	09	18,0	20	19,8	0,025 ⁽¹⁾
• Ausência	04	36,4	08	88,9	12	60,0	
• Presença	07	63,6	01	11,1	08	40,0	
TOTAL	51	100,0	50	100,0	101	100,0	

(1) Fisher; (2) Qui-Quadrado.

Grupo 1 → Até 23 x 24 a 47 (p=0,011); Até 23 x 48 e mais (p=0,050); 24 a 47 x 48 e mais (p=0,457);

Grupo 2 → Até 23 x 24 a 47 (p=0,512); Até 23 x 48 e mais (p=0,616); 24 a 47 x 48 e mais (p=0,713) (Fisher e Qui-Quadrado).

No Grupo 1, onde foi observado diferença significativa em relação à faixa etária, a espécie predominante no subgrupo B foi a *C. albicans* (Tabela 8). Em razão das sub-amostras, não foi possível realizar a análise estatística destes dados (subgrupos X espécies isoladas).

TABELA 8 – FREQUÊNCIA DE ESPÉCIES DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* NOS SUBGRUPOS AVALIADOS

FAIXA ETÁRIA / ESPÉCIE DE <i>Candida</i>	GRUPO 1		GRUPO 2		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Até 23 meses	07	26,9	02	40,0	09	30,0
• <i>C. albicans</i>	04	57,1	01	50,0	05	55,6
• <i>C. famata</i>	01	14,3	-	-	01	11,1
• <i>C. guilliermondii</i>	01	14,3	-	-	01	11,1
• <i>C. parapsilosis</i>	-	-	01	50,0	01	11,1
• <i>C. krusei</i> + <i>C. guilliermondii</i>	01	14,3			01	11,1
24 a 47 meses	12	46,15	02	40,0	14	43,3
• <i>C. albicans</i>	12	100,0	-	-	12	85,7
• <i>C. dublinense</i>	-	-	01	50,0	01	7,14
• <i>C. tropicalis</i>	-	-	01	50,0	01	7,14
48 a 72 meses	07	26,9	01	20,0	08	26,7
• <i>C. albicans</i>	06	85,7	01	20,0	07	87,5
• <i>C. guilliermondii</i>	01	14,3	-	-	01	12,5
• <i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	-	-
TOTAL	26	100,0	05	100,0	31	100,0

O subgrupo A apresentou a menor frequência no isolamento de leveduras do gênero *Candida* (28 e 8%), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2. As crianças que compunham este grupo tinham idades até 23 meses, ou seja, período de vida em que é comum fazer uso do aleitamento materno. Na literatura os estudos que comparavam crianças sem SD que faziam uso exclusivo de aleitamento materno e crianças que faziam aleitamento do tipo misto ou usavam mamadeiras apresentaram resultados que mostraram uma maior ocorrência no segundo grupo, com diferenças estatisticamente significativas, sendo a *C. albicans* a espécie mais frequente (KADIR et al., 2005; ZÖLLNER e JORGE, 2003). FOTOS e HELLSTEIN (1992), ZÖLLNER e JORGE (2003), SCHERMA et al. (2004) e KADIR et al. (2005) acreditam que o leite materno é um fator de proteção contra as leveduras do gênero *Candida*, pois o mesmo contém fatores de resistência, como a lactoferrina, lisozima, leucócitos e imunoglobulinas, em especial IgA, que inibem a adesão e consequente desenvolvimento destes microrganismos. Porém outros estudos, como o de DARWAZEH e AL-BASHIR (1995) mostraram ocorrência semelhante entre os dois grupos (40 a 46,8%), não representando diferença estatisticamente significativa.

O menor número de dentes na cavidade bucal das crianças desta faixa etária (0 a 23 meses) pode dificultar a colonização por leveduras do gênero *Candida*, já que possíveis nichos de adesão destes microrganismos estão diminuídos. Crianças com SD apresentam um atraso na erupção dos dentes quando comparadas às crianças sem a síndrome. GARCIA e AVILA (2003) mostraram que crianças com SD não apresentam elementos dentários antes de um ano de idade, enquanto que a erupção dos dentes decíduos em crianças sem SD tem início perto dos seis meses de idade. Mesmo com o atraso na erupção dentária e a possível diminuição dos nichos de adesão das leveduras, as crianças com SD desta faixa etária apresentaram maior colonização por leveduras do gênero *Candida* quando comparadas às crianças sem SD sugerindo que outros fatores influenciam a colonização bucal destas crianças por *Candida* spp.

O subgrupo B, formado por crianças com idades entre 24 e 47 meses apresentou a maior frequência de isolamento de leveduras do gênero *Candida*, com 80 e 12,5%, respectivamente, mostrando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1 e 2 e quando comparados os subgrupos A e B do grupo 1. Fatores de transição podem ser a causa desta maior ocorrência. Em crianças com Síndrome de Down a

dentição decídua se completa entre os três e quatro anos de idade, com a erupção dos segundos molares decíduos (GARCIA e AVILA, 2003), o que representa novos nichos de colonização pelos microrganismos bucais, incluindo as leveduras (ODDS, 1988).

Esta também é uma fase de transição na dieta das crianças. FRAIZ (1999) afirma que nesta fase de acomodação à dieta familiar, as crianças começam também a experimentar outros produtos, normalmente produtos doces, que culturalmente apresentam significado de afeto. É nesta faixa etária também que as crianças passam a escolher os alimentos e a ingestão de guloseimas e doces aumentam (FRAIZ, 1999). JIN et al. (2004) verificaram que a presença da sacarose facilita a adesão de *C. albicans* ao biofilme existente na cavidade bucal. KADIR et al. (2005) acreditam que o que o açúcar presente na dieta facilita a colonização por *Candida*, pois são metabolizados por bactérias presentes na cavidade bucal, formando ácidos que diminuem o pH e assim favorecem o crescimento das espécies de *Candida*.

Fatores mecânicos, como o uso de chupetas e presença de lesões de cáries cavitadas, facilitam a colonização por leveduras do gênero *Candida*, pois alteram o ambiente bucal criando novos sítios de retenção de biofilme. DARWAZEH e AL-BASHIR (1995) mostraram em seu estudo uma maior frequência de isolamento de leveduras do gênero *Candida* em crianças que faziam uso de chupetas.

AKDENIZ et al. (2002) não acharam diferenças significativas no isolamento de *C. albicans* em relação aos hábitos de dieta, uso de chupeta e mamadeiras e pH salivar. Já a presença de lesões de cárie foi fator importante no isolamento das leveduras. 69,2% das crianças que apresentavam mais de quatro dentes cariados tinham suas cavidades bucais colonizadas por *C. albicans*. Apenas 5% dos pacientes sem cárie eram colonizados pelo microrganismo.

O subgrupo C, formado por crianças com idades entre 48 e 72 meses apresentaram a segunda maior frequência (63,3 e 11,1%). A diferença foi estatisticamente significativa entre os grupos 1 e 2, provavelmente pelas causas já discutidas. Comparando-se os subgrupos A e C do grupo 1 houve diferenças significativas, mas quando comparados os subgrupos B e C as diferenças não foram estatisticamente significativas. Tal fato pode ser explicado pelo fato de que entre estas faixas etárias não há mudanças significativas na cavidade bucal de crianças com SD, já que o início da dentição mista apresenta atrasos nestes pacientes

(GARCIA e AVILA, 2003). Além disso, os hábitos de dieta e higiene bucal instalados em idades precoces tendem a serem mantidos (FRAIZ, 1999).

Os resultados mostraram que a ocorrência de isolamento de leveduras foi diferente nas diferentes faixas etárias entre as crianças com SD, permitindo concluir que a variante idade tem influência na colonização de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal destas crianças. Já as crianças sem SD apresentaram comportamento semelhante nas diferentes faixas etárias (0 a 6 anos). KADIR et al. (2005) avaliaram a ocorrência de *Candida* spp. na cavidade bucal de 300 crianças sem SD com idades entre 0 e 12 anos e formou 3 subgrupos para melhor avaliação dos resultados. O subgrupo 1 era formado por crianças entre 0 e 6 anos, o subgrupo B era formado por crianças entre 6 e 8 anos e o C, por crianças entre 9 e 12 anos. A maior frequência de isolamento de leveduras foi encontrada no subgrupo B (50,8%), seguida pelo subgrupo C (27,9%). O subgrupo A apresentou a menor frequência, com 17%. Os resultados encontrados pelo presente estudo e por KADIR et al. (2005) permitem concluir que em crianças sem SD a faixa etária de 0 a 6 anos apresenta baixa colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*. Alterações na cavidade bucal após os 6 anos, com a transição das fases de dentição mista e dentição permanente são as prováveis causas do aumento da colonização.

A frequência de isolamento das leveduras também foi investigada em relação a variante sexo dos participantes do estudo, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada, ou seja, a prevalência de leveduras do gênero *Candida* independe desta variante (Tabela 9).

TABELA 9 - OCORRÊNCIA DE LEVEDURA DO GÊNERO *Candida* X SEXO DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

<i>Candida</i> spp.	MASCULINO		FEMININO		TOTAL	
	N°	%	N°	%	N°	%
Ausência	38	66,7	33	75,0	71	70,3
Presença	19	33,3	11	25,0	30	29,7
• <i>C. albicans</i>	14	73,7	08	72,7	22	73,4
• <i>C. dubliniensis</i>	-	-	01	9,1	01	3,3
• <i>C. famata</i>	01	5,3	-	-	01	3,3
• <i>C. guilliermondii</i>	03	15,7	-	-	03	10,0
• <i>C. parapsilosis</i>	01	5,3	-	-	01	3,3
• <i>C. tropicalis</i>	-	-	02	18,2	02	6,7
TOTAL	57	100,0	44	100,0	101	100,0

p = 0,491 (Qui-Quadrado).

5.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA

Para análise da variabilidade genética dos isolados de leveduras do gênero *Candida* por meio de marcadores RAPD, foram utilizadas um total de 31 amostras de leveduras isoladas da cavidade bucal de crianças com e sem SD. Uma das amostras de leveduras isoladas (SD 17) estava contaminada com bactérias e, portanto foi excluída da análise. Como referência foram utilizadas quatro linhagens: *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, num total de 35 amostras (Tabela 10).

TABELA 10 – LINHAGENS UTILIZADAS NO ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*, POR MARCADORES RAPD

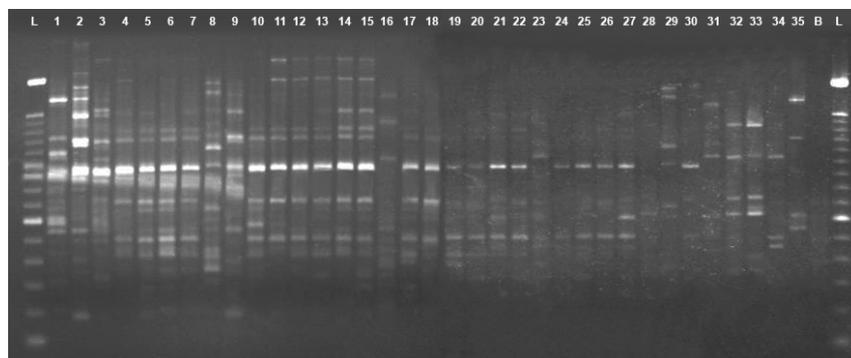
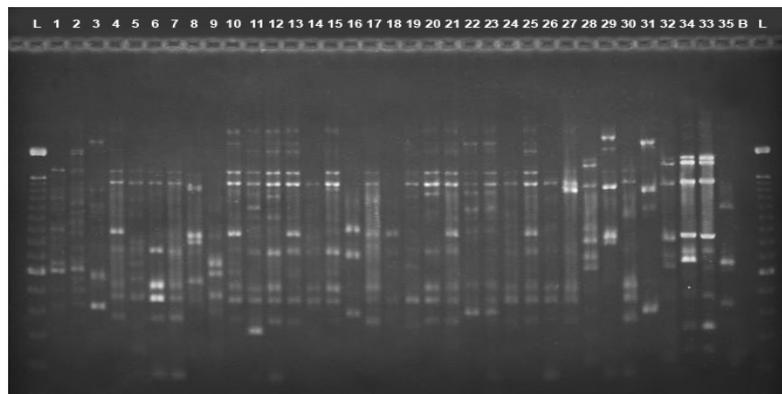
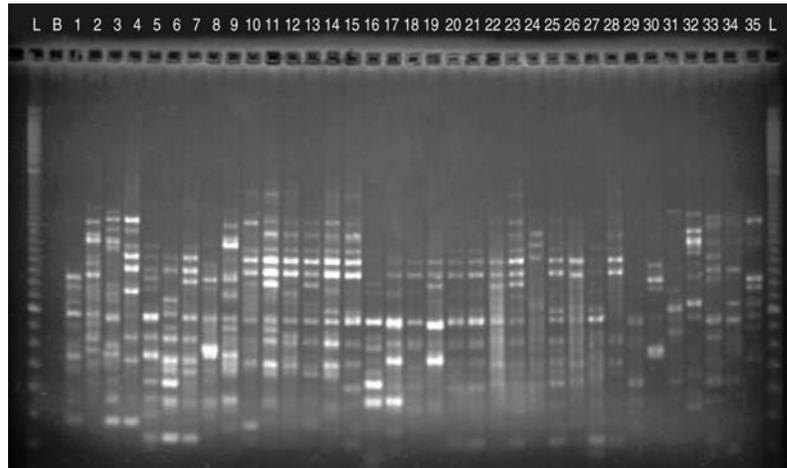
Número	Isolado	Nomenclatura no Estudo*	Origem**	Idade
1	<i>C. krusei</i>	CK - 1	SD 3	14 meses
2	<i>C. guilliermondii</i>	CG - 2	SD 3	14 meses
3	<i>C. famata</i>	CF - 1	SD 5	21 meses
4	<i>C. albicans</i>	CA - 4	SD 6	33 meses
5	<i>C. albicans</i>	CA - 5	SD 11	6 meses
6	<i>C. albicans</i>	CA - 6	SD 15	28 meses
7	<i>C. albicans</i>	CA - 7	SD 18	52 meses
8	<i>C. albicans</i>	CA - 8	SD 21	65 meses
9	<i>C. guilliermondii</i>	CG - 9	SD 22	48 meses
10	<i>C. albicans</i>	CA - 10	SD 24	24 meses
11	<i>C. albicans</i>	CA - 11	SD 26	36 meses
12	<i>C. albicans</i>	CA - 12	SD 28	20 meses
13	<i>C. albicans</i>	CA - 13	SD 33	61 meses
14	<i>C. albicans</i>	CA - 14	SD 35	47 meses
15	<i>C. albicans</i>	CA - 15	SD 36	30 meses
16	<i>C. guilliermondii</i>	CG - 16	SD 38	13 meses
17	<i>C. albicans</i>	CA - 17	SD 40	28 meses
18	<i>C. albicans</i>	CA - 18	SD 42	23 meses
19	<i>C. albicans</i>	CA - 19	SD 43	2 meses
20	<i>C. albicans</i>	CA - 20	SD 44	55 meses
21	<i>C. albicans</i>	CA - 21	SD 45	47 meses
22	<i>C. albicans</i>	CA - 22	SD 46	29 meses
23	<i>C. albicans</i>	CA - 23	SD 48	33 meses
24	<i>C. albicans</i>	CA - 24	SD 49	57 meses
25	<i>C. albicans</i>	CA - 25	SD 51	29 meses
26	<i>C. albicans</i>	CA - 26	SD 52	33 meses
27	<i>C. albicans</i>	CA - 27	PC 2	64 meses
28	<i>C. parapsilosis</i>	CP - 28	PC 11	4 meses
29	<i>C. dubliniensis</i>	CD - 29	PC 32	36 meses
30	<i>C. albicans</i>	CA - 30	PC 36	15 meses
31	<i>C. tropicalis</i>	CT - 31	PC 38	32 meses

*Ck – *C. krusei*, CG – *C. guilliermondii*, CF – *C. famata*, CA – *C. albicans*, CP – *C. parapsilosis*, CD – *C. dubliniensis*, CT – *C. tropicalis*

** SD – Criança com SD, PC – Criança sem SD (paciente controle)

Para a realização deste estudo, foram utilizados seis *primers* (Tabela 2), resultando em um total de 115 marcadores, com pesos variáveis entre 0,3 e 2 kb. Os perfis de amplificação com os *primers* OPX 14, 17 e 19 podem ser verificados na Figura 9.

FIGURA 9 – PERFIL DE AMPLIFICAÇÃO DE RAPD DAS AMOSTRAS DE LEVEDURAS ISOLADAS UTILIZANDO OS *PRIMERS* OPX 14, OPX 17 e OPX 19

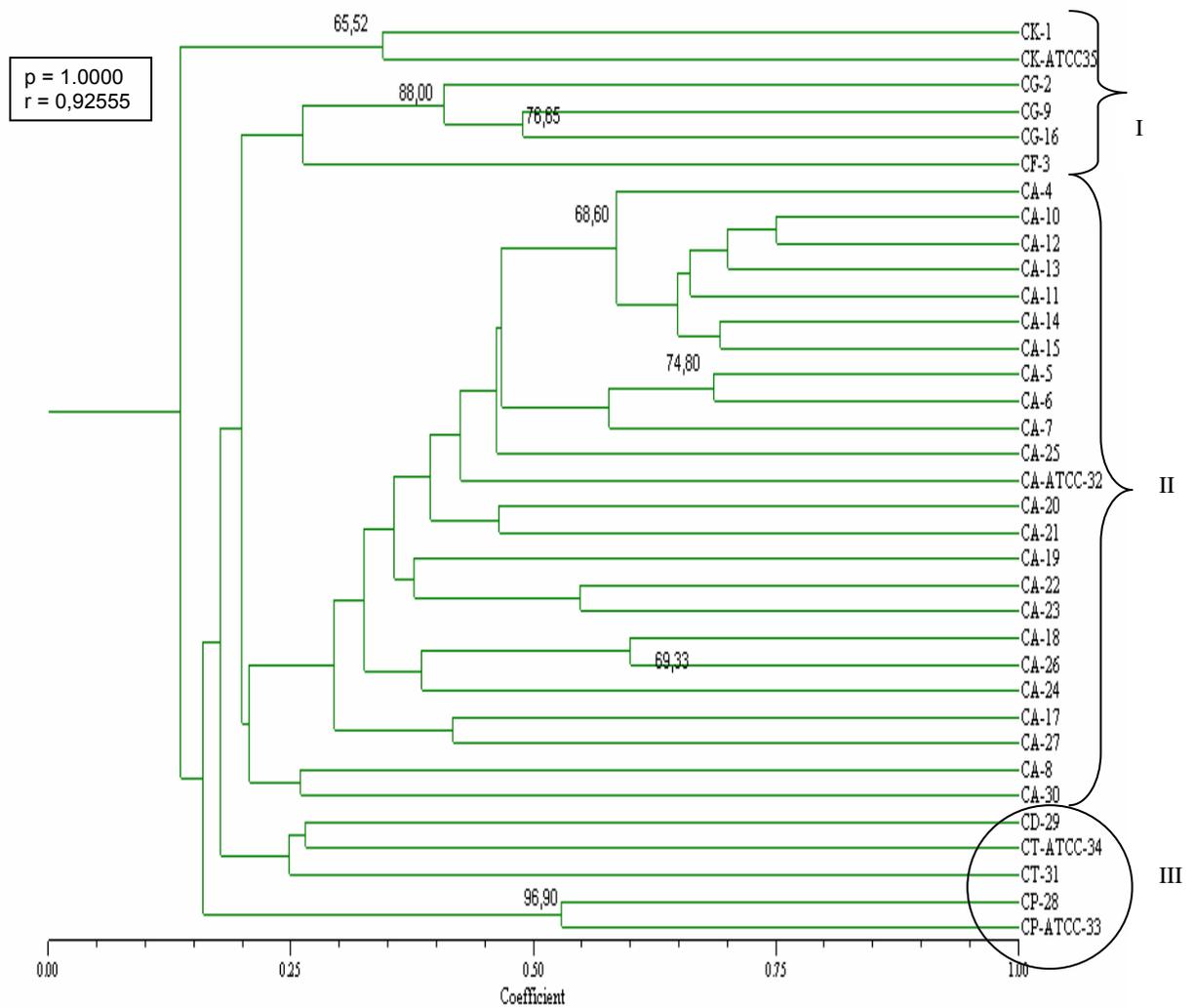


FONTE: O Autor

- a – Perfil de amplificação das amostras com o *primer* OPX 14
- b – Perfil de amplificação das amostras com o *primer* OPX 17
- c – Perfil de amplificação das amostras com o *primer* OPX 19

No dendrograma apresentado na Figura 10 pode se observar a análise dos dados realizada através do programa NTSYSpc 2.1, utilizando o coeficiente de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA.

FIGURA 10 – DENDOGRAMA GERADO A PARTIR DE SIMILARIDADE GENÉTICA OBTIDA POR MARCADORES RAPD DAS LINHAGENS DESCRITAS NA TABELA 12, UTILIZANDO COEFICIENTE DE JACCARD E MÉTODO DE AGRUPAMENTO UPGMA



Legenda: I – agrupamento entre as linhagens de *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. famata*, II – agrupamento entre as linhagens de *C. albicans*, III – agrupamento entre as linhagens de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*

De acordo com o dendrograma, verificaram-se três agrupamentos, separando as diferentes espécies do gênero *Candida*, já anteriormente identificadas

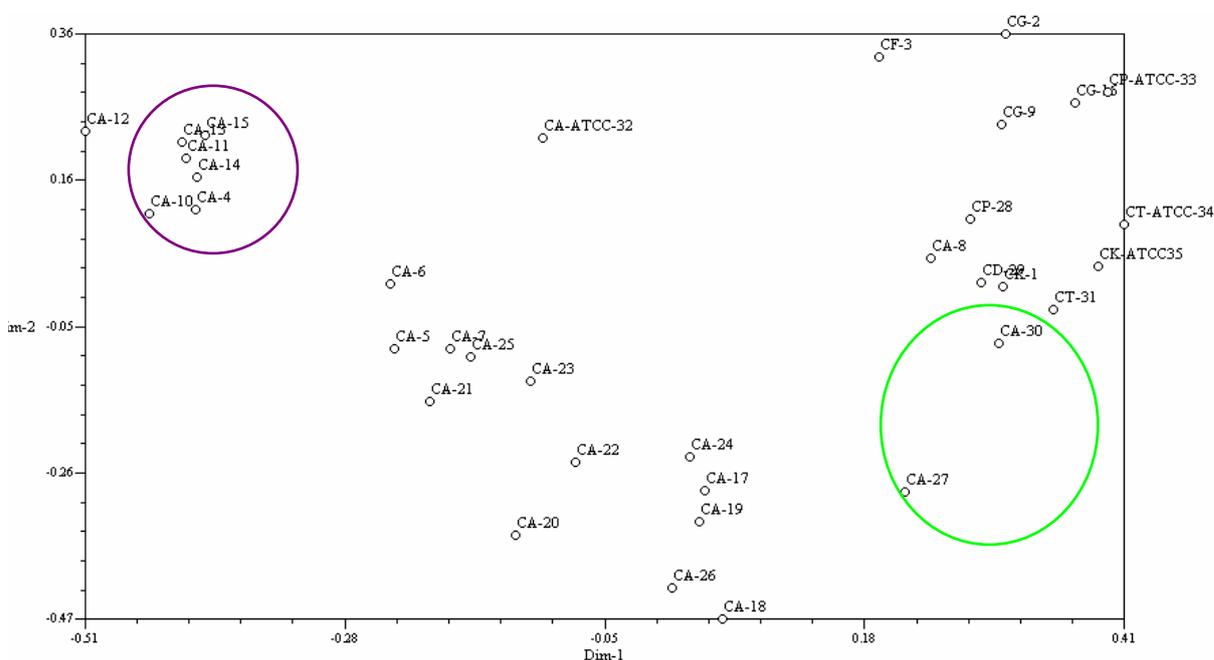
pelas características morfológicas (macro e micromorfologia) (Figuras 6 e 7) e bioquímicas (Tabelas 1 e 3).

O agrupamento (I) reuniu as espécies *C. krusei*, *C. guilliermondii* e a amostra de *C. famata* apresentando três subgrupos. No primeiro subgrupo ficaram a amostra do isolado de *C. krusei* (CK-1) e a linhagem ATCC da mesma espécie, com similaridade de 65% e valor de *bootstrap* de 65,52. Os três isolados identificados como *C. guilliermondii* formavam o segundo subgrupo, onde os isolados CG-9 e CG-16 apresentavam similaridade de 50% entre si, enquanto a linhagem CG-2 apresentava similaridade de 35% em relação a estas. No terceiro subgrupo estava a amostra de levedura da espécie *C. famata* (CF-3) com baixa similaridade em relação aos outros isolados deste grupo.

No agrupamento II observou-se a reunião da maioria dos isolados previamente identificados como *C. albicans*, apresentando diferentes índices de similaridade, variando entre 25 e 75%. A maior parte destas amostras foram isoladas da saliva de pacientes com SD. Nos pacientes controles foram isoladas duas leveduras identificadas como *C. albicans* (CA-27 e CA-30), sendo que estas apresentaram baixos índices de similaridade em relação ao restante das amostras. No gráfico bidimensional (Figura 11) pode-se visualizar melhor a separação observada. Devido ao baixo número de recuperação de *C. albicans* em crianças sem SD, não se pode afirmar que estas leveduras são geneticamente mais distantes em relação aos isolados de pacientes com SD, porém na análise apresentada nas Figuras 10 e 11 pode-se visualizar agrupamentos definidos entre os isolados dos grupos 1 e 2, sugerindo grupos geneticamente separados.

Ainda na Figura 11 foi possível observar a separação das amostras CA-4, CA-10, CA-11, CA-14 e CA-15 de *C. albicans* (sinalizadas em violeta), as quais apresentaram-se agrupadas quanto à sua origem, verificando-se que estas foram isoladas de crianças com SD na faixa etária entre 24 a 47 meses, onde foi observada a maior prevalência de isolamento.

FIGURA 11 – ANÁLISE DA SIMILARIDADE ENTRE AS LEVEDURAS ISOLADAS – GRÁFICO BIDIMENSIONAL



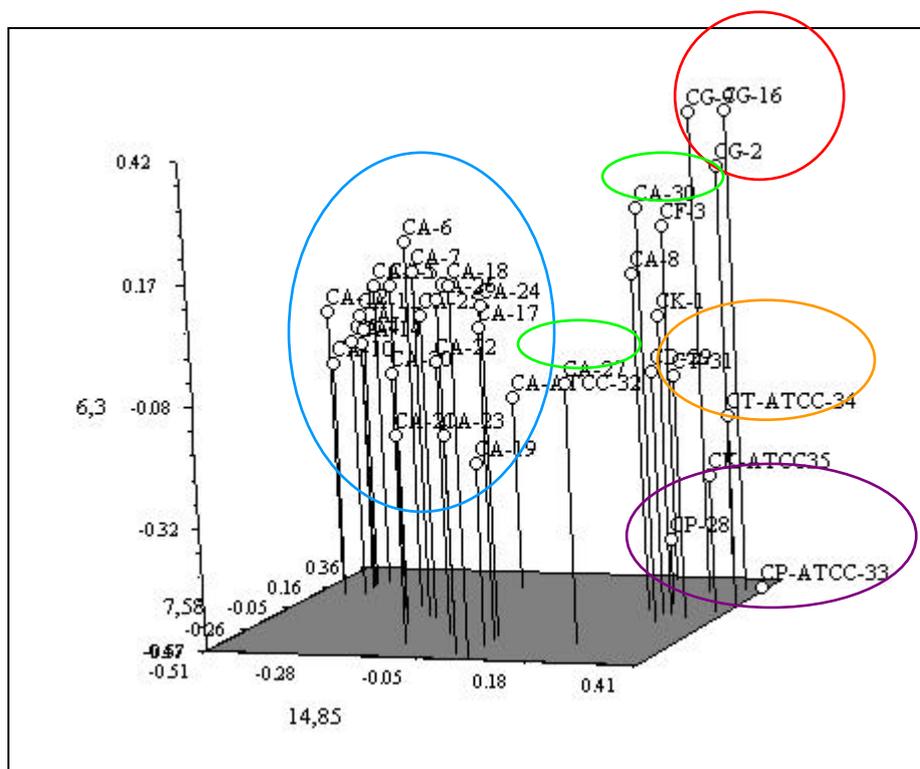
Legenda: Agrupamento sinalizado em verde – isolados de *C. albicans* de crianças sem SD, agrupamento sinalizado em violeta – isolados de *C. albicans* de crianças com SD na faixa etária entre 24 e 47 meses

As linhagens de *C. parapsilosis* (CP-ATCC 33 e CP-28) foram agrupadas no grupo III e mostraram similaridade de cerca de 50% entre si, com valor de *bootstrap* de 96,90, mostrando a confiabilidade deste agrupamento.

Ainda no grupo III foram encontradas as amostras de *C. tropicalis* (CT-ATCC 34 e CT-31) com similaridade pequena entre as amostras. Agrupada a estas estava a amostra CD-29 de *C. dubliniensis*, com baixo índice de similaridade (25%).

Na Figura 12 pode-se observar o gráfico tridimensional obtido com os resultados encontrados, sua análise permite visualizar os agrupamentos formados, identificando melhor os diferentes grupos de isolados.

FIGURA 12 – ANÁLISE DA SIMILARIDADE ENTRE AS LEVEDURAS ISOLADAS – GRÁFICO TRIDIMENSIONAL



Legenda: Agrupamento sinalizado em azul – isolados de *C. albicans* de crianças com SD, amostras sinalizadas em verde – isolados de *C. albicans* de crianças sem SD, agrupamento em vermelho – isolados de *C. guilliermondii* e em laranja – isolados de *C. tropicalis*.

De acordo com a Figura 12, a maioria dos isolados de *C. albicans* foram reunidos em um grupo (sinalizado em azul), enquanto as amostras CA-27 e CA-30 aparecem distantes deste agrupamento, indicando assim a maior similaridade entre os isolados provenientes de crianças com SD.

As linhagens de *C. parapsilosis* estão agrupadas entre si, porém com baixo valor de similaridade (15%) e distantes das amostras de *C. albicans*, o que foi identificado no dendograma (Figura 10).

As amostras de *C. guilliermondii* também ficaram agrupadas (CG-2, CG-9 e CG16) entre si, distantes das amostras de *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, confirmando os achados antes visualizados no dendograma. Da mesma forma para as amostras de *C. krusei*, que se apresentaram agrupadas no dendograma com baixo valor de similaridade, não foi observado um agrupamento definido no gráfico tridimensional.

De um modo geral, pôde-se avaliar pelos dados obtidos que entre as

espécies de *Candida* há uma grande diversidade genética, estando de acordo com os resultados apresentados na literatura (BOSTOCK et al., 1993; DIAZ-GUERRA et al., 1997 e LÓPEZ-RIBOT et al., 2000).

O alto grau de polimorfismo genético da espécie *C. albicans* isoladas da cavidade bucal também foi demonstrada em outros trabalhos utilizando marcadores RAPD. WALTIMO et al. (2001) avaliaram um total de 37 amostras de *C. albicans* isoladas de canais radiculares por meio de testes bioquímicos e verificaram que as amostras apresentavam 14 fenótipos distintos, enquanto que a análise por meio de marcadores RAPD revelou 31 padrões de amplificação diferentes, mostrando o polimorfismo entre isolados da cavidade bucal desta espécie.

GIAMMANCO et al. (2005) ao avaliarem por meio de testes bioquímicos 28 amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de 18 pacientes com HIV (pacientes imunossuprimidos) verificaram que todas as amostras apresentavam o mesmo padrão de assimilação de açúcar, porém a análise por meio de marcadores RAPD mostrou que quase todos os pacientes apresentavam leveduras de perfis genéticos diferentes, mostrando mais uma vez o polimorfismo genético da espécie, associado a um padrão de colonização do hospedeiro.

A imunossupressão inata observada nos pacientes SD pode ser um dos fatores que favorecem a diversidade de colonização e conseqüentemente a variabilidade genética dos isolados. Tais padrões de colonização podem ser justificados por inúmeros fatores, tais como: menor capacidade de quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos, deficiência de anticorpos e baixa contagem de linfócitos (TRINCADO et al., 1988; SCOTESSE et al., 1998; RIBEIRO et al., 2003; ZALDIVAR-CHIAPA et al., 2005; de HINGH et al., 2005).

Alterações anatômicas do complexo buco-crânio-facial, como o menor crescimento da maxila, prognatismo mandibular, lábios entreabertos, mau posicionamento da língua, alta prevalência de língua fissurada, geográfica e lesões labiais e atraso na erupção dentária, com alteração na seqüência de erupção (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001; SCULLY et al. 2002) também podem sugerir a causa desta maior colonização e conseqüente variabilidade genética entre as leveduras isoladas da cavidade bucal, porém mais

estudos devem ser realizados para o melhor entendimento entre a prevalência e o alto polimorfismo genético das leveduras *C. albicans* em pacientes com SD.

Sendo assim, de acordo com estes resultados e em conjunto com os dados relatados na literatura pode-se concluir que a colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida* é alta em pacientes com SD, sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente. Além disso, a variabilidade genética entre as espécies isoladas destes indivíduos também é grande, com a espécie *C. albicans* apresentando o maior grau de polimorfismo genético. A maior prevalência e a maior variabilidade genética das leveduras neste grupo de indivíduos podem ser explicadas pelo fato dos portadores da SD serem imunossuprimidos e apresentarem diferentes alterações na cavidade bucal, justificando a susceptibilidade de colonização por estas leveduras. No entanto, mais estudos devem ser realizados com um maior número de amostragem para a elucidação desta relação.

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada e baseada nos resultados obtidos, conclui-se que:

1. Crianças com SD apresentam uma maior colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida* quando comparadas às crianças sem SD, sendo que a prevalência é maior nas crianças na faixa etária de 24 a 72 meses, independente do sexo, e a espécie mais isolada é a *C. albicans*.
2. Além da *C. albicans*, foram isoladas e identificadas leveduras de *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. famata* entre crianças com SD e *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* entre crianças sem SD, mostrando que outras espécies deste gênero também são colonizadoras da cavidade bucal.
3. A análise feita por marcadores RAPD mostrou uma grande variabilidade genética entre os isolados da mesma espécie e espécies diferentes, sendo a *C. albicans* a levedura mais isolada e que apresenta maior variabilidade.

REFERÊNCIAS

- AKDENIZ, B. G. et al. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. **Journal of Dentistry for Children**, p. 289-292, Sep-Dec. 2002.
- AMANO, A. et al. Periodontopathic bacteria in children with Down syndrome. **Journal Periodontology**, v. 71, n. 2, p. 249-255, Feb. 2000.
- ANSARI, H. H. et al. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 302-308, 2003.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archives of Oral Biology**, v. 25, p. 1-10, 1980.
- AZUL, A. M.; TRANCOSO, P. F. Patologia mais freqüente da mucosa oral. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 22, p. 369-377, 2006.
- BALDANI, M. H.; LOPES, C. M. DA L.; SCHEIDT, W. A. Prevalência de alterações bucais em crianças atendidas nas clínicas de bebês públicas de Ponta Grossa – PR, Brasil. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 302-307, out-dez. 2001.
- BARBIERI, D. de S. V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária**. Curitiba, 2005. 46f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de concentração: Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- BAUTISTA-MUÑOZ, C. et al. Identification of *Candida* spp. By randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 414-420, Jan. 2003.
- BEZERRA, S.; COSTA, I. Oral conditions in children from birth to 5 years: the findings of a children’s dental program. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 25, n. 1, p. 79-81, 2000.
- BOSTOCK, A. et al. Comparison of PCR fingerprinting, by random amplification of polymorphic DNA, with other molecular typing methods for *Candida albicans*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 2179-2184, 1993.
- BRUNONI, D. Aspectos epidemiológicos e genéticos. In: SCHWARTZMAN, J. S. et al. **Síndrome de Down**. São Paulo: Memnon, 1999. p. 32-43.
- CANTORNA, M. T.; BALISH, E. Role of CD4⁺ T lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 7, p. 2447-2455, Jul. 1991.

CARLSTEDT, K. et al. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 6, p. 95-100, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL & PREVENTION (CDC); WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epi-Info, A Word Processing, Database and Statistics Program for Public Health. Version 6.04b**. USA; Geneva, Switzerland, 1997.

CERIKÇIOĞLU, N. et al. The relationships between candidemia and candidal colonization and virulence factors of colonizing strains in preterm infants. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v. 46, p. 245 -250, 2004.

CHAVASCO, J. K. Molecular Identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV- positive and HIV- negative patients in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 21-26, 2006.

COGULU, D. et al. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 1, p. 23-28, Jan. 2006.

COOGAN, M. M.; SWEET, S. P.; CHALLACOMBE, S. J. Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 892-896, Mar. 1994.

DARWAZEH, A. M. G.; AL-BASHIR, A. Oral candidal flora in healthy infants. **Journal of Pathology and Medicine**, v. 24, p. 361-364, 1995.

de HINGH, Y. C. M. et al. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with Down syndrome. **Journal of Paediatrics**, v. 147, p. 744-747, Dec. 2005.

DECONINCK, S. et al. Incidence and management of oral conditions in general practice. **British Journal of General Practice**, v 53, p. 130-132, Feb. 2003.

DIAZ-GUERRA, T. et al. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* with isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 856-861, Apr. 1997.

EDGERTON M. et al. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 32, p. 20438-20447, Aug. 1998.

FARAH, C. S. et al. Primary role for CD4⁺ T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 724-731, Feb. 2002.

FOTOS, P. G.; HELLSTEIN, J. W. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis, and therapeutic management. **Dental Clinics of North America**, v. 36, n. 4, p. 857-878, Oct. 1992.

FRAIZ, F. C. Dieta e cárie na primeira infância. In: WALTER, L. R. F.; FERELLE, A.; ISSAO, M. **Odontologia para o bebê – odontopediatria do nascimento aos 3 anos**. São Paulo: Artes Médicas, 1997. p. 106-122.

GARCIA, S. K. e AVILA S.A. M. Erupção dental de crianças portadoras da síndrome de Down e crianças fenotipicamente normais: estudo comparativo. **Revista de Odontologia de Araçatuba**, v. 24, n. 1, p. 33-39, jan-jul. 2003.

GIAMMANCO, G. M. et al. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 483-490, Aug. 2005.

GLANTZ, S. A. **Primer of Biostatistics - Version 4.0**. – 4^a edição. New York: McGraw Hill, 1997.

GÜNDES, S. G.; GULENC, S.; BINGOL, R. Comparative performance of Fungichrom I, Candifast and API 20C Aux systems in the identification of clinically significant yeasts. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 1105-1110, 2001.

HOLMBERG, K.; FERÖZE, F. Evaluation of an optimized system for random amplified polymorphic DNA (RAPD)-analysis for genotypic mapping of *Candida albicans* strains. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 10, p. 59-69, 1996.

IZUMI, Y. et al. Defective neutrophil chemotaxis in Down's syndrome patients and its relationship to periodontal destruction. **Journal Periodontology**, v. 60, n. 5, p. 238-242, May. 1989.

JARA, L. et al. Composition of the parotid saliva in Chilean children with Down's syndrome. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**, v. 24, n. 1, p. 57-60, 1991.

JIN, Y. et al. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. **Archives of Oral Biology**, v. 49, p. 789-798, 2004.

KADIR, T et al. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 33-37, 2005.

KHAN, Z. U. et al. Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4796-4798, 2004.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. 5^a edição. Rio de Janeiro: MEDSI-Editora Médica e Científica Ltda, 2001.

KONEMAN, E. W.; ROBERTS, G. D. **Practical laboratory mycology**. 3^a edição. Baltimore: Williams and Wilkins, 1985.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, S. R. et al. Dental caries and salivary immunoglobulin A in Down syndrome children. **Journal of Pediatrics and Child Health**, v. 40, n. 9-10, p. 530-533, Sep-Oct. 2004.

LEHMAN, P. F.; LIN, D.; LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, Dec. 1992.

LINOSSIER, A. et al. Relación cuantitativa entre el nivel de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en niños con síndrome de Down. **Medicina Oral**, v. 7, p. 284-292, 2002.

LÓPEZ-RIBOT, J. et al. Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 49-54, 2000.

MARTINEZ, M. et al. Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Oropharyngeal Candidiasis Treated with Fluconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3135-3139, 2002.

MELO, A. S. A. et al. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Mycopathologia**, v. 142, p. 57-66, 1998.

MIRHENDI, H. et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Using a Single-Enzyme PCR- RFLP Method. **Japanese Journal of Infectious Disease**. v. 58, p. 235-237, 2005.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. Curitiba, 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de concentração: Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MORINUSHI, T.; LOPATIN, D. E.; TANAKA, H. The relationship between dental caries in the primary dentition and anti *S. mutans* serum antibodies in children with Down's syndrome. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 19, n. 4, p. 279-284, 1995.

MOSCA, C. O. et al. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en un adolescente con estomatitis protésica. **Medicina Oral, Patología Oral e Cirurgia Bucal**. v. 10, p. 25-31, 2005.

MUSTACCHI, Z.; ROZONE, G. A clínica da síndrome de Down. In: MUSTACCHI, Z.; ROZONE, G. **Síndrome de Down. Aspectos clínicos e odontológicos**. São Paulo: CID Editora, 1990. p. 51-98.

MUSTACCHI, Z.; ROZONE, G. Introdução. In: MUSTACCHI, Z.; ROZONE, G. **Síndrome de Down: Aspectos clínicos e odontológicos**. São Paulo: CID Editora, 1990. p. 18-50.

NEWMAN, S. L.; HOLLY, A. *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6813-6822, Nov. 2001.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, Aug. 1994.

ODDS, F.C. ***Candida* and Candidosis**. 2^a edição. London: Bailliere Tindall, 1988.
OTERO, L. et al. Comparison of seven phenotyping methods for *Candida albicans*. **European Journal of Epidemiology**, v. 11, p. 221-224, 1995.

PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 58-61, Jan. 1996.

PILCHER, E. S. Treating the patient with Down syndrome. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 2, n. 4, p. 58-61, Nov. 2001.

PINTO, P. M. et al. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. Isolates using random amplified polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, Mar. 2004.

POWER, E. G. M. RAPD typing in microbiology – a technical review. **Journal of Hospital Infection**, v. 34, p. 247-265, 1996.

RESENDE, J. C. de P. et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. Isolated from hospitalized patients. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 24-28, 2004.

REULAND-BOSMA, W.; van DIJK, J. Periodontal disease in Down's syndrome. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13, p. 64-73, 1986.

REY, S. C.; BRIMAN, E. G. Odontologia e síndrome de Down. Aspectos cranio-faciais. In: MUSTACCHI, Z.; ROZONE, G. **Síndrome de Down. Aspectos clínicos e odontológicos**. São Paulo: CID Editora, 1990. p. 197-221.

RIBEIRO, E. L. et al. Detecção de *Candida albicans* fosfolipolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. **Acta Médica Portuguesa**, v. 15, p. 171-174, 2002.

RIBEIRO, L. M. A. et al. Evaluation of factors associated with recurrent and/or severe infections in patients with Down's syndrome. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 2, p. 141-148, 2003.

ROBERT, F. et al. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2366-2371, Sep. 1995.

ROSS, K.; HERZBERG, M. C. Calprotectin expression by gingival epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3248-3254, May. 2001.

SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.48, n.1, p.27-36, Feb. 1990.

SANSINFORIANO, M. E. et al. Optimización de las condiciones RAPD-PCR en *Candida* spp. y *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 65-69, 2001.

SCHARDOSIM, L. R.; CHERUBINI, K. Quantificação de *Candida albicans* da cavidade bucal de bebês – revisão de literatura. **Revista Brasileira de patologia Bucal**, v. 3, n. 3, p. 155-158, 2004.

SCHERMA, A. P. et al. Avaliação de fatores predisponentes à candidose bucal em recém-nascidos. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 52-57, jan-mar. 2004.

SCHERMA, A. P. et al. Presença de *Candida* spp. Na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 79-86, jul-set. 2004.

SCHWARTZMAN, J. S. Alterações clínicas. In: SCHWARTZMAN, J. S. et al. **Síndrome de Down**. São Paulo: Memnon, 1999. p. 82-127.

SCOTESE, I. et al. T cell activation efficiency associated with aberrant pattern of protein tyrosine phosphorylation after CD3 perturbation in Down's syndrome. **Pediatric Research**, v. 44, n. 2, p. 252-258, 1998.

SCULLY, C. et al. Down syndrome: lip lesions (angular stomatitis and fissures) and *Candida albicans*. **British journal of Dermatology**, v. 147, p. 37-40, 2002.

SHEPPARD, D. C. et al. Evaluation of the Auxacolor system for biochemical identification of medically important yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 12, p. 3726-3727, Dec. 1998.

SIDRIM, J.J.C. e MOREIRA, J.L.B. Diagnóstico laboratorial das leveduras. In: SIDRIM, J.J.C. e MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.76–89.

SIDRIM, J.J.C. Micoses Oportunistas. In: SIDRIM, J.J.C. e MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.171-183.

SILVA, J. O.; CANDIDO, R. C. Avaliação do sistema API20C AUX na identificação de leveduras de interesse clínico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 261-263, mai-jun. 2005.

SILVA, K. G.; AGUIAR, S. M. Erupção dental de crianças portadoras da síndrome de Down e crianças fenotipicamente normais: estudo comparativo. **Revista de Odontologia de Araçatuba**, v. 24, n. 1, p. 33-39, jan-jul. 2003.

SILVA, V. et al. Prevalencia de serotipos de *Candida albicans* en aislamientos de hemocultivo en Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. **Revista Ibero-americana de Micologia**. v. 20, p. 46-51, 2003.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: Azevedo M. de O. et al. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Editora da Universidade de Brasília, 2003. p. 99-110.

SIQUEIRA, W. L. et al. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2-60 months with Down's syndrome. **Clinical Oral Investigation**, v. 9, n. 1, p. 26-29, Mar. 2005.

SMITH, M. B. et al. Comparative performance of the RadID yeast plus system and the API 20C AUX clinical yeast system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2697-2698, Aug. 1999.

SREEDEVI, H.; MUNSHI, A. K. Neutrophil chemotaxis in Down syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 141-146, 1998.

STABHOLZ A. et al. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. **Special Care in Dentistry**, v. 11, n. 5, p. 203-308, Sep-Oct. 1991.

STEFFAN, P. et al. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2031-2039, Aug. 1997.

SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV- infected individuals. **Microbiology**. v. 141, p. 1507 -1521, 1995.

SULLIVAN, D. J. et al. Comparasion fo epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**. v. 4, p. 369-376, 2004.

TIPPMANN, H. F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. **Briefings in Bioinformatics**. v. 5, n. 1, p. 82-87, 2004.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 3ª edição. São Paulo: Livraria Atheneu editora, 1999.

TRINCADO, M. V. R.; TOLEDANO, F. T., VILLALOBOS, V. S. A study of the functions of polymorphonuclear neutrophil in patients with Down's syndrome. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 16, n. 5, p. 339-345, 1988.

VARGAS, K. G.; JOLY, S. Carriage Frequency, Intensity of Carriage, and Strains of Oral Yeast Species Vary in the Progression to Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 341-350, 2002.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Piracicaba, 2000. 90f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração: Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo.

VIEIRA, J. D. G. et al. *Candida albicans* isolada da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 383-386, set-out. 2005.

WALTIMO, T. M. T. et al. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 106-112, 2001.

YARAT, A. et al. Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 2, p. 115-118, Feb. 1999.

YARED, F.N.F.G. et al. Estomatite cremosa ou "sapinho". Avaliação da influência da limpeza bucal no lactente antes da erupção dentária. **Jornal Brasileiro de Odontopediatria e Odontologia do Bebê**, v. 18, n. 4, p.103-110, 2001.

ZALDIVAR-CHIAPA, R. M. et al. Evaluation of surgical and non-surgical periodontal therapies, and immunological status, of young Down's syndrome patients. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 7, p. 1061-1065, Jul. 2005.

ZÖLLNER, M. S. A. DA C.; JORGE, A. O. C. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mother's mouths and breasts. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, V. 17, n. 2, p. 151-155, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE 1
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa em pacientes cadastrados no Ambulatório de Síndrome de Down, do Hospital de Clínicas, da Universidade Federal do Paraná. O objetivo do trabalho é verificar a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na microbiota bucal das crianças na faixa etária de 0 a 6 anos.

Não existe nenhum risco ao paciente que irá participar da pesquisa. O trabalho consiste na coleta de uma pequena quantidade de saliva do paciente, em entrevista com os responsáveis e por um exame clínico da cavidade oral do paciente. A coleta de saliva será realizada com auxílio de swabs esterilizados.

O profissional responsável pela pesquisa, a dentista Fernanda Bello Costa de Souza, poderá ser encontrada nos telefones (41) 3323-2389 ou (41) 91212041. Caso seja mais conveniente o professor Fabian C. Fraiz, como pesquisador, está autorizado a prestar maiores esclarecimentos e pode ser encontrado no Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná todas as 2as. e 3as. feiras das 13:30 às 17:30.

Estão garantidas todas as informações desejadas ao longo do estudo.

A sua participação é voluntária, sendo possível negar a participação ou retirar o consentimento a qualquer momento. O atendimento no ambulatório de Síndrome de Down do HC não está vinculado à sua participação neste estudo.

Os pacientes, assim como seus responsáveis, que participarem da pesquisa não terão suas identidades reveladas. Os resultados divulgados em relatórios, eventos e/ou publicações científicas serão feitos sob forma codificada, assegurando a confidencialidade dos participantes.

Nenhuma despesa necessária para a realização da pesquisa será de sua responsabilidade.

Nenhuma gratificação sob a forma de dinheiro será recebida pelos participantes deste trabalho.

Eu, _____ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa da qual fui convidado (a) a participar. A explicação que me foi feita compreende as características, benefícios e riscos do estudo. Entendi que posso deixar de participar do trabalho a qualquer momento sem ter que justificar minha decisão. Concordo voluntariamente a participar do estudo.

Assinatura do Responsável

Data: __/__/__

Fernanda Bello Costa de Souza

Data: __/__/__

APÊNDICE 2
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Curitiba, 27 de abril de 2006.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Vânia Ap. Vicente
Dr. Fabiano C. Fraiz
Dra. Fernanda Bello Costa de Souza
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "OCORRENCIA E PERFIL GENÉTICO DE CANDIDA SP EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de abril de 2006. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0034.0.208.000-06
Registro CEP: 1192.040/2006-04

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 27 de outubro de 2006.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

APÊNDICE 3
FICHA DE ANAMNESE E EXAME CLÍNICO

Questionário de Anamnese

1. Identificação

Nome da criança: _____

No. do prontuário: _____

Data de nascimento: _____ data do exame: _____

Nome da mãe ou responsável: _____

Telefone para contato: _____

Endereço: _____

2. Saúde geral

Como esta a saúde de seu filho no dia de hoje? _____

Seu filho está fazendo uso de algum medicamento no dia de hoje? _____

Seu filho já teve “sapinho”? () sim () não Quantas vezes? _____ Idade: _____

3. Observações:

APÊNDICE 4
SEQÜÊNCIA CONSENSO - ISOLADO PC32

APÊNDICE 5
SEQÜÊNCIA CONSENSO - ISOLADO SD44

Candida albicans internal transcribed spacer 1 (ITS1); 5.8S ribosomal RNA; internal transcribed spacer 2 (ITS2) Length=4025

Score = 1061 bits (574), Expect = 0.0, Identities = 584/588 (99%), Gaps = 4/588 (0%) Strand=Plus/Plus

```

GATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTCTTTGAAACAAACTTGCTTT
|||||
GATCATTACTGATTTGCTTAATTGCACCACATGTGTTTTTCTTTGAAACAAACTTGCTTT

GGCGGTGGGCCAGCCTGCCGCCAGAGGTCTAAACTTACAACCAATTTTTTATCAACTTG
|||||
GGCGGTGGGCCAG-CTGCCGCCAGAGGTCTAAACTTACAACCAATTTTTTATCAACTTG

TCACACCAGATTATTACTAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT
|||||
TCACACCAGATTATTACTAATAGTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAT

CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATC
|||||
CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATATTCGTGAATCATC

GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTC
|||||
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGA-GGCATGCCTGTTTGAGCGTC

GTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTGAGCAATACGACTTGGGTTTGCTTGAAA-
|||||
GTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGGTGTGAGCAATACGACTTGGGTTTGCTTGAAAA

GACGGTAGTGTTAAGGCGGGATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCTAACCAAAAACATTGC
|||||
G-CGGTAGTGTTAAGGCGGGATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCTAACCAAAAACATTGC

```

APÊNDICE 6
SEQÜÊNCIA CONSENSO - ISOLADO SD3₁

ANEXO 1

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERÍODICO “BRAZILIAN JOURNAL OF
MICROBIOLOGY”**

GENETIC DIVERSITY AMONG *Candida* spp. ISOLATES FROM THE ORAL CAVITY OF CHILDREN WITH DOWN'S SYNDROME

Fernanda Bello Costa de Souza¹

Fabian Calixto Fraiz²

Rosângela Lameira Pinheiro³

Mônica Moreira¹

Vânia Aparecida Vicente^{1*}

¹ Curso de pós – graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, ²Departamento de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná, ³Laboratório de Micologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Corresponding author: Programa de Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas; Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná UFPR; Jardim das Américas, CEP 81531-990, Curitiba, Paraná Brasil. e-mail: vicente@ufpr.br, fone: 0051-2141-33611704, fax: 0051-02141-32662042

ABSTRACT

Children with Down's syndrome are more predisposed to have *Candida* yeasts, especially *C. albicans*, in their oral cavity, probably due to anatomic changes and an immunologic deficit. The aim of this study was to verify the presence of *Candida* yeasts in the saliva of children with and without Down's syndrome and their genetic variability, using the RAPD technique. Fifty –one children with Down's syndrome and 50 children without the syndrome, all aged between 0 and six years, were included in the study. The saliva samples were applied to Sabouraud's dextrose agar and incubated for 48 hours at 30°C. *Candida* yeasts were identified using the gem-tube test and carbohydrates assimilation test (API

20 C AUX). A total of 31 isolates of genus *Candida* were identified, with *C. albicans* being the most frequently. Total DNA extraction was carried out using the CTAB buffer and associated sonication. RAPD reactions used the OPA 10, OPX 11, OPX 12, OPX 14, OPX 17 and OPX 19 primers. The Jaccard similarity index was used to construct a pairwise similarity matrix, which was used to perform hierarchical cluster analyses based upon the unweighted pairgroup method with arithmetic mean (UPGMA) using NTSYS software. The results of the present study showed a high prevalence of oral candidal carriage in children with DS and *C. albicans* was the most isolated yeast. The RAPD markers showed a higher degree of variability between the species, especially within the species *C. albicans*.

KEY WORDS

Down's syndrome, *Candida*, *Candida albicans*, RAPD.

VARIABILIDADE GENÉTICA DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida* ISOLADAS DA CAVIDADE BUCAL DE CRIANÇAS COM SÍNDROME DE DOWN

RESUMO

Crianças com Síndrome de Down apresentam alterações anatômicas e comprometimento da imunidade, tornando-as mais predispostas à colonização por leveduras do gênero *Candida*. Este estudo buscou verificar a ocorrência e a variabilidade genética, por meio de marcadores RAPD, de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças com e sem Síndrome de Down. Foram coletadas amostras salivares da cavidade bucal de 51 crianças com Síndrome de Down e de 50 crianças sem a síndrome, com idades entre 0 e 6 anos. As amostras foram semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 30°C por 48 horas. Para a identificação das leveduras foram usados as provas de formação do tubo germinativo e o método comercial API 20 C AUX (BioMérieux). Ao total foram isoladas e identificadas 31 amostras de leveduras do gênero *Candida*, sendo a maioria de *C. albicans*. A extração do DNA das leveduras foi realizada com o uso de CTAB e ultra-som associados. Para o RAPD foram

utilizados os *primers* OPA 10, OPX 11, 12, 14,17 e 19. As bandas foram analisadas com o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA foi utilizado para a construção dos dendrogramas pelo programa NTSYS. Os resultados demonstraram que houve isolamento de leveduras do gênero *Candida* em 51% das crianças com Síndrome de Down e em 10% das crianças sem a síndrome. Tais achados permitiram concluir que crianças com Síndrome de Down apresentam uma alta frequência de colonização por *Candida* spp. quando comparadas com crianças sem a síndrome. A análise feita por meio dos marcadores RAPD mostrou uma alta variabilidade genética existente entre as espécies de *Candida*, sendo que o maior grau de polimorfismo genético foi encontrado entre as amostras de *C. albicans*.

PALAVRAS – CHAVE

Síndrome de Down; *Candida*; *Candida albicans*; RAPD.

INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* têm sido isoladas com maior frequência da cavidade bucal de crianças com Síndrome de Down (SD) quando comparadas a crianças sem a Síndrome. Alterações anátomo-fisiológicas existentes na cavidade bucal dos portadores da SD, dificuldade motora, infecções respiratórias recorrentes, alterações na resposta imunológica e maior prevalência de doença periodontal estão entre as possíveis causas citadas por diferentes autores. (CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; RIBEIRO et al., 2002; VIEIRA et al., 2005).

O sistema imune em pacientes com Síndrome de Down apresenta diferentes anormalidades, como menor capacidade de quimiotaxia e fagocitose dos neutrófilos, deficiência na ativação das células T, deficiência de anticorpos, baixa contagem de linfócitos T CD4⁺, funções de células NK reduzidas, diminuição na expansão dos linfócitos T e B e alterações no timo (de tamanho menor e com variações histológicas), que podem alterar o processo de maturação dos linfócitos T (‘TRINCADO et al., 1988; SCOTESSE et al., 1998; RIBEIRO et al., 2003; ZALDIVAR-CHIAPA et al., 2005; de HINGH et al., 2005).

O sistema estomatognático nos portadores da síndrome também apresenta anormalidades em diferentes aspectos. As anormalidades envolvem alterações no complexo crânio – facial, com desenvolvimento menor em alguns ossos, mau posicionamento da língua e maior prevalência de alterações como língua fissurada e geográfica e hipotonicidade dos músculos orbiculares, deixando os lábios entreabertos e sujeitos a fissuras, especialmente nas comissuras labiais (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001; SCULLY et al. 2002). Além disso, o fluxo e a composição da saliva podem estar alterados (JARA et al. 1991; COGULU et al. 2006; YARAT et al. 1999; SIQUEIRA et al. 2005). As anomalias dentárias também são freqüentes, com atraso na erupção dos dentes, alterações na seqüência de erupção e na morfologia dos elementos dentários (REY e BIRMAN, 1990; SCHWARTZMAN, 1999; PILCHER, 2001). Algumas alterações na microbiota bucal são verificadas. As crianças portadoras da Síndrome apresentam uma maior colonização por bactérias potencialmente causadoras da doença periodontal, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (STABHOLZ, 1991). Porém, é relatado para estes hospedeiros uma menor freqüência de colonização por *S. mutans*, principal agente etiológico da cárie (SREEDEVI e MUNSHI, 1998).

As leveduras do gênero *Candida* são consideradas microrganismos comensais, participando da microbiota normal de diferentes sítios incluindo cavidade bucal, tubo digestório, intestino, orofaringe, trato urogenital e pele (ODDS, 1994). A prevalência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças e adultos jovens saudáveis pode variar de 5 a 70%, sendo que cerca de 80% dos isolados são de *C. albicans*. (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; AKDENIZ et al., 2002; KADIR et al, 2005). Quando há desequilíbrio entre o binômio parasito/hospedeiro as leveduras têm seu potencial de proliferação aumentado, passando da forma comensal para a forma parasitária, podendo causar danos ao hospedeiro (FOTOS e HELLSTEIN, 1992; SIDRIN e MOREIRA, 1999). Uma gama de fatores locais e/ou sistêmicos podem facilitar este desequilíbrio e favorecer a instalação dos processos infecciosos causados pelas leveduras do gênero *Candida*, entre eles destacam-se os quadros de imunodeficiências, deficiências nutricionais, presença de tumores malignos, xerostomia,

mucosites, uso de próteses, dieta, alterações endócrinas e uso de determinados medicamentos (ODDS, 1994; FOTOS e HELLSTEIN, 1992).

Marcadores morfológicos e bioquímicos são frequentemente utilizados na identificação das espécies do gênero *Candida*. Tais marcadores porém, apresentam algumas limitações na discriminação entre espécies e variedades (OTERO et al., 1995; RESENDE et al., 2004). Os marcadores moleculares representam ferramentas adicionais possibilitando uma taxonomia mais efetiva além de fornecer dados precisos para estudos epidemiológicos e diversidade genética (LEHMANN, LIN e LASKER, 1992; ROBERT et al., 1995; WALTIMO et al., 2001; ANSARI et al., 2003; BAUTISTA-MUÑOZ et al., 2003; PINTO et al., 2004).

O presente estudo visou investigar a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de crianças com Síndrome de Down em relação a crianças sem a síndrome e comparar variabilidade genética dos isolados por meio de marcadores RAPD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento das leveduras do gênero *Candida* – participaram do estudo 101 crianças, com idades entre zero e 6 anos, sendo 51 portadoras de SD e 50 crianças sem síndrome. Os dois grupos não apresentavam diferença estatisticamente significativa quanto à composição (idade e sexo dos participantes). As amostras salivares coletadas foram diluídas em solução salina esterilizada, semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a 30° C por um período de 72 horas.

Identificação dos isolados – os isolados foram identificados por meio da morfologia, avaliando a formação de tubo germinativo. A avaliação fisiológica foi realizada por meio da assimilação de carboidratos (Sistema API 20 C AUX – BioMérieux). Os isolados não identificados pelos critérios citados anteriormente foram comparados por meio de seqüências da região ITS do gene DNA ribossomal.

Extração DNA – a extração de DNA foi realizada de acordo com Vicente (2000) modificado por Moreira (2006). As amostras foram diluídas em CTAB e submetidas a dois pulsos de ultra-som.

Em seguida, foram adicionados clorofórmio, álcool 96 e álcool 70. O DNA extraído foi ressuspensão em água ultrapura e mantido a - 4°C.

Ribotipagem e reação de seqüenciamento - O DNA dos isolados foi amplificado com os pares de primers V9G (5'TTACGTCCCTGCCCTTTGTA3') e LS266 (5'GCATTCCCAAACAACACTCGACTC 3'). Para a reação de PCR foi utilizado um volume de 50µl contendo 12ng do DNA extraído, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 0,2 mM para um *mix* de dNTP, 3 mM de MgCl₂, 0,8 µM de cada *primer*, 10 mM de tampão da enzima. A reação de amplificação consistiu de 30 ciclos (30 segundos de desnaturação a 94°C, 1 min de anelamento a 56°C, 1 min de síntese a 72°C), utilizando 2 min para desnaturação inicial e 3 min de extensão final (Termociclador Mastercycler gradient). Posteriormente foi realizada a purificação dos produtos de PCR., adicionando-se 50 µL de polietilenoglicol (PEG) aos 50 µl de reação de PCR. Em seguida o material foi transferido para um tubo tipo *ependorf* de 0,5 ml e incubado a 37°C por 30 min. O material foi centrifugado por 20min a 13000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 125 µl de etanol 80% gelado e o material foi novamente centrifugado por 2 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados 125 µl de Etanol 96% (gelado) pela parede do tubo e retirado em seguida. O sobrenadante foi descartado e o etanol 96% evaporado em bomba a vácuo (Univapo 100 ECH) por 10min a 70°C. O material foi ressuspensão em 15 µl de água ultrapura e mantido em temperatura ambiente por pelo menos 2 horas.

Na PCR realizada para o seqüenciamento, foram utilizados os *primers* ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') e ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'). Para cada reação foi utilizado foi utilizado 0,5 µl do *bigdie* terminador (ABI PRISM BigDye Terminators v 3.0 da Applied Biosystems), 1 a 3 µl do produto de PCR purificado, 0,5 µl do *primer*, 0,5 µl do tampão e água ultrapura a completar 10 µl. O programa de amplificação (Termociclador Mastercycler personal) constituiu de 35 ciclos de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 min a 60°C. Após 25 ciclos foi realizada a refrigeração a 8°C. A precipitação do DNA a ser seqüenciado foi realizado usando isopropanolol 75% e etanol 70%.Após a secagem completa do DNA precipitado, o mesmo foi ressuspensão em 10 a 20 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems) indicada para o seqüenciador

utilizado. Depois da dissolução, as soluções de DNA foram transferidas para a placa de seqüenciamento e mantidas em termociclador (Mastercycler personal) por 2 minutos a 95°C para desnaturação. A reação de seqüenciamento foi realizada no seqüenciador modelo 3130 da Applied Biosystems. A análise da qualidade das seqüências obtidas, a construção das seqüências consenso e o alinhamento das seqüências foram realizadas usando o programa Bioedit versão 7.0.2. A comparação com as seqüências existentes no *GenBank* foi feita utilizando-se o programa BLAST do NCBI como alinhador. A identificação da espécie analisada foi baseada na seqüência com o maior índice de similaridade.

Amplificação do DNA por RAPD – Foram utilizados os 31 isolados obtidos além das 4 linhagens utilizadas como referência: *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, totalizando 35 mostras. Os oligonucleotídios utilizados foram: OPA 10, OPX 11, OPX 12, OPX 14, OPX 17 e OPX 19 (Operon Technologies®).

Para a amplificação do DNA foi utilizada uma mistura contendo, além da amostra de DNA, os seguintes elementos: 1,5 unidades de *Taq* DNA polimerase, 0,4 mM para cada dNTP, 4,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,4 mM de *primer*, 10 mM de tampão da enzima 1X e 12 ng de DNA para 11 µL de reação. A reação de amplificação consistiu de 40 ciclos com as seguintes condições: 1 min a 92°C; 1,5 min a 37°C e 2 min a 72°C, utilizando 4 min a 92°C para desnaturação inicial e 3 min a 72°C de extensão final.

Os produtos resultantes da amplificação por RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,4% corados com brometo de etídio.

O índice de similaridade de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz binária de similaridade. A partir desta matriz as unidades foram agrupadas através do método UPGMA. (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) do software NTSYS versão 2.1. A confiabilidade dos grupamentos foi verificada pela análise *bootstrap* com 10000 reamostragens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 51% (26) das crianças com SD foi possível isolar leveduras do gênero *Candida* das amostras salivares coletadas, enquanto que nas crianças sem SD foram isoladas leveduras em 10% (5) das crianças, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Qui – Quadrado). Os resultados encontrados assemelham-se aos obtidos em outros estudos, mostrando uma diferença significativa na ocorrência de *Candida* spp. entre crianças com e sem SD (CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; RIBEIRO et al., 2005; VIEIRA et al., 2005).

A identificação dos isolados foi realizada utilizando-se diferentes marcadores morfológicos e fisiológicos (teste do tubo germinativo e assimilação de carboidratos através do teste bioquímico API 20 C AUX – BioMerieux, além do seqüenciamento de três isolados. O resultado dos diferentes métodos forneceu a identificação dos 31 isolados e a distribuição das espécies encontradas em cada grupo está representada na Tabela 1.

Entre as 27 amostras de leveduras isoladas entre as crianças com SD, 81,5% eram da espécie *C. albicans*, 11,11% de *C. guilliermondii*, 3,7% de *C. famata* e 3,7% de *C. krusei*. Entre as crianças sem SD foram encontrados 2 isolados de *C. albicans* e um isolado de cada uma das seguintes espécies: *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*.

A espécie *C. albicans* é citada pela literatura como a espécie mais frequentemente isolada da cavidade bucal de crianças (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; CARLSTEDT et al., 1996; SCULLY et al., 2002; ZÖLLNER e JORGE, 2003; SCHERMA et al., 2004; RIBEIRO et al., 2005; VIEIRA et al., 2005; KADIR et al., 2005), porém outras espécies também são colonizadoras da mucosa bucal, dados confirmados pelos resultados encontrados no presente estudo e em outros citados na literatura (DARWAZEH e AL-BASHIR, 1995; CARLSTEDT et al., 1996; ZÖLLNER e JORGE, 2003; SCHERMA et al., 2004; KADIR et al., 2005). A baixa frequência de isolamento *C. dubliniensis* da cavidade bucal de indivíduos saudáveis (SULLIVAN et al., 2004; MIRHENDI et al., 2005) além da sua semelhança morfológica e fenotípica com a espécie *C. albicans* (SULLIVAN et al., 1995; KHAN et al., 2004; MOSCA et al., 2005), sugeria outros métodos de confirmação para a identificação. Sendo assim, seqüências da região ITS deste isolado foram utilizadas como suporte para esta identificação.

Além deste, foram seqüenciadas também a região ITS dos isolados SD3₁, não identificado pelo sistema API 20 C AUX (BioMerieux) e o isolado de *C. albicans* SD44

As seqüências obtidas destes três isolados foram comparadas a seqüências depositadas no *GenBank* pelo programa BLAST e os resultados mostraram 100% de analogia entre a seqüência do isolado PC32 com seqüência de *C. dubliniensis* depositada no *GenBank*, 99% de analogia entre a amostra SD44 e seqüência de *C. albicans* e 99% de analogia entre a amostra SD3₁ e seqüência de *Issatchenkia orientalis*, forma telomórfica de *C. Krusei*, confirmando assim a identificação dos isolados.

A análise da variabilidade genética dos isolados por meio de marcadores RAPD diferentes padrões de amplificação entre os 31 isolados utilizados no estudo.

O dendograma gerado a partir da similaridade genética entre os isolados por meio dos marcadores RAPD pode ser visualizado na Figura 1.

O maior agrupamento (agrupamento I) formado foi entre os isolados de *C. albicans*, com índices de similaridade variando entre 25 e 75%, mostrando o alto índice de variabilidade genética desta espécie. O alto grau de polimorfismo genético da espécie *C. albicans* isoladas da cavidade bucal também foi demonstrada em outros trabalhos utilizando marcadores RAPD (WALTIMO et al., 2001; GIAMMANCO et al., 2005). Como em outros relatos da literatura o estudo mostrou padrões fenotípicos semelhantes entre os isolados, como o mesmo padrão de assimilação de açúcares, porém a análise por meio de marcadores RAPD revelou padrões de amplificações diferentes, mostrando o polimorfismo genético da espécie, associado a um padrão de colonização do hospedeiro.

O agrupamento II reuniu as espécies *C. krusei*, *C. guilliermondii* e o isolado de *C. famata* apresentando três subgrupos. No primeiro subgrupo ficaram o isolado de *C. krusei* (CK-1) e a linhagem ATCC da mesma espécie, com similaridade de 65% e valor de *bootstrap* de 65,52. Os três isolados identificados como *C. guilliermondii* formavam o segundo subgrupo, onde os isolados CG-9 e CG-16 apresentavam similaridade de 50% entre si, enquanto a linhagem CG-2 apresentava similaridade de 35% em relação a estas. No terceiro subgrupo estava a amostra de levedura da espécie *C. famata* (CF-3) com baixa similaridade em relação aos outros isolados deste grupo.

As linhagens de *C. parapsilosis* (CP-ATCC 33 e CP-28) foram agrupadas no grupo III e mostraram similaridade de cerca de 50% entre si, com valor de *bootstrap* de 96,90, mostrando a confiabilidade deste agrupamento.

Ainda no grupo III foram encontradas as amostras de *C. tropicalis* (CT-ATCC 34 e CT-31) com similaridade pequena entre as amostras. Agrupada a estas estava a amostra CD-29 de *C. dubliniensis*, com baixo índice de similaridade (25%).

O gráfico tridimensional gerado pelo programa NTSYS (Figura 2) mostra o agrupamento entre as espécies de *C. albicans*, sendo que duas amostras estão distantes deste agrupamento, sendo as mesmas provenientes de amostras salivares de crianças sem SD. O agrupamento maior é formado pelos isolados de crianças com SD. Características anatômicas da cavidade bucal, características salivares e aspectos imunológicos podem sugerir a causa desta maior colonização, variabilidade genética e explicar o distanciamento genético entre os isolados da saliva de crianças com e sem SD, porém, mais estudos com um maior número de amostragem devem ser realizados para o melhor entendimento entre a prevalência e o alto polimorfismo genético das leveduras *C. albicans* em pacientes com SD.

CONCLUSÕES

Sendo assim, de acordo com estes resultados e em conjunto com os dados relatados na literatura pode-se concluir que a colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida* é alta em pacientes com SD, sendo a espécie *C. albicans* a mais prevalente. Além disso, a variabilidade genética entre as espécies isoladas destes indivíduos também é grande, com a espécie *C. albicans* apresentando o maior grau de polimorfismo genético. A maior prevalência e a maior variabilidade genética das leveduras neste grupo de indivíduos podem ser explicadas pelo fato dos portadores da SD serem imunossuprimidos e apresentarem diferentes alterações na cavidade bucal, justificando a susceptibilidade de colonização por estas leveduras. No entanto, mais estudos devem ser realizados com um maior número de amostragem para a elucidação desta relação.

REFERÊNCIAS

AKDENIZ, B. G. et al. Prevalence of *Candida albicans* in oral cavities and root canals of children. **Journal of Dentistry for Children**, p. 289-292, Sep-Dec. 2002.

ANSARI, H. H. et al. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 302-308, 2003.

BAUTISTA-MUÑOZ, C. et al. Identification of *Candida* spp. By randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 414-420, Jan. 2003.

CARLSTEDT, K. et al. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 6, p. 95-100, 1996.

COGULU, D. et al. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. **Archives of Oral Biology**, v. 51, n. 1, p. 23-28, Jan. 2006.

DARWAZEH, A. M. G.; AL-BASHIR, A. Oral candidal flora in healthy infants. **Journal of Pathology and Medicine**, v. 24, p. 361-364, 1995.

de HINGH, Y. C. M. et al. Intrinsic abnormalities of lymphocyte counts in children with Down syndrome. **Journal of Paediatrics**, v. 147, p. 744-747, Dec. 2005.

FOTOS, P. G.; HELLSTEIN, J. W. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis, and therapeutic management. **Dental Clinics of North America**, v. 36, n. 4, p. 857-878, Oct. 1992.

GIAMMANCO, G. M. et al. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 483-490, Aug. 2005.

JARA, L. et al. Composition of the parotid saliva in Chilean children with Down's syndrome. **Archivos de Biología y Medicina Experimentales**, v. 24, n. 1, p. 57-60, 1991.

KADIR, T et al. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. **Archives of Oral Biology**, v. 50, p. 33-37, 2005.

KHAN, Z. U. et al. Tobacco Agar, a New Medium for Differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4796-4798, 2004.

LEHMAN, P. F.; LIN, D.; LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3249-3254, Dec. 1992.

MIRHENDI, H. et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Using a Single-Enzyme PCR- RFLP Method. **Japanese Journal of Infectious Disease**. v. 58, p. 235-237, 2005.

MOREIRA, M. **Variabilidade genética de *Streptococcus mutans* em isolados intrafamiliares, por meio de marcadores RAPD**. Curitiba, 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia – Área de concentração: Microbiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná

MOSCA, C. O. et al. Aislamiento de *Candida dubliniensis* en un adolescente con estomatitis protésica. **Medicina Oral, Patología Oral e Cirurgia Bucal**, v. 10, p. 25-31, 2005.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 8, p. 1923-1929, Aug. 1994.

PILCHER, E. S. Treating the patient with Down syndrome. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 2, n. 4, p. 58-61, Nov. 2001.

PINTO, P. M. et al. Genetic variability analysis among clinical *Candida* spp. Isolates using random amplified polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 2, p. 147-152, Mar. 2004.

REY, S. C.; BRIMAN, E. G. Odontologia e síndrome de Down. Aspectos crânio-faciais. In: MUSTACCHI, Z.; ROZONE, G. **Síndrome de Down. Aspectos clínicos e odontológicos**. São Paulo: CID Editora, 1990. p. 197-221.

RIBEIRO, E. L. et al. Detecção de *Candida albicans* fosfolipolíticas isoladas da saliva de crianças com síndrome de Down. **Acta Médica Portuguesa**, v. 15, p. 171-174, 2002.

RIBEIRO, L. M. A. et al. Evaluation of factors associated with recurrent and/or severe infections in patients with Down's syndrome. **Jornal de Pediatria**, v. 79, n. 2, p. 141-148, 2003.

ROBERT, F. et al. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2366-2371, Sep. 1995.

SCHERMA, A. P. et al. Presença de *Candida* spp. Na cavidade bucal de lactentes durante os primeiros quatro meses de vida. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 7, n. 3, p. 79-86, jul-set. 2004.

SCHWARTZMAN, J. S. Alterações clínicas. In: SCHWARTZMAN, J. S. et al. **Síndrome de Down**. São Paulo: Memnon, 1999. p. 82-127.

SCOTESE, I. et al. T cell activation efficiency associated with aberrant pattern of protein tyrosine phosphorylation after CD3 perturbation in Down's syndrome. **Pediatric Research**, v. 44, n. 2, p. 252-258, 1998.

SCULLY, C. et al. Down syndrome: lip lesions (angular stomatitis and fissures) and *Candida albicans*. **British journal of Dermatology**, v. 147, p. 37-40, 2002.

SIDRIM, J.J.C. e MOREIRA, J.L.B. Diagnóstico laboratorial das leveduras. In: SIDRIM, J.J.C. e MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.76-89.

SIQUEIRA, W. L. et al. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2-60 months with Down's syndrome. **Clinical Oral Investigation**, v. 9, n. 1, p. 26-29, Mar. 2005.

SREEDEVI, H.; MUNSHI, A. K. Neutrophil chemotaxis in Down syndrome and normal children to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 141-146, 1998.

STABHOLZ A. et al. Caries experience, periodontal treatment needs, salivary pH, and *Streptococcus mutans* counts in a preadolescent Down syndrome population. **Special Care in Dentistry**, v. 11, n. 5, p. 203-308, Sep-Oct. 1991.

SULLIVAN, D. J. et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV- infected individuals. **Microbiology**. v. 141, p. 1507 -1521, 1995.

SULLIVAN, D. J. et al. Comparasion fo epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**. v. 4, p. 369-376, 2004.

TRINCADO, M. V. R.; TOLEDANO, F. T., VILLALOBOS, V. S. A study of the functions of polymorphonuclear neutrophil in patients with Down's syndrome. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 16, n. 5, p. 339-345, 1988.

VICENTE, V. A. **Isolamento e caracterização de fungos da cromoblastomicose**. Piracicaba, 2000. 90f. Tese (Doutorado em Agronomia – Área de concentração: Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo.

VIEIRA, J. D. G. et al. *Candida albicans* isolada da cavidade bucal de crianças com síndrome de Down: ocorrência e inibição do crescimento por *Streptomyces* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 5, p. 383-386, set-out. 2005.

WALTIMO, T. M. T. et al. Phenotypes and randomly amplified polymorphic DNA profiles of *Candida albicans* isolates from root canal infections in a Finnish population. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 106-112, 2001.

YARAT, A. et al. Salivary sialic acid, protein, salivary flow rate, pH, buffering capacity and caries indices in subjects with Down's syndrome. **Journal of Dentistry**, v. 27, n. 2, p. 115-118, Feb. 1999.

ZALDIVAR-CHIAPA, R. M. et al. Evaluation of surgical and non-surgical periodontal therapies, and immunological status, of young Down's syndrome patients. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 7, p. 1061-1065, Jul. 2005.

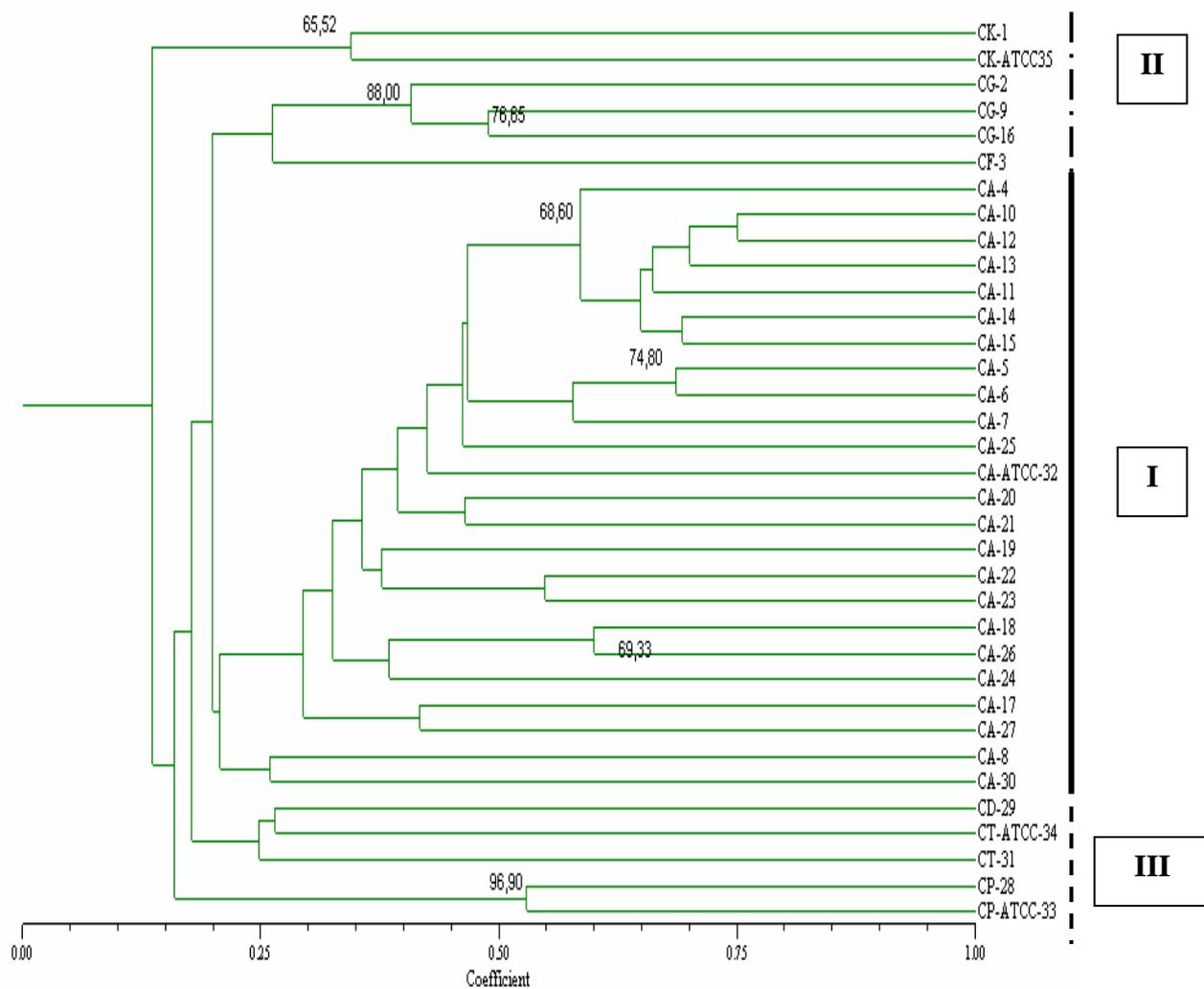
ZÖLLNER, M. S. A. DA C.; JORGE, A. O. C. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and in their mother's mouths and breasts. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, V. 17, n. 2, p. 151-155, 2003.

TABELA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

Pacientes	Crianças com SD		Pacientes	Crianças sem SD	
	Nomenclatura dos Isolados ⁺	Identificação dos isolados		Nomenclaturas dos Isolados ⁺	Identificação dos isolados
1		SC	1		SC
2			2	PC 2	<i>C.albicans</i>
3	SD 3 ₁ SD 3 ₂	<i>C. Krusei</i> + <i>C. guilliermondii</i>	3		SC
4		SC	4		SC
5	SD 5	<i>C. famata</i>	5		SC
6	SD 6	<i>C.albicans</i>	6		SC
7			7		SC
9			9		SC
10			10		SC
11	SD 11	<i>C.albicans</i>	11	PC 11	<i>C. parapsilosis</i>
12		SC	12		SC
13		SC	13		SC
14		SC	14		SC
15	SD 15	<i>C.albicans</i>	15		SC
16		SC	16		SC
17	SD 17	<i>C.albicans</i>	17		SC
18	SD 18	<i>C.albicans</i>	18		SC
19		SC	19		SC
20		SC	20		SC
21	SD 21	<i>C.albicans</i>	21		SC
22	SD 22	<i>C.guilliermondii</i>	22		SC
23		SC	23		SC
24	SD 24	<i>C.albicans</i>	24		SC
25		SC	25		SC
26	SD 26	<i>C.albicans</i>	26		SC
27		SC	27		SC
28	SD 28	<i>C.albicans</i>	28		SC
29		SC	29		SC
30		SC	30		SC
31		SC	31		SC
32		SC	32	PC 32	<i>C. dubliniensis</i>
33	SD 33	<i>C.albicans</i>	33		SC
34		SC	34		SC
35	SD 35	<i>C.albicans</i>	35		SC
36	SD 36	<i>C.albicans</i>	36	PC 36	<i>C.albicans</i>
37		SC	37		SC
38	SD 38	<i>C.guilliermondii</i>	38	PC 38	<i>C.tropicalis</i>
39		SC	39		SC
40	SD 40	<i>C.albicans</i>	40		SC
41		SC	41		SC
42	SD 42	<i>C.albicans</i>	42		SC
43	SD 43	<i>C.albicans</i>	43		SC
44	SD 44	<i>C.albicans</i>	44		SC
45	SD 45	<i>C.albicans</i>	45		SC
46	SD 46	<i>C.albicans</i>	46		SC
47		SC	47		SC
48	SD 48	<i>C.albicans</i>	48		SC
49	SD 49	<i>C.albicans</i>	49		SC
50		SC	50		SC
51	SD 51	<i>C.albicans</i>	51		SC
52	SD 52	<i>C.albicans</i>			

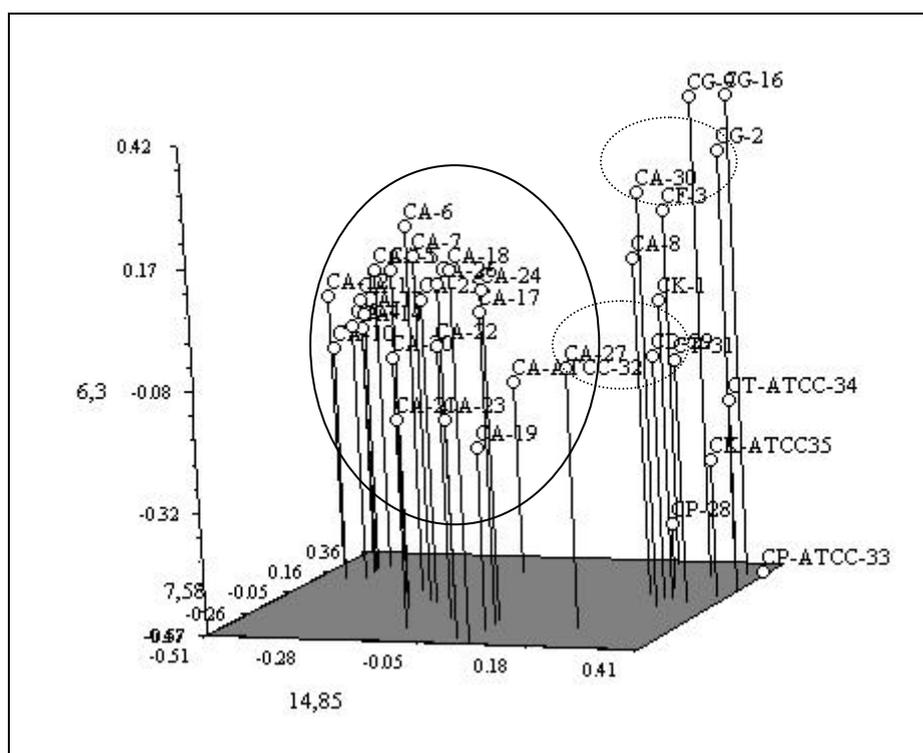
* amostras de leveduras isoladas de pacientes com Síndrome de Down (SD); ** amostras de leveduras isoladas de pacientes sem Síndrome de Down (PC); SC: sem crescimento de leveduras.

Figura 1 – Dendograma gerado a partir de similaridade genética obtida por marcadores rapd das linhagens descritas na Tabela 1, utilizando coeficiente de jaccard e método de agrupamento UPGMA



Legenda: I - agrupamento entre as linhagens de *C. albicans*, II – agrupamento entre as linhagens de *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. famata*, III – agrupamento entre as linhagens de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*

Figura 2 - Análise da similaridade entre as leveduras isoladas – gráfico tridimensional



Legenda: Agrupamento sinalizado em cinza – isolados de *C. albicans* de crianças com SD, amostras sinalizadas em tracejado – isolados de *C. albicans* de crianças sem SD