

GRAZIELLA NUERNBERG BACK BRITO

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES
COM ANOREXIA NERVOSA E BULIMIA NERVOSA**



2009

GRAZIELLA NUERNBERG BACK BRITO

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES COM
ANOREXIA NERVOSA E BULIMIA NERVOSA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós – Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia/Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito
Co-orientador: Prof. Tit. Francisco Gorgônio da Nóbrega

São José dos Campos
2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

B126a Back-Brito ,Graziella Nuernberg.
Avaliação da microbiota bucal de pacientes com anorexia nervosa e
bulimia nervosa / Graziella Nuernberg Back-Brito. __ São José dos Campos :
[s.n.], 2009
217f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São
Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.
Orientador: Prof. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito.

1. Anorexia nervosa. 2. Bulimia nervosa. 3. cavidade bucal. I. Koga Ito,
Cristiane Yumi. I. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos. III. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,
por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a
fonte.

São José dos Campos, 24 de novembro de 2009.

Assinatura :

E-mail: backbritogn@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito (Orientadora)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Adj. Janete Dias Almeida
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade Ferreira
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade do Norte do Paraná – UNOPAR

Prof. Dr. Mário Henrique de Barros
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de São Paulo - USP

São José dos Campos, 24 de novembro de 2009.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Cláudio Back** e **Daura Nuernberg Back** e ao meu marido **Manoel Luiz Gonçalves Brito**, que compartilharam mais esta etapa de minha vida, que acompanham de perto minhas conquistas e frustrações. Peço desculpas pela ausência freqüente e agradeço por todo apoio na concretização de mais esse sonho.

A todos aqueles que de alguma forma participaram e contribuíram na realização deste trabalho. Aos que me apoiaram nas horas incertas e compartilharam momentos e histórias ao longo destes anos de doutorado.

A todos os **pacientes** que sofrem destes transtornos.

“Cada ser humano possui uma beleza física e psíquica original e particular. Aprenda diariamente a ter um caso de amor com a pessoa bela que é você, desenvolva um romance com a sua própria história. Não se compare a ninguém, pois cada um de nós é um personagem único no teatro da vida.”

(A ditadura da beleza e a revolução das mulheres. Augusto Cury)

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Prof. Assistente Adj. José Roberto Rodrigues**, e do vice-diretor **Prof. Assistente Dr. Carlos Augusto Pavanelli**;

À **Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha**, vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, pela competência e dedicação com que ajuda administrar este curso;

A todos os docentes do **Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal** que colaboraram em mais esta etapa de minha formação profissional,

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo nos meses iniciais do doutorado;

A **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido por meio de minha bolsa de doutorado (Processo nº06/60851-0) e auxílio à pesquisa (Processo nº07/50350-7), imprescindíveis à realização do presente estudo;

À minha orientadora **Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito**, pela amizade e por todo ensinamento nestes cinco anos de convivência, pela confiança em mim depositada, por todo apoio e auxílio na execução deste trabalho e pela orientação competente e dedicada. Além de meu

sincero agradecimento, deixo registrado novamente meu enorme respeito e gratidão;

Ao **Prof. Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega**, pelo exemplo de pessoa e pesquisador, pelo qual tenho enorme respeito e admiração. Seu empenho e entusiasmo nessa carreira são contagiantes. Obrigada por me receber e me encaminhar nesta trajetória, que espero que esteja apenas iniciando;

Ao **Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge** por gentilmente me receber no Laboratório de Microbiologia desta faculdade e por toda atenção e consideração destinada a mim;

Ao **Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** pelo atendimento de excelência prestado aos pacientes psiquiátricos;

Ao **Dr. Táki Athanássios Cordas** médico responsável pelo Ambulatório de Bulimia e Transtornos Alimentares (AMBULIM) que nos recebeu com muita simpatia e nos orientou sobre toda parte médica e ao **Dr. Alexandre** pelo empenho nas coletas das pacientes bulímicas.

A **Dra. Eliane de Fátima Gomes Barbosa Prado** e **Sílvia Satomi Takamune** que contribuíram sobremaneira no atendimento odontológico dos pacientes com transtorno alimentar; abriram as portas do consultório, me orientaram quanto ao atendimento a estes pacientes, auxiliaram em todos os procedimentos de coleta e me acolheram de forma fraterna. Agradeço a todo pessoal envolvido, aos alunos do aprimoramento, em especial a **Gabriela de M. Gouvea Lima** e aos técnicos de enfermagem, **Reis, Gregório** (Greg) e **Sofia** (Sof);

A todo o pessoal do **Laboratório Genética Molecular e Genomas** do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – UNIVAP, em que pude conviver nestes anos, **Maria, Maria Alice, João Paulo, Claudia, Priscila, Simone, Tatiana** e os alunos **Sara, Rafael, Guilherme, Mônica, Mariana, Wilsamara** e **Nathália**;

À **Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira e Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira**, da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal pela amizade, apoio e convivência agradável durante todos esses anos;

Ao amigo **Adolfo José da Mota**, que foi um grande companheiro e incentivador. Adotou literalmente este estudo, com enorme dedicação, dividiu comigo todo seu conhecimento da parte molecular, fazendo com que aos poucos eu pudesse desvendar esse “mundo novo”, sempre com disposição a ensinar, com entusiasmo a procurar soluções para os problemas que ocorreram no desenrolar deste estudo. Deixo registrado aqui toda minha gratidão, carinho, respeito e admiração pela pessoa que é. Obrigada de coração!

À **Profa. Adj. Janete Dias de Almeida** da Disciplina de Semiologia pela amizade destes anos;

Ao **Luciano Angelo de Souza Bernardes** pela valiosa e dedicada colaboração na análise dos resultados moleculares;

Ao pessoal **triagem** e aos **professores e funcionários** das clínicas da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, por todo auxílio na coleta dos indivíduos controle;

À **Silvia Maria Rodrigues Querido** e **Patrícia Monteiro Ribeiro**, amigas e companheiras dos tempos de mestrado, que me receberam e me "iniciaram" no laboratório e continuam fazendo parte desta etapa;

Aos colegas de bancada, **Edna Navas, Thaís Paradella, Francine Rosa, Daniel Feitas, Ana Carolina Sálvia, Cristiane Pereira, Polyana Vilela, Ana Carolina Costa, Fernanda Brighenti, Rosilene Almeida, Rogério Romeiro, Marta Majewski, Flávio Molina, Cláudia Carreira, Simone Vilela** que dividiram comigo o dia-a-dia do laboratório de microbiologia, e puderam vivenciar o desenvolvimento deste trabalho, em especial quero agradecer aos amigos **Edson Yukio Komiyama** e **Bruno Mello de Matos** que compartilharam comigo mais que as alegrias e intempéries do laboratório;

Agradeço também aos **estagiários**, aos **alunos da pós-graduação** de outras áreas que também compartilharam dessa jornada;

A todos os alunos de iniciação científica, em especial, **Aline de Cássia Inocêncio, Aline Lopes Garbim, Cinthia Gomes Yassuda, Érica Crastechini, Felipe Eduardo de Oliveira, Jussimara Akemi Ishikawa, Laura Soares Lapesqueur, Lígia Tiaki Yamamoto, Marília Righetto Lopes, Zulene Eveline Abreu Ribeiro**, pelo prazer de acompanhar os primeiros passos na pesquisa e na vida profissional;

Aos técnicos de laboratório **Sérgio Giovanny Alves** e **Domingos Gonçalves Pontes** que coordenam e auxiliam o andamento do laboratório de Microbiologia; obrigada por toda ajuda e amizade;

Aos estagiários **Ana Paula de Almeida Lourenço** e **Guilherme Rodrigues Teodoro** e aluna **Vivian Narana Ribeiro El Achkar**, que tiveram participação ativa no desenvolver deste estudo. A vocês e demais alunos que me esperavam no retorno das coletas com todo material necessário

pronto e a mão, que compartilharam comigo cada história e que vibraram comigo a cada paciente coletado;

A **54ª turma do integral** e **10ª turma do noturno de graduação** da Faculdade de Odontologia UNESP – São José dos Campos, que eu pude acompanhar como professora bolsita. Foi uma experiência de imenso prazer e de grande enriquecimento profissional e pessoal. Lembrarei com muito carinho destas turmas sempre!

As secretárias **Sílvia Scarpel** e **Ivoneide Ramos Leandro** por toda atenção, gentileza e consideração ao longo destes anos;

A **Eliene Oliveira** pelo apoio na organização das referências bibliográficas;

Às secretárias da Seção de Pós-graduação **Rosemary de Fátima Salgado**, **Erena Michie Hasegawa**, **Lílian Faria das Graças** e **Maria Aparecida Consiglio de Souza**, pela gentileza, presteza e disponibilidade no decorrer do curso;

Às funcionárias da **Biblioteca Profa. Leila Novaes** da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, em especial a **Silvana Alvarez** pelas correções referentes à formatação desta tese;

Ao **Prof. Ivan Balducci**, da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela pronta colaboração e elaboração das análises estatísticas;

Ao **Carlos Alberto Guedes** por toda colaboração referente aos processos FAPESP;

À **Ana Paula Simão Corrêa** e **Maria de Fátima Pires** e a todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos por toda colaboração;

À **Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Solis** e **Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim**, que me ingressaram na pesquisa durante a graduação e que foram grandes incentivadoras;

À **Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão** e **Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho** que participaram do exame de qualificação deste estudo e que contribuíram com considerações importantes a composição do projeto;

Ao **Fábio Hasegawa**, representante da Biomérieux pelo atencioso atendimento e a todos os demais representantes com que tive contato e me auxiliaram durante esses anos;

A todos os **pacientes** que mesmo com todo sofrimento e conflitos que enfrentam, contribuíram para a realização deste estudo;

Ao meu marido **Manoel Luiz Gonçalves Brito**, pelo amor, por toda compreensão, apoio e carinho.

À minha **família**, por ser minha base, meu exemplo, meu alicerce. Aos meus **pais** pelo amor incondicional;

À **família de meu marido** pelo apoio durante estes anos de dedicação ao meu doutorado;

À **Regina de Fátima Braga e Silva**, pelo carinho com que me ajuda a cuidar do meu lar;

Aos meus **amigos pessoais**, que também souberam entender as minhas faltas, os meus "sumiços". Considero vocês minha segunda família e tenho certeza que vocês torcem por mim e que estão e estarão sempre ao meu lado. Obrigada;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Tenho muito e muitos a agradecer!;

À DEUS, todos os dias da minha vida.

"A melhor de todas as coisas é aprender. O dinheiro pode ser perdido ou roubado, a saúde e força podem falhar, mas o que você dedicou à sua mente é seu para sempre."

(Louis L. Amour)

SUMÁRIO

RESUMO	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	16
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Anorexia Nervosa (AN) e Bulimia Nervosa (BN)	21
2.1.1 Manifestações bucais da AN e BN.....	29
2.2 Microbiota bucal	36
3 PROPOSIÇÃO	58
4 MATERIAL E MÉTODO	59
4.1 Aspectos éticos	59
4.2 Critérios de inclusão	59
4.3 Critérios de exclusão	60
4.4 Anamnese e exame clínico	61
4.5 Coleta das amostras	61
4.6 Processamento das amostras	62
4.7 Identificação das amostras de <i>Candida</i>	64
4.7.1 Sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França).....	64
4.7.2 Identificação genotípica de <i>C. dubliniensis</i>	65
4.8 Identificação das amostras de <i>Staphylococcus spp.</i>	67
4.8.1 Produção de catalase.....	67
4.8.2 Sistema API Staph (Biomérieux, França).....	67
4.9 Identificação das amostras de enterobactérias e <i>pseudomonas</i>	68
4.9.1 Sistema API 20 E (Biomérieux, França).....	68
4.10 Identificação das amostras de <i>Enterococcus</i>	69
4.10.1 Sistema API 20 STREP (Biomérieux, França).....	69

4.11 Processamento das amostras para identificação molecular	70
4.11.1 Extração do DNA genômico: protocolo para bactérias.....	70
4.11.2 Extração do DNA genômico: protocolo para fungos.....	72
4.11.3 Amplificação do gene 16S rRNA bacteriano e das regiões D1/D2 do gene 28S rRNA do de fungos.....	73
4.11.4 Quantificação em espectrofotômetro.....	75
4.11.5 Procedimentos de clonagem.....	75
4.11.6 Preparação do DNA plasmidial.....	77
4.11.7 Seqüenciamento de DNA.....	78
4.11.8 Precipitação das reações de seqüenciamento.....	79
4.12 Análise dos resultados	80
4.12.1 Análise dos resultados de isolamento e identificação fenotípica.....	80
4.12.2 Análise das reações de seqüenciamento.....	81
5 RESULTADOS	84
5.1 Métodos de cultivo	84
5.1.1 Gênero <i>Candida</i>	84
5.1.2 Gênero <i>Staphylococcus</i>	87
5.1.3 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae.....	90
5.1.4 Gênero <i>Enterococcus</i>	94
5.1.5 Estreptococos do grupo <i>mutans</i>	96
5.1.6 Gênero <i>Lactobacillus</i>	97
5.1.7 Unidades formadoras de colônias por mililitro.....	99
5.2 Métodos independentes de cultivo	103
5.2.1 Bactérias.....	103
5.2.2 Fungos.....	121
6 DISCUSSÃO	125
7 CONCLUSÃO	159
8 REFERÊNCIAS	161
APÊNDICES	196

ANEXOS.....	215
ABSTRACT.....	218

Back-Brito, GN. Avaliação da microbiota bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2009.

RESUMO

Os Transtornos alimentares (TA) como Anorexia Nervosa (AN) e Bulimia Nervosa (BN) são acompanhados de inúmeras alterações sistêmicas e bucais relacionadas ao comprometimento do estado nutricional e às práticas compensatórias inadequadas para o controle do peso. O objetivo deste estudo foi avaliar diversidade microbiológica existente na cavidade bucal de pacientes com estes transtornos, por meio de técnicas de cultivo e utilizando métodos moleculares independentes de cultivo. Foram incluídos no estudo 32 pacientes anoréxicos e 27 bulímicos, pareados com 59 indivíduos controle. Amostras de enxágüe bucal foram semeadas para a avaliação da prevalência de leveduras do gênero *Candida*, estafilococos, enterococos, estreptococos do grupo *mutans* (EGM), lactobacilos, enterobactérias/pseudomonas. Espécies de *Candida*, estafilococos, enterococos, enterobactérias/pseudomonas foram identificadas pelo sistema API. Amostras de biofilme supragengival foram coletadas e utilizadas somente nos procedimentos moleculares. As contagens de microrganismos nos grupos foram comparadas por ANOVA/Mann-Whitney (5%). Houve diferença estatisticamente significantes ($p < 0,05$) para as contagem de leveduras do gênero *Candida*, estafilococos, enterococos, EGM e lactobacilos entre o grupo TA e controle, mas não houve diferenças significativas para a prevalência de enterobactérias/pseudomonas ($p = 0,312$). Pequena diferença entre os grupos foi observada na diversidade de espécies dos microrganismos estudados pelo método de cultivo. Avaliação molecular foi realizada pela ribotipagem por seqüenciamento do 16S rRNA bacteriano e regiões D1/D2 do 28S rRNA. Foram avaliados cerca de 3000 clones do grupo TA e 1500 clones do controle. Sessenta e duas espécies ou filotipos de bactérias foram detectados, sendo que 22 identificações foram encontrados somente no grupo de estudo, 6 apenas no grupo controle e 34 em ambos os grupos. Microrganismos relacionados à cárie e doença periodontal foram encontrados em ambos os grupos. Para fungos foram detectados 13 espécies/filotipos, sendo que oito somente foram detectados no grupo de estudo, um somente no grupo controle. A metodologia cultivo-dependente indicou diferença quantitativa dos gêneros estudados, exceto para enterobactérias/pseudomonas. As diferenças na composição bacteriana da microbiota bucal de pacientes com TA e indivíduos controle foram representadas melhor pelo método independente de cultivo.

Palavras-chave: Anorexia Nervosa. Bulimia Nervosa. Cavidade bucal. Bactérias. Leveduras. PCR. Clonagem molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A = adenosina

AMBULIM – IPqHCFMUSP = Ambulatório de Bulimia e transtornos alimentares do instituto de psiquiatria do hospital das clínicas da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo

AN = Anorexia Nervosa

ANP = Anorexia Nervosa Purgativa

ANR = Anorexia Nervosa Restritiva

ANOVA = análise de variância

API = sistema de identificação padronizado

ATCC= *American type culture collection*

BLAST= *Basic Local Alignment Search Tool*

BHI = infusão cérebro-coração

BN = Bulimia Nervosa

C= citosina

CAPPesp = Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa

CID-10 = Classificação internacional de doenças

CO₂ = dióxido de carbono

CPO – D = índice de dentes cariados, perdidos ou obturados

DNA = ácido desoxirribonucléico

dNTPs = deoxinucleotídeos trifosfatados

DSM-IV= *Diagnostic and statistical manual IV edition*

f = *forward*

g = grama

G = guanina

GenBank = banco de dados

GL= glicose

GA = galactose
gp = glicoproteínas
h = hora
IMC = Índice de massa corpórea
kb = kilo bases
kg = kilo gramas
LA = meio de cultura Luria-Bertani acrescido de ampicilina
M= molar
m = metro
mM = milimolar
mg = miligrama
ml = mililitros
mm³ = milímetros cúbicos
nm = nanômetros
ng = nanograma
NaCl = cloreto de sódio
OMS = Organização mundial de saúde
PBS = tampão fosfato
pb = pares de base
pDNA = DNA plasmidial
PCR = reação em cadeia da polimerase
pH = potencial hidrogênio-iônico
q.s.p. = quantidade suficiente para
r = reverse
RDB = Ribosomal database project
RNA = ácido ribonucléico
rRNA = ácido ribonucléico ribossômico
r.p.m = rotações por minuto
SDS = lauril sulfato de sódio (*Sodium lauryl sulfate*) – detergente
SOC = *Super Optimal broth with catabolite repression* – meio de cultura
spp. = espécies

T = timina

TOC = transtorno obsessivo compulsivo

TSA = *tryptic soy agar*

TREECON = software para construção de árvores filogenéticas

UFC = unidades formadoras de colônias

µg = microgramas

µL = microlitros

UNESP = Universidade Estadual Paulista

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

V = volume

V/V = volume a volume

X-Gal = abreviatura de galactose e indol (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside)

% = porcentagem

°C = grau Celsius

1 INTRODUÇÃO

O número de casos de transtornos alimentares como Anorexia Nervosa (AN) e Bulimia Nervosa (BN) vem aumentando significativamente ao longo dos anos, influenciado, sobretudo por uma sociedade moderna que elege a magreza como símbolo de sucesso e beleza. Nos últimos anos a valorização excessiva da forma e do peso do corpo tem levado muitas pessoas, principalmente mulheres, a verdadeiros sacrifícios, que podem comprometer a saúde, como dietas radicais e exercícios físicos em excesso, com o intuito de conseguirem chegar ao corpo ideal (Abuchaim, 2002; Cordás; Claudino, 2002). As mortes de uma modelo brasileira e de uma estudante de moda no final do ano de 2006 com este quadro tiveram repercussão mundial e reacendeu o interesse pelo tema.

Estes transtornos alimentares são acompanhados de inúmeras complicações clínicas relacionadas ao comprometimento do estado nutricional e às práticas compensatórias inadequadas para o controle do peso (vômitos, diuréticos, enemas e laxativos), que os tornam a maior taxa de mortalidade entre todos os grupos de doenças psiquiátricas (Assumpção; Cabral, 2002; Debate et al., 2005).

Manifestações intra e extra-bucais também podem ser observadas, pois estes transtornos apresentam efeitos marcantes sobre a saúde bucal. Como o cirurgião-dentista examina seus pacientes em intervalos freqüentes, pode-se tornar o primeiro profissional da área da saúde a identificar sinais e sintomas que indicam algum destes transtornos alimentares, o que faz com que o cirurgião-dentista tenha um importante papel não somente na conduta e tratamento das lesões bucais presentes, como também no diagnóstico destes transtornos.

Além disso, a cavidade bucal apresenta um ecossistema microbiano complexo e heterogêneo, sendo habitada por microrganismos aeróbios e anaeróbios, que colonizam os diferentes nichos bucais (Smith et al., 2001; Senpuku et al., 2003; Hägg et al., 2004; Prieto-Prieto; Calvo, 2004). A microbiota bucal em indivíduos saudáveis é relativamente estável, mas significantes alterações podem ocorrer na presença de doenças sistêmicas e durante o tratamento destas (Jobbins et al., 1992; Hägg et al., 2004), assim microrganismos residentes ou comensais, podem atuar como patógenos oportunistas e ocasionar infecções (Paster et al., 2001). Desta forma, a situação ainda indefinida entre estes microrganismos e suas relações causais ou circunstanciais com patologias locais e sistêmicas destaca a importância de ampliar o conhecimento sobre os microrganismos presentes na cavidade bucal para melhor fundamentar o diagnóstico e correto tratamento de doenças sistêmicas e bucais nas quais estes patógenos estejam envolvidos (Keijser et al., 2008).

Visto que a má nutrição e a prática de indução de vômito decorrentes da Anorexia Nervosa e da Bulimia Nervosa podem ocasionar inúmeras alterações bucais, consideramos importante e original avaliar a composição microbiológica da cavidade bucal destas pacientes, uma vez que não encontramos trabalhos na literatura científica a este respeito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anorexia Nervosa (AN) e Bulimia Nervosa (BN)

Transtornos alimentares como Anorexia Nervosa (AN) e Bulimia Nervosa (BN) são frequentemente considerados quadros clínicos ligados à modernidade, produto de pressões sociais atuais e da mídia, em que há exaltação da magreza como ideal de beleza. Entretanto, há evidências da existência destas patologias desde a antiguidade (Abuchaim, 2002; Cordás; Claudino, 2002).

Durante a Idade Média, as práticas de jejum foram compreendidas como estados de possessão demoníaca ou milagres divinos. Um dos mais antigos relatos data de 700 a 900 d.C. sobre Santa Wilgerfortis (do latim “virgem forte”) que era a sétima filha do rei de Portugal, havia feito voto de castidade, mas fora prometida em casamento para o rei da Sicília e começou um jejum auto-imposto fazendo com que seu pretendente desistisse do matrimônio. Outro caso semelhante foi o de Santa Catarina de Siena no século treze, que com quinze anos, após a morte de sua irmã e diante de futuros projetos de casamento de seus pais, iniciou restrições alimentares, preces e práticas de autoflagelamento, chegando a induzir vômito por meio de ervas e galhos na garganta quando forçada a se alimentar. Santa Catarina veio a falecer de desnutrição aos 32 anos de idade (Abuchaim, 2002; Cordás; Claudino, 2002).

Os egípcios vomitavam e usavam práticas purgativas todo mês, por três dias consecutivos, julgando que “todas as doenças dos homens são oriundas da comida”. Hipócrates também recomendava a

indução de vômitos por dois dias todo mês para prevenir diferentes doenças.

Os romanos criaram o “vomitorium” que lhes permitiam alimentar-se em excesso durante os banquetes e depois vomitar em local reservado, algumas vezes utilizando penas de aves para induzir o reflexo de vômito na garganta (Abuchaim, 2002; Cordás; Claudino, 2002).

O termo anorexia deriva do grego “an” deficiência, ausência de, privação e “orexis”, apetite; remetendo ao significado de aversão a comida, inapetência.

A denominação mais específica “Anorexia Nervosa” surgiu com Willian Gull a partir de 1873, referindo-se à “doença que afeta mulheres jovens que se caracteriza por emagrecimento extremo, cuja falta de apetite é decorrente de um estado mental mórbido e não a uma disfunção gástrica”. Atualmente o termo “anorexia” não é utilizado em seu sentido etimológico para “anorexia nervosa”, visto que tais pacientes não apresentam real perda de apetite, considerando que, pelo menos no início do quadro, há uma luta ativa contra a fome, uma recusa em se alimentar, com o intuito de emagrecer ou por medo de engordar (Cordás; Segal, 1995; Abuchaim, 2002; Cordás; Claudino, 2002).

O termo bulimia deriva do grego “bous” boi e “limos” fome, designando um apetite de comer um boi. Surgiu como uma síndrome na década de 70, relacionada à Anorexia Nervosa. Foi descrita por Gerald Russel (1979) que propôs de que se tratava de uma nova síndrome na qual as pacientes sofrem de impulso irresistível de comer excessivamente e depois procura evitar os efeitos de engordar por meio de práticas purgativas (Cordás; Segal, 1995; Abuchaim, 2002; Cordás; Claudino, 2002).

A AN e BN são descritas como transtornos alimentares e não como doenças por ainda não se conhecer bem sua etiopatogenia. Mas estes três fatores parecem estar relacionados: fatores genéticos, tendo sido observado que parentes de primeiro grau de pacientes com AN

ou BN têm maiores índices dessas alterações, e o mesmo pode ser observado entre irmãos gêmeos, principalmente monozigóticos; fatores sociais, com o padrão de beleza relacionado à magreza e sucesso, problemas de relacionamento social e familiar; e fatores psicológicos, pois freqüentemente há presença de transtornos psiquiátricos, como depressão, distímia, fobia social ou transtorno obsessivo compulsivo (TOC) e transtornos de personalidade (Morgan et al., 2002; Pinzon; Nogueira, 2004).

Embora a AN e BN sejam classificados separadamente, os dois transtornos são intimamente relacionados por apresentarem psicopatologia comum, uma idéia prevalente envolvendo a preocupação excessiva com o peso e a forma corporal (medo mórbido de engordar), que leva as pacientes a se engajarem em dietas extremamente restritivas ou a utilizarem métodos purgativos; e distúrbio da imagem corporal. Um outro aspecto, que ocorre principalmente na AN, é a negação da gravidade da perda de peso e a vontade de continuar emagrecendo, apesar de todas as opiniões contrárias de especialistas, amigos e familiares (Claudino; Borges, 2002; Romaro; Itokazu, 2002; Cordás, 2004)

Os transtornos alimentares são síndromes comportamentais têm sido amplamente estudados nos últimos 30 anos (Claudino; Borges, 2002). Os atuais sistemas classificatórios de transtornos mentais, DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual IV edition*) e CID-10 (Classificação Internacional de Doenças, 10ª edição) determinam os critérios diagnósticos para Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa (Claudino; Borges, 2002).

De acordo com o DSM-IV as características da Bulimia Nervosa são a compulsão alimentar e os métodos purgativos inapropriados com o intuito de prevenir o ganho de peso corporal. Para qualificar e diagnosticar corretamente essa condição, a compulsão alimentar e os comportamentos associados devem ocorrer pelo menos duas vezes por semana, por três meses. O primeiro critério diagnóstico da

Bulimia Nervosa compreende a alimentação que é normalmente calculada como maior do que uma pessoa comeria durante um intervalo de tempo similar ou sob as mesmas circunstâncias. O critério seguinte é a anormalidade na quantidade de alimentos consumidos (Claudino; Borges, 2002).

O terceiro critério é o uso inapropriado de métodos compensatórios para prevenir o ganho de peso. O método compensatório mais comumente relatado é o vômito auto-induzido após um episódio de compulsão alimentar. Considerando que o método purgativo da auto-indução do vômito expelle dois terços dos alimentos consumidos, pacientes bulímicos mantêm um peso normal (Woodmansey, 2000). O uso inapropriado de laxantes e diuréticos, além do exagero na realização de exercícios físicos, são também comportamentos compensatórios inapropriados utilizados por pacientes com BN.

O critério final para estabelecer um diagnóstico de Bulimia Nervosa é a ênfase excessiva e inapropriada na forma e no peso corporal, fazendo com que sua auto-estima esteja completamente dependente de sua forma física (Claudino; Borges, 2002).

Segundo Hay (2002) e Pinzon e Nogueira (2004) os estudos com metodologias e amostras diversas dificultam a obtenção de dados epidemiológicos mais fiéis, mas de uma forma geral, a prevalência de AN varia entre 0,5% e 3,7% e de BN de 1,1% e 4,2% da população, dependendo de definições do transtorno mais restritivas ou mais abrangentes. Klein & Walsh (2004) relataram que os transtornos alimentares ocorrem predominantemente em mulheres jovens, com uma prevalência média de relação entre homem e mulher de 1:10 e até 1:20. Ribeiro e Busse (2002) sugerem que os transtornos alimentares no sexo masculino devem ser mais comuns do que geralmente é reconhecido, sendo os homens mais relutantes que as mulheres em procurar tratamento. No entanto, de acordo com Melin e Araújo (2002) os transtornos alimentares são bastante similares em pacientes do sexo

masculino e feminino, tanto em termos clínicos como na resposta ao tratamento.

Transtornos de personalidade e da impulsividade, transtornos de humor, transtornos de ansiedade, transtorno obsessivo compulsivo e dependência de álcool e drogas podem estar associados aos transtornos alimentares, denominadas comorbidades, dificultando o tratamento e comprometendo o prognóstico. Estas condições merecem acompanhamento psiquiátrico conjunto, tanto no tratamento ambulatorial quanto no hospitalar (Kaye et al., 2004; Cabrera, 2006; Jordan et al., 2007).

Traços como obsessões, perfeccionismo, passividade e introversão são comuns em pacientes com AN e permanecem estáveis mesmo após a recuperação do peso. As características de personalidade da BN são diferentes: sociabilidade, comportamento gregário, comportamentos de risco e impulsividade. Estes traços são consistentes com o descontrole e a purgação. Estudos recentes têm sugerido que a baixa auto-estima ou a auto-avaliação negativa são fatores de risco importantes tanto para AN quanto para BN (Morgan et al., 2002).

A literatura sobre o tratamento da AN e BN está centrada em duas abordagens terapêuticas: psicoterapia, psicofarmacoterapia ou, associação destas (Segal et al. 1995; Bacaltchuk; Hay, 1999; Abreu; Filho, 2004).

A principal meta do tratamento da AN segundo a Academia Psiquiátrica Americana é o ganho de peso até o índice de massa corporal (IMC) acima de 19. Caso haja comorbidade psiquiátrica, é necessária a abordagem psicofarmacológica. A meta principal do tratamento da BN é a regularização do padrão alimentar com suspensão de práticas purgativas e restritivas. Para a maioria das pacientes bulímicas, um tratamento não - farmacológico é considerado o primeiro passo. Se o tratamento com abordagem psicoterápica não estiver

evoluindo como o esperado, medicamentos antidepressivos estão indicados (Salzano; Cordás, 2004).

Diferentes abordagens psicoterápicas foram testadas no tratamento destes transtornos: cognitivas, comportamentais, psicodinâmicas, bem como terapia familiar e até hipnose foram sugeridas (Segal et al. 1995; Gorgati et al., 2002). Tratamentos de orientação cognitiva e comportamental, empregando técnicas específicas para modificar o comportamento alimentar, têm sido mais extensivamente estudados, e há um consenso de que tais modalidades são as mais bem sucedidas (Segal et al., 1995). Mas não há nenhuma evidência de uma forma específica de psicoterapia seja superior à outra para todos os tipos de pacientes (Gorgati et al., 2002). Normalmente estas técnicas incluem um diário de automonitorização do comportamento alimentar, o que serve de parâmetro para a frequência dos comportamentos alterados e como índice de evolução. As técnicas comportamentais mais utilizadas incluem reestruturação cognitiva, prevenção de resposta, treino de assertividade e aconselhamento nutricional (Segal et al., 1995; Gorgati et al., 2002; Abreu; Filho, 2004).

O objetivo principal do tratamento nutricional é estabelecer modificações de atitudes para com o peso e alimentação. Para isto, a educação nutricional envolve desde informações sobre os transtornos e seus efeitos fisiológicos; sobre energia, nutrientes e alimentos; sobre peso e o diário alimentar. A avaliação antropométrica também é realizada, com a aferição de peso e altura e cálculo do Índice de Massa Corpórea ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$, em kg e m) para acompanhamento do paciente (Segal et al., 1995; Latterza et al., 2004; Sicchieri et al., 2006).

Vários estudos apontam a psicoterapia grupal como modalidade importante e eficaz no tratamento adjunto destes transtornos. Os recursos existentes na psicoterapia dinamicamente orientada possibilitam uma apreensão mais fina de seu campo de observação,

através de indagações mais detalhadas, sem que perca o conteúdo latente do discurso. A psicoterapia grupal auxilia o paciente a se conscientizar de que não é o único com este problema, a tomar contato com a realidade e a observar modelos positivos (pacientes mais antigos) (Segal et al., 1995).

A observação de que as famílias com filhas com AN pareciam ter características de funcionamento semelhantes fez com que o contexto familiar se tornasse foco de muitos estudos que buscam entender o papel da família no desencadeamento, manutenção e remissão do transtorno. Diversos estudos procuram correlação entre o funcionamento familiar e o aparecimento destes transtornos, com controvérsias entre os resultados encontrados (Cobelo et al., 2004; Souza; Santos, 2006). A estrutura familiar pode apresentar uma confusão de fronteiras, marcada pela ausência generalizada de limites entre gerações e pessoas dos diferentes subsistemas, faltando o senso de identidade e individualidade dos membros familiares, que apresentariam padrões inadequados de relacionamento interpessoal (Oliveira; Santos, 2006). Souza e Santos (2006) observaram características muito semelhantes entre as alianças inter-geracionais presentes entre determinada paciente e seus colegas do grupo da escola de Terapia Familiar Sistêmica de Milão. Neste estudo, tal caso foi relacionado aos conflitos do processo intra-conjugal dos pais da paciente. A intervenção familiar propõe atuar nos fatores mantenedores dos transtornos alimentares, ou seja, na dificuldade da família no manejo com os conflitos, na superproteção parental, no paciente como papel de “bode expiatório” e na alta emoção expressa (Bighetti et al., 2006).

As medicações psicotrópicas devem ser vistas como coadjuvantes no tratamento dos transtornos alimentares e dentro do contexto da intervenção multiprofissional (Cabrera, 2006). A literatura apresenta estudos que relatam que o tratamento combinado de psico e farmacoterapia é superior aos tratamentos únicos, porém, outros estudos

de ensaios clínicos randomizados com antidepressivos, antipsicóticos e outros agentes mostraram que, na fase aguda, não há diferença estatisticamente significativa quando comparados ao placebo em relação às principais medidas de desfecho. O uso de medicamentos na AN baseia-se em três pontos principais: as distorções do pensamento associados aos transtornos da imagem corporal (que alguns autores consideram como uma forma de psicose), os sintomas depressivos associados e as alterações de apetite. Na BN o alvo principal da ação dos medicamentos tem sido os episódios de compulsão alimentar e os sintomas comportamentais relacionados (Appolinario; Bacaltchuk, 2002).

Os transtornos alimentares são acompanhados de várias complicações clínicas relacionadas ao comprometimento do estado nutricional e às práticas compensatórias inadequadas para o controle do peso (vômitos, diuréticos, enemas e laxativos). Dentre as alterações clínicas decorrentes destes transtornos estão: hipercolesterolemia e hipoglicemia; irregularidade menstrual conduzindo à amenorréia; redução da libido; osteopenia ou osteoporose; maior risco para o desenvolvimento de arritmias cardíacas; hipotensão arterial; desnutrição; fraqueza; confusão; náusea; palpitações; poliúria; dor abdominal; constipação; cálculos renais; anemia; leucopenia; pele pálida ou com coloração amarelada; seca; sem brilho e por vezes coberta por uma fina camada de pêlos (lanugo); cabelos ralos, finos e opacos; unhas quebradiças; úlceras ou escoriações dorsais da superfície da pele das mãos ou calos nos dedos decorrentes dos vômitos excessivos, denominado de “Sinal de Russel” (Segal et al., 1995; Assumpção; Cabral, 2002; Borges et al., 2006). A morbidade e mortalidade são expressivas, a AN apresenta a maior taxa de mortalidade dentre todos os distúrbios psiquiátricos, cerca de 0,56% ao ano. Este valor é em torno de 12 vezes maior que a mortalidade das mulheres jovens na população em geral. As principais causas de morte são: complicações cardiovasculares, insuficiência renal e suicídio (Assumpção; Cabral, 2002).

O tratamento das complicações deve ser realizado concomitantemente ao acompanhamento psicoterápico e nutricional, necessitando de uma equipe multidisciplinar com psiquiatra, endocrinologista, ginecologista, pediatra, terapeutas individual e familiar, nutricionista, enfermagem e outros profissionais da área saúde (Segal et al., 1995; Cordás, 2001; Assumpção; Cabral, 2002).

O cirurgião-dentista deve fazer parte do atendimento multidisciplinar e pode ser o primeiro profissional da saúde a detectar os sinais e sintomas que indicam algum dos transtornos alimentares. Isto porque, algumas manifestações intra e extra-bucais podem ser observadas. As manifestações extra - bucais relacionadas à Anorexia Nervosa restritiva estão associadas à má - nutrição (condições de pele, pêlo, cabelo, unha) (Alonso et al., 2001; Debate et al., 2005). Para Bulimia Nervosa, ou ainda para Anorexia Nervosa purgativa, acrescenta-se ainda sialoadenose (ou sialose), mais freqüentemente das glândulas parótidas (Coleman et al., 1998; Alonso et al., 2001; Debate et al., 2005; Touger-Decker, 2006), ulceração ou inflamação dos dedos utilizados para induzirem vômito (Burke et al., 1996; Alonso et al., 2001; Debate et al., 2005; Touger-Decker, 2006).

2.1.1. Manifestações bucais da AN e BN

Alterações intra-bucais também podem ocorrer em decorrência da deficiência nutricional e a indução de vômito. A literatura demonstra um consenso em que a erosão do esmalte com conseqüente exposição de dentina é a manifestação bucal mais comum e preocupante dos transtornos alimentares (Little, 2002; Frydrych et al., 2005).

A regurgitação crônica de conteúdo do ácido estomacal causa desmineralização do esmalte dental e conseqüente erosão. A

erosão é um processo no qual o tecido dental é removido através de um processo químico. Essa manifestação é a primeira na qual o cirurgião-dentista poderá realizar um diagnóstico diferencial e detectar um caso de desordem alimentar (Moor, 2004; Aranha et al., 2008).

O vômito provocado, método bastante utilizado por pacientes anoréxicos e bulímicos para prevenir o ganho de peso, é um dos processos mais destrutivos que afetam os tecidos duros da cavidade bucal. Deste modo, pacientes portadores de Anorexia Nervosa do tipo purgativo e Bulimia Nervosa, apresentam clássicas erosões na face lingual dos dentes inferiores. Esse tipo específico de lesão de esmalte é denominado de perimólise e é definido especificamente como a erosão nas superfícies lingual, oclusal e incisal dos dentes como um resultado de efeitos químicos e mecânicos causados principalmente pela regurgitação de componentes gástricos para a cavidade bucal. Tipicamente, essas lesões se apresentam como uma superfície uniforme, lisa e brilhante (Caldeira et al. 2000; Alonso et al. 2001; Traebert; Moreira, 2001; Moor, 2004; Aranha et al., 2008; Russo et al., 2008).

Os resultados do trabalho de Robb e Smith (1996) mostram que os pacientes que sofriam de Anorexia Nervosa, mas não apresentavam vômito, tinham mais erosões que o grupo controle, porém menos erosões do que o grupo purgativo. As erosões eram predominantemente localizadas nas faces vestibulares e oclusais dos elementos dentais. Não é relatada na literatura relação entre a frequência de episódios de vômitos provocados, duração, higiene bucal e erosão. Isso pode ser atribuído a diferenças na susceptibilidade a erosão entre os pacientes, devido a alterações na capacidade tampão da saliva, fluxo salivar e pH, pois há ainda a dificuldade em se acreditar nos dados relatados pelos pacientes.

A maioria dos estudos relatam que as erosões de perimólise são detectadas após dois anos de ocorrência de vômitos provocados apesar de haver um trabalho relatando lesões de erosão após

6 meses. Em casos severos há encurtamento da coroa clínica dos dentes e diminuição da dimensão vertical (Kleier et al., 1984; Caldeira et al., 2000; Seabra et al., 2004).

A abrasão mecânica pela escovação logo após o vômito pode agravar o desgaste dental. Geralmente, a erosão dental e conseqüente exposição da dentina é acompanhada de dor. A hipersensibilidade dentinária e o comprometimento estético são os principais fatores que levam estes pacientes a procurar por tratamento odontológico (Caldeira et al., 2000; Alonso et al., 2001; Aranha et al., 2008).

A severidade da perimólise depende: da duração dos episódios de vômito provocado; da freqüência de episódios por dia; dos hábitos de higiene bucal (principalmente após o vômito); do grau de diluição ácida por meio de água e neutralizadores como o leite; e tempo de escovação (Moor, 2004). De acordo com alguns estudos, a erosão dental não é necessariamente uma seqüela do vômito e não possui associação linear direta com a duração e a freqüência do ato de vomitar (Milosevic; Slade, 1989; Aranha et al., 2008). Outros estudos clínicos realizados relataram que pacientes com AN e BN demonstraram altos níveis de desgaste dental quando comparado ao grupo controle (Milosevic; Slade, 1989).

Diferenciar lesões de erosão ativas e inativas pode ser importante para determinar se o vômito induzido continua ou não. Lesões ativas são lisas, não apresentam manchas e não são sensíveis ao estímulo frio ou quente. Quando o vômito induzido cessa a dentina exposta se torna manchada. Em alguns casos, a perimólise será somente a única manifestação evidente em pacientes que induzem o vômito (Smith; Knight, 1984; Aranha et al., 2008).

Erosões nas faces vestibulares e linguais também podem ser resultado de um alto consumo de alimentos ácidos. Essa característica tem sido relatada em pacientes com Anorexia Nervosa

Restritiva e pode afetar o tecido dental devido à acidez dos alimentos consumidos. Adicionalmente, a superfície vestibular pode apresentar um padrão diferente das erosões da perimólise (Hellstrom, 1974; Aranha et al., 2008).

Muita ênfase tem sido dada ao papel do vômito como o agente causador das erosões de esmalte, porém pouca importância tem sido dada a fatores alimentares. De acordo com Frydrych et al. (2005), essa é uma omissão já que a dieta também é um risco para o desenvolvimento das erosões. Tem sido demonstrada que a característica da erosão dental pode diferir dependendo da natureza dos ácidos (extrínsecos ou intrínsecos). Pacientes com BN que consomem uma dieta com pouca acidez exibem erosões nas superfícies linguais e oclusais dos dentes. Entretanto, quando bebidas ácidas como refrigerantes são consumidos, as lesões se apresentam nas superfícies linguais e vestibulares.

Russo et al. (2008) relatam o uso freqüente de bebidas ácidas para prática de esporte, uso anormal de cafeína para aumentar a energia ou para diminuir o reflexo de fome, que podem contribuir para o desgaste mineral dos dentes. Alguns pacientes ainda utilizam vinagre ou suco de limão para eliminar ou diminuir o sentido gustativo e controlar assim a fome.

Estudos sobre a prevalência de cárie dental em pacientes com transtornos alimentares são controversos. Alguns estudos demonstraram que o risco de cárie é variável, assim como na população em geral (Hurst et al., 1977; Stege et al., 1982; Milosevic; Slade, 1989; Alonso et al. 2001; Moor, 2004). Para alguns pesquisadores, a ingestão de carboidratos e açúcares pelos pacientes bulímicos nos episódios de compulsão alimentar favorece o desenvolvimento de cárie (Traebert; Moreira, 2001; Seabra et al., 2004). Portanto, a diferença nos índices de cáries de pacientes com transtornos alimentares pode ser atribuída à higiene bucal, cariogenicidade da dieta e uso medicamentos que

ocasionam xerostomia, sendo que a associação de frequência de vômitos com incidência de cárie ainda é incerta (Roberts; Li, 1987; Moor, 2004; Aranha et al., 2008).

O trauma da mucosa bucal e da faringe pode ser observado em pacientes com compulsão alimentar e aqueles que induzem o vômito. Este trauma pode ser causado tanto pela rápida ingestão dos alimentos quanto pela força na regurgitação (Ruff et al., 1992; Alonso et al., 2002), ocasionando lesões eritematosas na mucosa. O palato mole pode apresentar-se ulcerado devido a objetos utilizados para provocar o vômito, como dedos, pentes e escovas dentais. Outras alterações relatadas são queilite angular, candidose e herpes (Milosevic; Slade, 1989; Alonso et al., 2002; Frydrych et al., 2005). A redução de vitaminas e outros nutrientes, deficiência de ferro e outras alterações metabólicas decorrentes da precária alimentação afetam a biologicamente a mucosa bucal, ocasionando atrofia da mucosa. Geralmente esta atrofia é particularmente evidente na língua, e esta condição pode desencadear uma sensação de queimação difusa pela boca (Russo et al., 2008).

Assim como o índice de cárie, dados de alterações no tecido periodontal em pacientes com transtornos alimentares ainda não são conclusivos. A etiologia da doença periodontal é complexa e multifatorial. Fatores que influenciam a composição da microbiota, os mecanismos de defesa do hospedeiro e inerentes aos microrganismos podem ter influência no estabelecimento e na progressão das doenças periodontais. Como os pacientes acometidos por transtornos alimentares são jovens, a doença periodontal é raramente diagnosticada, mas gengivite, papilas interdentais hipertrofiadas devido à irritação constante do vômito ácido e a ressecção gengival e abrasão por escovação podem ser encontradas (Kleir et al., 1984; Abuchaim, 2002; Frydrych et al., 2005; Aranha et al., 2008).

A higiene bucal deficiente tem sido mais comumente reportada em pacientes anoréxicos do que em pacientes bulímicos, porém

sem haver diferenças estatísticas significantes (Roberts; Li, 1987; Moor, 2004). Essa observação é particularmente consistente quando se observa o acompanhamento de depressão em transtornos alimentares. Pacientes anoréxicos são menos interessados em práticas de higiene bucal do que pacientes bulímicos. Essa falta de interesse pode ser explicada pela natureza psico-patológica da AN. Já os pacientes bulímicos apresentam uma grande preocupação com a sua aparência física e, assim, é comum observar uma cuidadosa atenção à higiene bucal (Roberts; Li, 1987; Moor, 2004).

Hurst et al. (1977) demonstraram um alto índice de inflamação gengival em pacientes com AN restritiva quando comparados aos outros pacientes com transtornos alimentares. Em contraste, Milosevic & Slade (1997) demonstraram não haver diferença significativa nos índices de placa e sangramento gengival quando pacientes com AN e BN foram comparados com pacientes controles em idades semelhantes. A deficiência nutricional, especialmente em vitamina C, pode afetar o periodonto marginal predispondo a gengivite segundo Russo et al. (2008).

A xerostomia é o efeito colateral de muitos medicamentos psicotrópicos prescritos a pacientes com desordem alimentar (Barlett; Smith, 1994). Muitos pesquisadores reportaram redução do fluxo salivar não-estimulado em pacientes com compulsão alimentar e pacientes que provocam o vômito, porém não é observada redução no fluxo salivar estimulado, mostrando que não há alteração na secreção de glândulas salivares, mas sim quantidades menores de saliva devidos aos medicamentos ingeridos (Tylenda et al., 1991).

Segundo Alonso et al. (2001) as causas para a xerostomia podem ser decorrentes da desidratação crônica devido ao uso de laxantes, diuréticos e indução de vômito ou pelos medicamentos utilizados no tratamento dos transtornos alimentares, como antidepressivos, anticolinérgicos e tranqüilizantes. Por outro lado, a

sialorréia, quando presente, é observada com maior freqüência em pacientes bulímicos.

Moor (2004) relata que a xerostomia apresentada em alguns pacientes anoréxicos e bulímicos pode também reduzir a capacidade tampão e o pH salivar.

A sialoadenose ou sialose é um processo não inflamatório, indolor, freqüentemente recorrente, que acomete as glândulas salivares, especialmente as parótidas (Coleman et al., 1998). É uma manifestação bucal em pacientes com transtornos alimentares que apresentam compulsão e indução de vômito. (Mandel; Kaynar, 1992; Coleman et al., 1998). O aumento das glândulas parótidas pode ser observado em 37% dos anoréxicos e 53% dos bulímicos, sendo a glândula mais afetada (10 a 50%), seguida das glândulas sublinguais (Alonso et al., 2002). Nos estágios iniciais da desordem alimentar, o aumento pode aparecer e desaparecer e, à medida que a doença progride, o inchaço se torna mais persistente. A deformidade facial mostra-se nítida, ocasionando um rosto inchado e com a mandíbula quadrada, tornando-se um fator complicador no estado psicológico do paciente acometido pelo transtorno alimentar (Alonso et al., 2002). Sob palpação, a glândula se apresenta macia e geralmente não há relato de dor. Ao exame intra-oral, observa-se o ducto e fluxo salivar normal, além da ausência de inflamação (Mandel; Kaynar, 1992). Histologicamente, há aumento do tamanho dos ácinos, número maior de grânulos, infiltração gordurosa e fibrose não inflamatória (Tylenda et al., 1991; Coleman et al., 1998; Aranha et al., 2008; Russo et al., 2008).

A etiologia do aumento da glândula salivar é incerta. Roberts e Li (1987) atribuem a hipertrofia à compulsão alimentar e a relação entre a rápida e massiva estimulação das glândulas pela ingestão de grandes quantidades de alimento. Muitos pesquisadores têm associado o aumento da parótida com o vômito recorrente. A estimulação colinérgica das glândulas durante o vômito ou a estimulação das

glândulas pela ativação das papilas gustativas são os dois mecanismos propostos para o inchaço glandular (Mandel; Kaynar, 1992). Coleman et al. (1998) relataram que as causas são extremamente variáveis, mas que podem ser consideradas por desordens endócrinas, metabólicas ou neurogênicas. Entre as causas mais importantes associadas às doenças sistêmicas estão à má nutrição, diabetes *mellitus*, hipotireoidismo, alcoolismo, cirrose e a Anorexia Nervosa.

Sialometaplasia necrosante também é descrita em pacientes com BN, é uma lesão auto-limitada de etiologia indefinida. O reconhecimento desta lesão é essencial para evitar erros de diagnóstico e terapia cirúrgica desnecessária (Alonso et al., 2001; Solomon et al., 2007; Russo et al., 2008).

2.2 Microbiota bucal

A cavidade bucal é o primeiro segmento do trato digestivo e é composta por inúmeras estruturas diferentes, como os dentes, sulcos gengivais, mucosas e a língua, que por sua vez, apresentam características físicas, químicas e nutricionais diferentes, que podem predispor a eliminação ou colonização por microrganismos (Hägg et al., 2004; Prieto-Prieto; Calvo, 2004; Aas et al., 2005). Além disso, muitos fatores, intrínsecos e extrínsecos, têm efeito sobre a composição, atividade metabólica e potencial patogênico da diversificada microbiota bucal. Portanto, a cavidade bucal representa um ecossistema complexo e heterogêneo, sendo habitada por mais de setecentas espécies de microrganismos, aeróbios e anaeróbios, que colonizam os diferentes nichos bucais (Smith et al., 2001; Senpuku et al.; 2003; Hägg et al., 2004; Prieto-Prieto; Calvo, 2004). A maioria destes microrganismos são comensais, mas alguns destes podem atuar como patógenos oportunistas

e ocasionar infecções. Sendo, portanto, importante o conhecimento dos microrganismos presentes na cavidade bucal para o diagnóstico e correto tratamento de doenças sistêmicas e bucais decorrentes destes patógenos (Paster et al., 2001).

Grande parte das doenças bucais apresenta provável etiologia microbiana e associação com microrganismos específicos, como exemplo, a cárie com estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos. Os testes microbiológicos podem contribuir para aumentar a qualidade de diagnóstico, tratamento e prevenção destas doenças além do entendimento sobre o papel dos microrganismos em relação ao desenvolvimento da lesão (Dahlén, 2006).

Como demonstra a literatura, enterobactérias, estafilococos e leveduras são considerados microrganismos oportunistas (Slots et al., 1988; Rams et al., 1990; Slots et al., 1990; Flynn; Slots, 1993; Pannuti et al., 2001), e, portanto, reservatórios bucais destes patógenos potenciais podem ocasionar infecções e comprometer a vida de pacientes debilitados ou imunocomprometidos, uma vez que a cavidade bucal pode representar uma porta de entrada para estas infecções (Jobbins et al., 1992; Dahlén, 1993; Senpuku et al. 2003).

As leveduras do gênero *Candida* pertencem à família *Cryptococcaceae*, subfamília *Candidoideae*, que compreende as principais leveduras patogênicas para o homem (Lacaz et al., 2002; Koga-Ito et al., 2006). São organismos unicelulares e eucarióticos (Webb et al., 1998). O gênero *Candida* é composto por aproximadamente duzentas espécies de leveduras não produtoras de endósporos (Lacaz et al., 2002; Sudbery et al., 2004; Koga-Ito et al., 2006), porém sete espécies, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* e *C. kefyr*, são as mais relacionadas com infecções humanas (Eggimann et al., 2003). Em 1995, uma nova espécie, *C. dubliniensis*, foi identificada nos casos de candidose bucal em indivíduos HIV positivos (Sullivan et al., 1995; Coleman et al., 1997; Sullivan et al., 2005). *C. dubliniensis*

apresenta características fenotípicas similares à *C. albicans* (Sudbery et al., 2004, Sullivan et al., 2005), além de exibir elevada aderência às células epiteliais bucais e desenvolver rapidamente resistência *in vitro* ao fluconazol (Sullivan; Coleman, 1998). Esta espécie foi primeiramente isolada em candidoses orofaríngeas de pacientes infectados por HIV, mas já tem sido encontrada em outros grupos de pacientes, inclusive indivíduos saudáveis (Jabra-Rizk et al., 2000; Manfredi et al., 2002; Ahmad et al., 2004; Chavasco et al., 2006; Back-Brito et al., 2008). Segundo Eggimann et al. (2003), leveduras do gênero *Candida* são habitantes normais da microbiota humana da pele, trato gastrointestinal e geniturinário, podendo ser isolado também no trato respiratório. São considerados patógenos oportunistas, pois são capazes de crescer em cavidades e penetrar tecidos em resposta a alterações fisiológicas no hospedeiro (Soll, 2002). O crescente isolamento de leveduras como agentes infecciosos estão relacionados com o uso de antibióticos de amplo espectro, agentes antineoplásicos, cateterismo endovenoso e o aumento do número de pacientes com neutropenia e imunossupressão (Hazen, 1995; Gilfillan et al., 1998; Laupland et al., 2005).

Microrganismos do gênero *Candida* são membros comensais na microbiota bucal normal, estando presente, em média, em 40 a 60% da população humana saudável (Webb et al., 1998; Ellepola; Samaranayake, 2000; Boriollo et al., 2003; Sánchez-Vargas et al., 2005). *C. albicans* é a espécie prevalente, representando 60 a 70% do total dos isolados. O reservatório bucal primário deste microrganismo é o dorso da língua, a partir do qual o restante da mucosa, superfície dos dentes, biofilme dentário e saliva tornam-se colonizados secundariamente (Webb et al., 1998; Ellepola; Samaranayake, 2000; Koga-Ito et al., 2006). Ainda não está claro por que alguns indivíduos são portadores de *Candida* spp. e outros não. Entretanto, fatores nutricionais, interações com a microbiota bacteriana e presença de anticorpos específicos na saliva parecem ser relevantes (Stenderup, 1990; Challacombe, 1994; Koga-Ito et al., 2006).

Fatores predisponentes sistêmicos ou locais parecem ser essenciais para a patogênese das infecções bucais (Ellepola; Samaranayake, 2000). Dentre os fatores sistêmicos, a utilização de antibióticos de amplo espectro, esteróides, terapia citotóxica, desnutrição, diabetes *mellitus* e imunossupressão são as mais freqüentemente citadas na literatura (Jobbins et al., 1992; Jabra-Rizk et al., 2001; Komiyama et al., 2004; Belazi et al., 2004; Belazi et al., 2005; Kumar et al., 2005). Higiene bucal inadequada, presença de próteses, aparelhos ortodônticos, periodontite crônica, respiração bucal, dieta, xerostomia e fumo são considerados fatores predisponentes locais importantes (Jorge et al., 1997; Darwazeh et al., 2002; Grimoud et al., 2003; Belazi et al., 2004; Hägg et al., 2004; Belazi et al., 2005; Kadir et al., 2005; Monroy et al., 2005; Soysa; Ellepola, 2005)

C. albicans também tem sido fortemente relacionada à cárie dental, juntamente com estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos. Esta levedura tem sido isolada com alta freqüência de dentina de lesões de cárie em crianças, cerca de 70 a 97% dos isolados. Além deste freqüente isolamento em lesões de cárie, outras características como a capacidade de adesão a hidroxiapatita, extrema tolerância a pH ácidos e a produção de ácidos orgânicos, corroboram com a hipótese desta levedura contribuir para a patogênese da cárie (Beighton et al., 2004; Carvalho et al., 2006; Klinke et al., 2009).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. Na atualidade este gênero é composto por 33 espécies, sendo que 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. São microrganismos imóveis, anaeróbios facultativos, catalase positivos e não formam esporos (Marsou et al., 1999; Murray et al., 2000; Tarkowski et al., 2001; Ueno & Jorge, 2006). Entre os estafilococos, a espécie coagulase-positiva *S. aureus* e duas espécies coagulase-negativas, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, são encontradas com freqüência em infecções humanas (Koneman et al., 2008; Tarkowski et al., 2001).

S. aureus é, sem dúvida, o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. Este microrganismo pode ser encontrado, na forma comensal, na pele de 20 a 50% da população humana. Aproximadamente 20% da população apresentam colonização permanente por este microrganismo no epitélio nasal, e 60% são portadores transitórios. A taxa de colonização é aumentada em pacientes de hemodiálise, diabéticos, aids, pacientes pós-cirúrgicos e usuários de drogas parenterais (Shuter et al., 1996; Memmel et al., 2004; David et al., 2005). A colonização pode ser considerada um fator de risco para subsequente infecção em indivíduos da comunidade ou hospitalizados (Shuter et al., 1996; Foster, 2005). Esta espécie está relacionada com grande variedade de infecções, entre elas estão: infecções cutâneas (furúnculos, impetigo e abscessos), infecções sistêmicas (osteomielites, endocardites, septicemia e artrites) e as causadas por suas toxinas, como infecções alimentares, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (Novick et al., 2001; Götz, 2004; David et al., 2005; Foster, 2005; Yamasaki et al., 2005; Koneman et al., 2008).

S. epidermidis têm sido descrito como a principal espécie implicada em infecções nosocomiais. Este microrganismo geralmente afeta pacientes imunocomprometidos, indivíduos hospitalizados para quimioterapia e outras doenças malignas, transplantados e bebês prematuros. Sua patogenicidade está relacionada à formação de biofilme em próteses cardíacas, articulares e vasculares. *S. epidermidis* é responsável por 50 a 70% das infecções relacionadas à implantação de cateter. A única infecção em um indivíduo adulto imunocompetente e com ausência de prótese vinculada a este microrganismo é a endocardite (Von Eiff et al., 2002).

Embora haja extensa literatura sobre *Staphylococcus aureus* e estafilococos coagulase-negativos, pouca atenção tem se dado à cavidade bucal como reservatório destes microrganismos. Os estafilococos têm sido frequentemente isolados da cavidade bucal de

crianças, adultos saudáveis, usuários de prótese total, idosos e em alguns grupos com patologias sistêmicas em fase terminal, como em artrite reumatóide e pacientes com doenças hematológicas malignas (Miyake et al., 1991; Jobbins et al., 1992; Jacobson et al., 1997; Jackson et al., 1999; Jackson et al., 2000; Martins et al., 2002; Monroy et al., 2005). Espécies de *Staphylococcus* presentes na cavidade bucal podem, na vigência de condições apropriadas, causar infecção local ou sistêmica, pois apresentam potencial de disseminação e são capazes de colonizar outros órgãos. Algumas infecções na cavidade bucal são relacionadas à *S. aureus*, incluindo queilite angular, infecções endodônticas, osteomielites na mandíbula, infecções da parótida e mucosites (Patti et al., 1994; Jackson et al., 2000; Smith et al., 2001; Smith et al., 2003).

O isolamento de *S. aureus* meticilina-resistentes (MRSA) a partir da cavidade bucal também tem sido relatado (Suzuki et al., 1997; Smith et al., 2003). Estudo longitudinal realizado por Suzuki et al. (1997) sugeriu que MRSA podem persistir na boca por mais de cinco anos. Os autores concluíram que a cavidade bucal pode ser considerada um reservatório potencial de MRSA para infecção nosocomial.

Staphylococcus spp. também tem sido isolados tanto de sítios subgingivais de indivíduos com doença periodontal quanto de sítios periodontalmente saudáveis. Estes microrganismos produzem inúmeros fatores de virulência, incluindo leucocidina que podem estar envolvidas no desenvolvimento da infecção periodontal, comprometendo a atividade dos neutrófilos no sistema de defesa (Iwase et al., 1990; Rams et al., 1990; Loberto et al., 2004; Murdoch et al., 2004). Outro mecanismo importante é a resistência bacteriana frente às penicilinas com a produção de β -lactamases. Sendo a doença periodontal uma infecção polimicrobiana, a emergência de microrganismos que produzem esta enzima na região subgingival irá também proteger bactérias não produtoras da ação de antibióticos β -lactâmicos, ocasionando falha terapêutica ou recorrência da doença (Handal et al., 2004).

Back-Brito (2006) isolou estafilococos de 86,6% dos indivíduos do grupo controle e em 84,4% do pacientes soropositivos para o HIV a partir de coleta por enxágüe bucal. Nos sítios periodontais, utilizando cones de papel esterilizados para coleta, também houve isolamento similar de estafilococos entre os grupos (40% no grupo HIV e 31,1% grupo controle). Com metodologia semelhante, Querido (2006) relatou o isolamento de estafilococos na cavidade bucal de 96% em pacientes com tuberculose e 92% no grupo controle, em no sulco gengival de 38% dos tuberculosos e de 44% dos indivíduos controle. As elevadas prevalências deste microrganismo na cavidade bucal humana sugerem que esta pode constituir um reservatório de estafilococos tão importante quanto às fossas nasais.

A família Enterobacteriaceae constitui um grande grupo heterogêneo de bastonetes Gram-negativos. A família inclui numerosos gêneros, como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, entre outros. Foram definidos mais de 25 gêneros e cento e dez espécies ou grupos. Entretanto, as Enterobacteriaceae clinicamente importantes compreendem vinte a 25 espécies, enquanto as outras espécies são encontradas raramente (Brooks et al., 2000; Ueno; Jorge, 2006). Estes gêneros foram classificados com base nas propriedades bioquímicas, estrutura antigênica e seqüenciamento dos ácidos nucléicos (Murray et al., 2000; Ohkusu, 2000).

Os pacientes imunocomprometidos ou debilitados são altamente suscetíveis às infecções adquiridas nos hospitais e a resistência aos antibióticos têm se tornado intensamente comum (Pitout et al., 1997; Motta et al., 2003; Kaye et al., 2004; Koneman et al., 2008).

As bactérias desta família podem produzir uma grande variedade de doenças humanas, incluindo septicemia, infecções urinárias e intestinais. O aumento de infecções por estes microrganismos tem sido relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos, quimioterapia, terapia com imunossuppressores e em indivíduos com comprometimento do

sistema imunológico (Motta et al., 2003; Koneman et al., 2008). Algumas espécies dos gêneros *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* estão associadas à doença nos seres humanos, como septicemia, febre entérica, gastroenterite (shigelose), peste bubônica e peste pneumônica (Murray et al., 2000; Velge et al., 2005; Parsot, 2005; Tierrez; Garcia-Del Portillo, 2005), enquanto outras, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, são membros da microbiota normal, e podem causar infecções oportunistas (Achtman et al., 2004; Branger et al., 2005; Arpin et al., 2005; Manchanda et al., 2005; Endimiani et al., 2005).

Os membros da família Pseudomonadaceae caracterizam-se como bacilos Gram-negativos, retos ou ligeiramente curvos, aeróbios, a maioria das cepas apresenta motilidade por meio de um ou mais flagelos polares (Murray et al., 2000; Enoch et al., 2004; Koneman, et al., 2008). O gênero *Pseudomonas* é composto por numerosas espécies, subdivididas de acordo com suas diferenças bioquímicas e genéticas. São microrganismos ubíquos encontrados no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água. São também encontradas em todo ambiente hospitalar em reservatórios úmidos, como equipamentos de tratamento respiratório e diálise e até mesmo em soluções desinfetantes. Esta ampla distribuição ambiental é assegurada por suas exigências simples de crescimento. Muitos compostos orgânicos podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, e algumas cepas podem até mesmo crescer em água destilada ou soro fisiológico, utilizando diminutas quantidades de nutrientes (Murray et al., 2000; Ueno; Jorge, 2006).

Apesar de sua presença ubíqua, capacidade de crescimento em praticamente qualquer ambiente, propriedades de virulência e resistência antimicrobiana, estes microrganismos não são patógenos comuns, sendo as infecções por *Pseudomonas* spp., consideradas basicamente oportunistas (Murray et al., 2000; Ruimy et al., 2001, Smith; Iglewski, 2003; Secko, 2005; Koneman et al., 2008).

Pseudomonas aeruginosa é a espécie mais freqüentemente isolada de amostras clínicas. As infecções são em geral observadas em sítios onde existe tendência ao acúmulo de umidade, como em traqueostomia, cateteres permanentes, queimaduras, ouvido externo e feridas externas exsudativas, podendo também produzir infecções no trato urinário e respiratório inferior. É um patógeno oportunista que pode causar morbidade ou mortalidade em pacientes queimados, com fibrose cística ou imunocomprometidos (Ha; Jin, 1999; Ruimy et al., 2001; Smith; Iglewski, 2003; Kipnis et al., 2006 Koneman et al., 2008).

As bactérias da família Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae são exaustivamente estudadas pela área médica, sendo conhecida sua patogenicidade no organismo humano, porém, na cavidade bucal, estas bactérias não eram consideradas patogênicas. Alguns trabalhos relataram a associação de enterobactérias com ulcerações bucais em pacientes HIV positivos, porém esta associação pode não estar obrigatoriamente relacionada à causa da ulceração, podendo ser as enterobactérias invasores secundários (Tsang; Samaranayake, 2000; Figueirêdo et al., 2001). Entretanto, a presença destas bactérias na cavidade bucal pode servir de reservatório, podendo comprometer gravemente a vida de indivíduos debilitados (Slots et al., 1990; Slots et al., 1991; Santos; Jorge, 1998; Santos et al., 2002; Senpuku et al., 2003).

Fatores sistêmicos e locais parecem estar relacionados com o aumento da prevalência de enterobactérias e/ou pseudomonas na cavidade bucal, porém este assunto permanece bastante controverso, já que alto percentual de isolamento destes microrganismos é relatada em pacientes adultos saudáveis (Santos; Jorge, 1998) assim como em pacientes HIV positivos (Tsang; Samaranayake, 2000; Back-Brito, 2006) e em outros grupos de pacientes com diferentes alterações sistêmicas (Jobbins et al., 1992; Öhman et al., 1995; Pannuti et al., 2001; Senpuku et

al., 2003; Querido, 2006). O isolamento subgingival de bacilos entéricos e pseudomonas em indivíduos com e sem doença periodontal também tem sido observada (Slots et al., 1990; Barbosa et al., 2001; Santos et al., 2002). Back-Brito (2006) identificou enterobactérias e pseudomonas na cavidade bucal de 77,7% e em 40% nos sítios periodontais do grupo HIV, sendo que o grupo controle apresentou menor frequência de isolamento em ambos os locais de coleta (44,4% na cavidade bucal e 6,6% nos sítios periodontais). Prevalência menor foi observada por Querido (2006) na cavidade bucal dos indivíduos com tuberculose pulmonar (56%) e no sulco gengival de (18%).

Enterococcus spp. são cocos Gram-positivos, dispostos aos pares ou pequenas cadeias, são ovóides ou ligeiramente alongados, anaeróbios facultativos, não possuem capacidade de formar esporos bacterianos (Kirschner et al., 2001; Koneman, 2008). São microrganismos residentes normais do trato gastrointestinal e biliar humano, podendo também ser encontrados na cavidade bucal, vagina e uretra. Também são isolados em outros mamíferos, pássaros, répteis, alimentos e água contaminados (Saraiva et al., 1997; Murray, 2000; Petersen; Dalsgaard, 2003; Franzetti et al., 2004; Sedgley et al, 2004; Sedgley et al, 2005; Werner et al., 2007). Espécies de *Enterococcus* têm sido descritas como um dos principais microrganismos responsáveis por infecções urinárias (Sader et al., 1995; Franzetti et al., 2004; Colodner, et al. 2006; Butler, 2006; Roe et al., 2008). A partir da década de 90, o gênero *Enterococcus* tem chamado atenção devido ao grande número de cepas resistentes a vários antimicrobianos convencionais, sendo uma das causas mais frequentes de infecções nosocomiais nos EUA e França (Mundy, 2000, Franzetti et al., 2004; Strabelli et al., 2006). A emergência de cepas de enterococos resistente à vancomicina (VRE) tem sido relatada devido à sua presença e disseminação em ambiente hospitalar, constituindo um grande risco para pacientes hospitalizados (Lavigne, 2005; Leavis et al., 2006). Estas bactérias são responsáveis por 5-20% de todos os casos de

endocardite e são a 5^a causa mais freqüente de endocardite valvular e também tem sido relacionado com infecções do peritônio, septicemias e meningites (Gullberg, 1989; Murray, 1990; Graninger, 1992; Rodriguez-Barradas et al., 1992; Werner et al, 2007). *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies prevalentes, correspondendo mais de 80% dos isolados clínicos das infecções enterococócicas (Butler, 2006). O isolamento de outras espécies tais como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. casseliflavus*, *E. gilvus* sp. nov., *E. pallens* sp. nov. de amostras humanas também já foi relatado (Kirschner et al., 2001; Tyrrell et al., 2002). A presença de *Enterococcus* spp. na cavidade bucal tem sido recentemente citada na literatura. Sedgley et al. (2006) analisaram a presença de *E. faecalis* em vários sítios na boca e verificaram maior prevalência em ventre de língua e mucosa jugal de pacientes adultos. Os autores observaram ainda que pacientes com gengivite ou periodontite apresentavam maior isolamento de *E. faecalis* em relação a pacientes periodontalmente saudáveis. Em outro estudo, Sedgley et al. (2004) analisaram a presença de *Enterococcus* spp. por métodos fenotípicos e genotípicos. Enterococos foram encontrados em 11% das amostras da cavidade bucal de pacientes que estavam em tratamento endodôntico e 1% entre os estudantes de odontologia avaliados. Chomicz et al. (2004) relataram maior prevalência de *Enterococcus* spp. em pacientes portadores de diabetes *mellitus* insulino dependentes (60%), quando comparados a pacientes controle (6,6%). Komiyama (2008) avaliou 240 indivíduos saudáveis de diferentes faixas etárias. Do total, 16,6% dos indivíduos foram positivos para *Enterococcus* spp. na cavidade bucal, com média de 121,73 UFC/ml de enxágüe bucal. De acordo com as diferentes idades, houve isolamento em 10% dos pacientes de 4-11 anos, 4% no grupo de pacientes entre 12-17 anos, 14% para o grupo de 18-34 anos, 30% dos pacientes entre 35-59 anos e 25% no grupo acima de 60 anos e não houve diferença entre indivíduos do gênero feminino e masculino. Este estudo avaliou ainda o perfil de susceptibilidade destes isolados a diferentes antimicrobianos e

observou que 12% foram resistentes a vancomicina, 16% a amoxicilina, 54% a tetraciclina, 18% a ampicilina, 20% a cloranfenicol e 46% a eritromicina.

Na área odontológica, *Enterococcus* spp. têm sido fortemente associados a patologias endodônticas, em particular a insucessos terapêuticos (Gomes et al., 2004; Fouad, 2005). Alta resistência aos efeitos antimicrobianos do hidróxido de cálcio, medicamento freqüentemente empregado na terapia endodôntica, tem sido relatada (Evans et al., 2002; Kayaoglu et al., 2005; Appelbe e Sedgley, 2007). O mecanismo de ação para esta resistência parece ocorrer por meio de um sistema de bomba de prótons, mantendo níveis ótimos do pH citoplasmático deste microrganismo. Outra observação importante é que o aumento do pH até 8,5 potencializa *in vitro* a adesão de *E. faecalis* ao colágeno, o que poderia explicar a predominância desse microrganismos em infecções persistentes. (Kayaoglu; Orstavik, 2004).

A cárie é definida como uma doença multifatorial e infecto-contagiosa, de caráter crônico, causada pelo processo de desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta pelas bactérias (Leites et al., 2006). É considerada como uma doença multifatorial, pois depende da interação de fatores essenciais, como o hospedeiro, representado pelos dentes e a saliva, a microbiota da região e a dieta consumida, em função do tempo. Para que a cárie ocorra, estes fatores devem estar presentes e interagir em condições críticas: o hospedeiro com dentes susceptíveis, colonizados por microrganismos cariogênicos, consumindo com freqüência uma dieta rica em sacarose.

S. mutans tem sido relacionado o principal agente etiológico da cárie, principalmente por serem microrganismos anaeróbios facultativos, acidogênicos e acidúricos, e capazes de formar polissacarídeos intra e extracelulares, além da capacidade de colonizar a superfície dentária (De Lorenzo, 2004; Leites et al., 2006; Koga-Ito; Jorge,

2007). São cocos Gram-positivos usualmente dispostos em cadeias curtas ou médias, foram classificados considerando diferenças de virulência e características de sorotipagem, juntamente com mais sete espécies (*S. cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus*) no grupo denominado estreptococos do grupo *mutans* (EGM). Deste grupo, *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentam potencial cariogênico em seres humanos e são os microrganismos mais associados à cárie dentária de superfície lisa. As demais espécies de estreptococos são encontradas normalmente na cavidade bucal de animais, mas podem também ser isoladas na cavidade bucal humana, porém com baixo potencial cariogênico em seres humanos. (Leites et al., 2006; Koga-Ito; Jorge, 2007).

Historicamente, lactobacilos foram os primeiros microrganismos relacionados ao desenvolvimento de cárie (Badet; Thebaud, 2008). Os lactobacilos podem ser isolados da saliva, dorso da língua, mucosa vestibular, palato duro e em menor número na superfície dentária, representando cerca de 1% da microbiota bucal (Koga-Ito; Jorge, 2007; Badet; Thebaud, 2008). As espécies *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* são as mais freqüentemente isoladas. (Ahumada et al., 2003). São bastonetes Gram-positivos, que crescem em pH ácido (5,4) e anaeróbios facultativos (Rogosa et al., 1951).

São microrganismos produtores de ácido lático e com excepcional tolerância ácida (Klinke et al., 2009) e estão associados com a progressão das lesões de cárie (Beighton, Brailsford, 1998; Koga-Ito, Jorge; 2007). Alguns estudos também demonstram forte correlação da presença destes microrganismos com alto e freqüente consumo de carboidratos, portanto contagens do número destes microrganismos em 1 ml de saliva (UFC/ml) são utilizadas para avaliar o efeito das alterações dietéticas (Badet; Thebaud, 2008).

A análise do risco de cárie visa identificar pessoas que requerem medidas preventivas e, assim, melhorar a eficiência dos

programas de saúde pública (Badet; Thebaud, 2008). Exames para determinação dos níveis salivares de estreptococos do grupo *mutans* (EGM) e de lactobacilos auxiliam na avaliação do risco de cárie (De Lorenzo; 2004), contudo, como se trata de uma doença multifatorial, outros indicadores devem ser observados (Fontana, 2006).

O isolamento de microrganismos e os testes dependentes de cultivo ainda constituem a maioria dos procedimentos efetuados e trazem como vantagem ser a única forma de verificar a sensibilidade destes microrganismos frente a diferentes fármacos antimicrobianos (De Lorenzo, 2004). Mas os estudos com técnicas moleculares têm demonstrado que a diversidade microbiológica tem sido subestimada nas técnicas de cultura, pela existência de muitos organismos de difícil ou impossível cultivo (Relman; Falkow, 1992; Relman, 1993; Amann et al., 1995; Kroes et al., 1999; Relman, 1999; Kolenbrander, 2000; Kazor et al., 2003; Song et al., 2003; Aas et al., 2005). Na cavidade bucal humana, microrganismos não-cultiváveis têm sido descritos como a maior parte da microbiota em indivíduos saudáveis e em várias infecções bucais (Kroes et al., 1999; Paster et al., 2001; de Lillo et al., 2006; Ledder et al., 2007). Alguns estudos relatam que apenas cerca de 50% das bactérias bucais podem ser cultivadas (Paster et al., 2001; Aas et al., 2005). Nos últimos anos, essa metodologia tem sido empregada na Odontologia expandindo os achados referentes à identificação de diversos microrganismos na cavidade bucal (Kroes et al., 1999; Kolenbrander, 2000; Paster et al., 2001; Kazor et al., 2003; Aas et al., 2005; Marchini et al., 2007; Campos et al., 2008) e tem tornado possível reavaliar a patogênese das infecções bucais (Munson et al., 2004).

Os genes codificadores da subunidade menor do RNA ribossomal são extremamente conservados em um organismo do mesmo gênero ou espécie, mas apresentam diferenças em organismos de outro gênero ou espécie. A utilização destas seqüências em estudo filogenéticos demonstraram a distinção dos organismos em três domínios:

Bacteria, Archaea e Eukaria, em oposição a classificação tradicional em apenas procariotos e eucariotos. Por esta técnica, muitos gêneros e espécies de bactérias foram reclassificadas e renomeadas, a classificação de bactérias não-cultiváveis foi possível e as relações filogenéticas podem ser determinadas. Esta técnica tem tido um crescente aumento na aplicabilidade clínica, devido à acurácia de identificação, que é um dos fatores mais importantes nos laboratórios de diagnóstico microbiológico (Woo et al., 2008). Para o estudo de bactérias têm-se empregado comumente a amplificação dos genes do rRNA 16S (Relman; Falkow, 1992; Kroes et al., 1999; Relman, 1999; Kolenbrander, 2000; Paster et al., 2001; Song et al., 2003; Aas et al., 2005; Marchini et al., 2007) e para fungos busca-se a amplificação dos genes do rRNA 28S, 18S e 5,8S do rRNA (Campos et al., 2008). Essa metodologia é fortemente dependente dos programas desenvolvidos na bioinformática, para análise dos resultados (Devulder et al., 2003; Woo et al., 2008). Um dos algoritmos comumente utilizados é o *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (Altschul et al., 1997) que oferece o recurso de comparar um fragmento de DNA a uma base de dados de seqüências, apresentando uma pontuação de similaridade ("escore") entre as seqüências comparadas (Gibas; Jambeck, 2001). O avanço da biologia molecular e domínio de novas técnicas possibilitaram a utilização de dados digitais obtidos a partir dos ácidos nucleotídeos e aminoácidos, trazendo novo incremento ao estudo das relações filogenéticas (Judd et al, 1999), o qual permitiu a criação do termo filogenia molecular. Assim, agora, é possível fazer comparações de quaisquer grupos de organismos, não importando o nível taxonômico que eles se encontrem (Nei; Kumar, 2000). Mudanças evolucionárias, baseadas em características moleculares, possivelmente estão associadas a padrões, que podem ser representados por modelos matemáticos, os quais simulam tais relações, mesmo de organismos menos relacionados. As árvores filogenéticas ou cladogramas evidenciam as relações filogenéticas (evolutivas) entre os organismos que as

constituem, respeitando traços comuns a partir dos quais se pretende estabelecer as relações de parentesco (Miyaki et al., 2001). Graficamente as árvores filogenéticas são constituídas de pontos (nós) ligados por linhas (ramos), os quais representam as relações de ancestralidades dos organismos (Schneider, 2003).

Utilizando a técnica molecular de amplificação do gene 16S rRNA bacteriano, muitos estudos tem demonstrado a diversidade bacteriana em diversas condições bucais, na saúde ou infecções. Aas et al. (2005) avaliaram a microbiota bacteriana de nove sítios da cavidade bucal de indivíduos sadios por testes moleculares, entre eles: dorso e lateral da língua, vestíbulo, palato duro e mole, gengiva labial, tonsila, tecidos moles e biofilme supra e subgengival. Os autores relataram que as espécies comuns em todos os sítios foram as do gênero *Gemella*, *Granulicatella*, *Streptococcus* e *Veillonella*, e que não encontraram microrganismos relacionados à cárie e doença periodontal nestes indivíduos.

A microbiota bacteriana subgengival tem sido investigada por inúmeros estudos por esta técnica, e microrganismos não previamente identificados pelos métodos de cultivo foram descritos (Kroes et al., 1999; Sato et al., 1999; Paster et al., 2001; Hutter et al., 2003; De Lillo et al., 2006; Ledder et al., 2007; Faveri et al., 2008).

Kroes et al. (1999) utilizaram técnicas de cultivo e moleculares para avaliar o biofilme subgengival de um paciente, e comparando os resultados obtidos com os testes, concluíram que houve maior diversidade de microrganismos utilizando a amplificação do 16S rDNA do que a encontrada por cultivo. Paster et al. (2001) avaliaram a microbiota subgengival de diferentes grupos, como 5 indivíduos com saúde periodontal, 11 com doença periodontal refratária, 9 periodontite crônica, 4 gengivite ulcerativa necrosante e doença periodontal em 2 pacientes HIV-positivos. Estes autores encontraram uma comunidade bacteriana diversificada, com 347 espécies ou filotipos por análise de

clonagem. Um total de 72 espécies ou filotipos foram identificados na análise de 268 clones de indivíduos saudáveis e 275 espécies ou filotipos foram identificados na análise de 347 clones nos indivíduos com doença periodontal. Estes autores relataram que esta diferença pode estar relacionada ao número de clones avaliados para os indivíduos saudáveis (apenas 10,6%), mas que um grande número de espécies ou filotipos (20 filotipos/espécies) foi identificado somente em sítios com doença periodontal.

A microbiota subgengival de indivíduos saudáveis e com doença periodontal também foi descrita por Ledder et al. (2007). Neste estudo, foram avaliados 47 pacientes (29 com doença periodontal e 18 com saúde periodontal). Os autores observaram que a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* está bastante relacionada à doença e que a presença de *Treponema socranskii* e *Pseudomonas* spp. são significantes indicadores de doença.

De Lillo et al. (2006) analisaram amostras de dois pacientes com periodontite crônica severa localizada por técnicas de cultivo e moleculares. Os autores encontraram *Spirochaetes* e *Synergistes* não descritos por Kroes et al. (1999), mas que também foram encontrados nos estudos de Paster et al. (2001), além de identificar *Chloroflexi*, microrganismo encontrado somente neste estudo. Os autores também relataram que não encontraram *A. actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia*, assim como no estudo de Kroes et al. (1999), mas que com frequência estes microrganismos estão presentes neste nicho em pequena proporção e, em estudos com cultivo, meios seletivos são normalmente utilizados para maximizar a detecção destas espécies. Comparando as técnicas de cultivo e moleculares realizadas neste estudo, *Bacteroides*, *Actinobacteria* e *Fusobacteria* foram mais bem representadas na técnica de cultivo, porém outros filos, como *Spirochaetes* e *Chloroflexi* foram somente identificadas pelas técnicas moleculares. Os autores concluem que a combinação de técnicas de

cultivo e moleculares são recomendadas para otimizar a detecção de diferentes espécies de microrganismos associada com seu habitat.

A microbiota subgingival de pacientes com Periodontite Agressiva também foi investigada (Hutter et al., 2003; Faveri et al., 2008). Hutter et al. (2003) avaliaram 26 pacientes com Periodontite Agressiva avançada (pacientes com média de idades 46 - 49 anos) e comparando seus resultados com os de outros estudos (Kroes et al., 1999; Sato et al., 1999; Paster et al., 2001;) sugeriram que *Treponema socranskii* subsp. *buccale*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, *Porphyromonas gingivalis* and *Porphyromonas endodontalis* estão associados com periodontite e não com sítios saudáveis. Dez pacientes com Periodontite Agressiva foram avaliados utilizando a técnica molecular de amplificação do gene 16S rRNA bacteriano por Faveri et al. (2008). Neste estudo, o gênero *Selenomonas* foi predominante nos sítios com doença periodontal e *S. sputigena* foi a espécie mais freqüente, sendo detectada em 9 dos 10 indivíduos e com alta proporção (20% do total da população bacteriana). Um resultado interessante foi observado, *A. actinomycetemcomitans*, considerado um periodontopatógeno nos casos de Periodontite Agressiva não foi identificado pela análise de biblioteca pelo 16S rRNA. Contudo, quando utilizado o PCR com *primers* específicos, sete indivíduos foram positivos para este microrganismo. Esta espécie tem sido reportada no biofilme subgingival em pequenas proporções em relação à microbiota total.

Embora significantes avanços tenham ocorrido quanto a ações de prevenção bucal, a cárie dentária continua sendo um importante problema de saúde pública, e, portanto, a microbiota cariogênica permanece sendo exaustivamente estudada (Munson et al., 2004; Chhour et al., 2005; Kuramitsu; Wang, 2006; Marsh, 2006; Aas et al., 2008). Técnicas de cultivo têm demonstrado que a microbiota predominante é composta por *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei*, espécies de *Actinomyces* e de *Veilonella* em ordem quantitativa decrescente em

lesões de cárie coronárias, mas que outras espécies de estreptococos e bactérias proteolíticas podem estar relacionadas a lesões de avançadas de cárie (Munson et al., 2004).

Munson et al. (2004) utilizando técnicas de cultivo e técnicas moleculares também verificaram que há predominância de bactérias Gram-positivas, particularmente os gêneros *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e *Streptococcus*. Algumas espécies, como por exemplo, de *S. mutans*, foram detectadas em maior proporção por técnicas moleculares do que por cultura, porém os autores ressaltam que as técnicas moleculares podem detectar também células não viáveis, que não trariam um diagnóstico relevante e contribuições significantes para o tratamento. Neste estudo, os autores também relataram que membros do filo *Actinobacteria* foram pouco representados nos resultados da análise molecular.

Chhour et al. (2005) avaliaram a diversidade bacteriana em cáries avançadas. Grande quantidade de lactobacilos foi encontrada, perfazendo 50% das espécies, seguida do gênero *Prevotella* que correspondeu 15% do total. Outros gêneros, espécies e famílias encontradas foram: *Selenomonas* spp., *Dialister* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium* spp., *Lachnospiraceae*, *Olsenella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp. e *Pseudoramibacter alactolyticus*. Aas et al. (2008) avaliaram a composição bacteriana de lesões de cárie em dentição primária e permanente em crianças e adultos jovens. Os autores observaram que *S. mutans* não estava presente no esmalte íntegro e em lesões de mancha branca de pacientes com cárie e que somente em lesões superficiais ou profundas em dentina havia este microrganismo. Neste estudo, os autores concluem que outros microrganismos podem estar envolvidos com o desenvolvimento de lesões de cárie, como espécies do gênero *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Atopobium*, além de outros estreptococos.

É descrito na literatura que a maioria das lesões endodônticas e periapicais são ocasionadas por infecção, portanto, relacionadas a microrganismos. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com técnicas independentes de cultivo para avaliar a microbiota nestas lesões (Rolph et al., 2001; Munson et al., 2002; Siqueira; Rôças, 2005; Siqueira et al., 2005; Sakamoto et al., 2006; Siqueira et al., 2007; Sakamoto et al., 2008).

Rolph et al. (2001) utilizaram técnicas de cultivo e técnicas moleculares para avaliar a microbiota de canais radiculares com infecções endodônticas primárias e refratárias. Os autores concluíram que a técnica molecular foi mais sensível do que o cultivo para identificar bactérias no canal radicular e que há diferenças na microbiota entre os casos de infecção primária e refratária. Munson et al. (2002) também utilizaram as duas técnicas com coleta de amostras de 5 pacientes com lesões periapicais crônicas e obtiveram conclusões semelhantes ao descrito por Rolph et al. (2001). Siqueira et al. (2005) analisaram a diversidade de espiroquetas em canais radiculares infectados utilizando iniciadores específicos e a presença de *Deferribacteres* pela amplificação de 16S rDNA. Os autores observaram a presença destes microrganismos e sugeriram que estes microrganismos devem fazer parte da etiologia da doença periradicular. Estes autores também desenvolveram um estudo para verificar a presença de bactérias não cultiváveis em infecções primárias e persistentes. Nas infecções primárias, as espécies ou filotipos predominantes foram *Dialister invisus*, *Synergistes oral* clone BA121 e *Olsenella uli* e somente estas três espécies foram encontradas nas infecções persistentes. Em 2007, Siqueira et al. utilizaram o seqüenciamento do gene 16S rRNA para a identificação de bactérias cultivadas em anaerobiose. Neste estudo os autores relataram a dificuldade ou impossibilidade de se identificar fenotipicamente várias bactérias, e concluem que esta técnica pode contribuir para uma melhor

identificação das espécies isoladas e também revela a ocorrência de microrganismos não caracterizados.

Sakamoto et al. (2008) avaliaram a microbiota de canais radiculares em que ocorreu insucesso no tratamento endodôntico. Os autores relataram que uma grande proporção de microrganismos não-cultiváveis poderiam estar envolvidos na etiologia das lesões de periápice pós-tratamento.

Outras lesões bucais também têm sido abordadas com esta metodologia (Paster et al., 2002; Kazor et al., 2003; Marchini et al., 2007; Campos et al., 2008).

Lesões avançadas de noma em crianças foram avaliadas por Paster et al. (2002). Os autores constaram que espiroquetas e microrganismos do gênero *Fusobacterium*, que haviam sido sugeridos como patógenos potenciais para esta doença, foram detectados em apenas um paciente. No entanto, como um pequeno número de lesões foram avaliadas (4 crianças), não foi possível neste estudo associar espécies específicas com a doença. A microbiota do dorso de língua de 6 pacientes com halitose e 5 pacientes sem evidências de halitose foi analisada por Kazor et al. (2003) que constataram haver diferenças entre os grupos estudados. As espécies mais associadas com halitose foram *Atopobium parvulum*, *Eubacterium sulci*, *Solobacterium moorei* e *Streptococcus* spp.

Marchini et al. (2007) avaliaram a microbiota de úlceras aftosas recorrentes e detectaram 57 filotipos, em que 11 eram de espécies conhecidas. Os autores relataram que a presença de uma comunidade bacteriana nestas lesões não confirma a hipótese da etiologia ser exclusivamente bacteriana, porém é possível a influência das mesmas nesta condição.

O biofilme microbiano das lesões de estomatite por prótese foi analisado por Campos et al. (2008). Os autores encontraram 29 espécies exclusivamente no grupo de estudo e 26 no grupo controle e

sugerem que o biofilme de estomatite é de caráter polimicrobiano e de certa especificidade. A presença de *Candida* spp. foi observada no biofilme de ambos os grupos estudados, o que levou os autores a reforçar a hipótese da importante participação bacteriana na estomatite, pois mesmo com a sua presença os indivíduos não desenvolveram estomatite.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi investigar a diversidade microbiológica existente na cavidade bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa.

Os objetivos específicos foram:

- a) considerando-se que pacientes anoréxicos e bulímicos apresentam alterações sistêmicas e bucais, um dos escopos deste estudo foi avaliar a presença de leveduras do gênero *Candida*, estafilococos, enterobactérias, pseudomonas, enterococos, estreptococos e lactobacilos na cavidade bucal destes pacientes e comparar os resultados com indivíduos controle, por meio de técnicas de cultivo;
- b) avaliar a diversidade microbiana na cavidade bucal destes pacientes e de indivíduos controle utilizando métodos moleculares independentes de cultivo, por amplificação de DNA total com iniciadores genéricos para o gene do RNA 16S bacteriano e região D1/D2 do gene 28S rRNA eucariótico, clonagem e seqüenciamento.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aspectos éticos

A pesquisa está de acordo com os princípios éticos, seguindo diretrizes e normas que regulamentam a pesquisa envolvendo seres humanos, conforme as resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, sendo que o projeto de pesquisa foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, sob o protocolo nº 061/2006 (Anexo A). O mesmo projeto foi apresentado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesp da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo de pesquisa nº 0181/07 (Anexo B).

Os procedimentos descritos não trouxeram dor, desconforto ou risco de espécie alguma ao paciente, que foi conscientizado do intuito da pesquisa e, se optou por participar do projeto, o fez por meio de seu consentimento livre e esclarecido mediante a assinatura em formulário próprio (Apêndice A e B).

4.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos no presente estudo um total cinquenta e nove pacientes, sendo 56 do gênero feminino e 3 do gênero masculino,

entre 19 e 58 (média de 27,29 anos e desvio padrão de 7,24) com transtorno alimentar. Foram coletados 32 pacientes diagnosticados clinicamente como portadores de Anorexia Nervosa e 27 com Bulimia Nervosa, que estavam sob tratamento no Ambulatório de Bulimia e Transtornos Alimentares do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (AMBULIM – IPqHCFMUSP). Este estudo foi realizado em colaboração com o Dr. Táki Athanássios Cordás responsável pelo AMBULIM e Dra. Eliane de Fátima Gomes Barbosa Prado supervisora da equipe odontológica do IPqHCFMUSP.

Para o grupo controle, foram selecionados 59 indivíduos saudáveis com perfil semelhante quanto à idade, gênero e condições bucais (presença de próteses ou aparelhos ortodônticos, indivíduo fumante e de acordo com o índice de dentes cariados, perdidos ou obturados - CPO–D) dentre os indivíduos atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

4.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos diabéticos não controlados, gestantes, pacientes usuários de prótese total (superior e inferior) e que apresentem lesões sugestivas de candidose. Foram também excluídos indivíduos que tenham sido submetidos à antibioticoterapia (antibacterianos ou antifúngicos) nos 45 dias que antecederam o momento da coleta.

4.4 Anamnese e exame clínico

Foram avaliados durante a realização da anamnese os dados pessoais e as condições clínicas geral e bucal de todos os indivíduos. Esses dados foram registrados em fichas apropriadas para a análise posterior (Apêndice C e D).

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos a exame clínico, pelo mesmo examinador, para avaliação das condições de saúde bucal. Foram avaliados o CPO–D, a presença de lesões bucais, próteses, aparelho ortodôntico e a condição periodontal. Para a realização deste exame foram utilizados espelho plano nº 5 e sonda exploradora devidamente esterilizados. Os exames foram realizados em ambiente de consultório odontológico no IPqHCFMUSP. Todos estes dados referentes ao exame clínico foram anotados em uma ficha clínica (Apêndice C e D).

4.5 Coleta das amostras

A coleta de material da cavidade bucal foi realizada por bochecho com de 10 ml de solução fisiológica esterilizada tamponada com fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 2 mM KH_2PO_4 , 10 mM Na_2HPO_4 , 3 mM KCl, pH 7,2) contida em um recipiente universal estéril descartável. Após um minuto de bochecho os indivíduos devolveram a solução para o mesmo recipiente (Samaranayake et al., 1986).

Também foi realizada a coleta de biofilme dental supragengival marginal com auxílio de explorador dental esterilizado, de acordo com Sedgley et al. (2006). Esta coleta foi realizada na superfície vestibular do incisivo central superior direito, incisivo central inferior

esquerdo, dos primeiros molares superiores (dentes 11, 31, 16, 26) e na superfície lingual dos dois primeiros molares inferiores (dentes 36 e 46); sendo que na ausência de um destes dentes, coletou-se do dente adjacente. A coleta de material destas superfícies baseou-se nos dentes incluídos para a determinação do Índice de Higiene Oral Simplificado (Greene; Vermillion, 1964). Após a coleta do biofilme dental, a amostra foi transferida para um tubo plástico (*Eppendorf*) contendo 2ml de PBS.

Os recipientes foram mantidos em uma bolsa térmica com gelo até serem transportados para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, respeitando-se o período máximo de três horas entre a coleta e o processamento das amostras.

4.6 Processamento das amostras

As amostras de enxágüe bucal foram centrifugadas por 10 minutos, a 2.500 *g* e o sobrenadante foi descartado. O depósito foi ressuspenso em 2,5 ml de PBS e homogeneizado em agitador mecânico de tubos (*Vortex*) por 30 segundos. A partir desta, foram obtidas diluições 10^{-2} a 10^{-6} em solução salina (NaCl 0,85%) em tubos de ensaio (15x150 mm). De cada amostra (suspensão de concentração final e diluições) foi semeado 0,1 ml em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Índia) acrescido de 0,1 mg/ml de cloranfenicol (Inlab, Brasil); ágar Manitol (Oxoid, Inglaterra); ágar MacConkey (Difco, USA); ágar Enterococcosel (BBL, França); ágar Mitis Salivarius (Himedia, Índia) acrescido de bacitracina (Inlab, Brasil) e sacarose (Synth, Brasil); ágar Rogosa SL (Himedia, Índia) acrescido de ácido acético glacial (Synth, Brasil) e ágar infuso cérebro-coração (*Brain Heart Infusion Agar* - BHI, Difco, USA) acrescido de 10% de sangue.

Para as análises moleculares, 100 µl de cada enxágüe bucal (suspensão) foi transferido para tubo plástico (*Eppendorf*) contendo 100 µl de uma solução tampão contendo 0,3 M sacarose, 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1 mM EDTA, e foi armazenado a -80°C. A alíquota excedente de enxágüe bucal foi ainda transferida para tubo plástico (*Eppendorf*) para armazenamento da suspensão pura a -80°C.

As placas foram incubadas a 37°C por um período de 48 horas, exceto as placas de ágar Mitis Salivarius bacitracina sacarose que foram incubadas a 37°C por um período de 48 horas com 5% de CO₂. Quando não houve crescimento nas placas de Sabouraud dextrose com cloranfenicol, estas foram mantidas por mais 5 dias a temperatura ambiente.

Após o crescimento, as colônias foram examinadas quanto às características morfológicas (cor, tamanho, forma, superfície e halos) e contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml). As colônias de estreptococos do grupo *mutans*, lactobacilos e em ágar sangue foram apenas contadas, para os demais microrganismos foram realizados esfregaços em lâminas e corados pelo método de Gram para cada colônia com morfologia diferente.

Para obtenção de culturas puras foram realizados os seguintes procedimentos: as colônias sugestivas de leveduras foram semeadas em tubos com rosca (13 mm x 100 mm) contendo ágar Sabourad dextrose inclinado; as colônias de cocos Gram-positivos isoladas do ágar Manitol e os isolados de bacilos Gram-negativos foram semeados em tubos contendo o meio gelose inclinado. Os tubos foram incubados por 24 horas a 37°C e após crescimento, foram armazenados para posterior identificação, sendo que os tubos de leveduras foram armazenados em geladeira e os tubos de gelose conservados em temperatura ambiente. Cocos Gram-positivos foram isolados com auxílio da agulha de platina do ágar Enterococcosel e foram semeados em tubos contendo 2 ml de *Tryptic Soy Broth* (TSB – Difco, USA). Após incubação

por 24 h a 37°C, uma alíquota de 0,1 ml foi inoculada em tubos plásticos (Eppendorf) contendo 0,6 ml de BHI acrescido de glicerol (20%), que foram incubados por 24 h a 37°C. Estes tubos foram mantidos em congelador a -20°C até a realização dos testes posteriores.

As amostras coletadas de biofilme supragengival foram homogeneizadas em agitador mecânico de tubos (Vortex) durante 30 s. Cada amostra foi então centrifugada por 10 min a 7.500 *g* e o sobrenadante descartado. Estas amostras foram ressuspensas em solução tampão e congeladas em freezer -80°C para os procedimentos moleculares.

4.7 Identificação das amostras de *Candida* spp.

4.7.1 Sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França)

As culturas obtidas foram novamente semeadas em ágar Sabourad dextrose e incubadas por 24 h a 37°C. Para a identificação foi utilizado o sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França) conforme as instruções do fabricante. Foi preparada uma suspensão de 2 ml em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%), padronizada na escala 2 de McFarland (Biomérieux, França) e em seguida, 100 µL desta suspensão foi adicionada ao meio de cultura API C Medium fornecido no kit. Após delicada homogeneização, cada poço da tira de identificação foi preenchido, deixando uma superfície ligeiramente convexa.

Em seguida, cada tira foi incubada a 30°C e a leitura realizada em duas etapas: a primeira após 48 h e a segunda após 72 h de incubação. A leitura dos testes foi realizada de acordo com o manual do kit e os resultados foram anotados em formulário próprio. Os resultados

apresentados resultaram em um código numérico que foi inserido no programa acessado pelo endereço eletrônico <https://apiweb.biomerieux.com> que identifica a espécie correspondente, sendo adotado como porcentagem aceitável de identificação um valor acima de 80%.

4.7.2 Identificação genotípica de *C. dubliniensis*

As amostras identificadas como *C. dubliniensis* pelo sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França) foram submetidas a uma segunda metodologia de identificação, proposta por Donnelly et al. (1999) e Mähniß et al. (2005).

Para a extração do DNA genômico, os isolados foram inicialmente semeados em ágar Sabouraud dextrose e incubados por 24 h a 37°C. A seguir, uma pequena porção de cada crescimento foi coletada, com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, e foi transferida para um tubo plástico (*Eppendorf*) contendo 75 µL de água destilada esterilizada. Em seguida, os tubos foram mantidos em banho-maria a 95°C por 10 minutos para a extração do DNA das amostras. Decorrido este período, as amostras foram centrifugadas a 7.500 g por 20 minutos, e o sobrenadante foi transferido para novo tubo plástico (*Eppendorf*) (Donnelly et al. 1999).

A identificação de *C. dubliniensis* consiste de uma PCR (reação em cadeia da polimerase) com dois pares de iniciadores, um genérico para fungos (Uni-f: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3' e Uni-r: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3') que amplifica uma região do gene 28S do cistron ribossomal; e outro específico para *C. dubliniensis* (DUBF Act-f: 5'GTATTTGTCGTTCCCTTTC-3' e DUBR Act-r: 5'-GTGTTGTGTGCACTAACGTC-3') que amplifica uma região do intron do

gene da actina I. A reação de PCR foi feita com o “kit” Go Taq da Promega. Para uma reação de 25 μ L, foi utilizado 1X do tampão para PCR, 3 mM MgCl₂, 0,2mM dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,4 μ M de cada iniciador, 5 μ l do produto total da extração, 0,2 μ L de Taq DNA polimerase (5U/ μ L) e água desmineralizada esterelizada q.s.p.

A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler (Hybaid Limited), segundo o programa que consta de uma desnaturação inicial à 95°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de: 30 segundos à 95°C (desnaturação da cadeia recém sintetizada), 30 segundos à 58°C (anelamento dos iniciadores) e 1 minuto à 72°C (elongação da cadeia).

Em todas as reações foram utilizadas amostras de *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. dubliniensis* (NCFP 3108) como controle positivos da reação e um controle negativo, sem adição de DNA molde.

Uma alíquota de 5 μ L do volume total da reação de PCR foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. O tamanho esperado para os amplicons delimitados pelos iniciadores genéricos é de 614 pares de base (pb), sendo, portanto visualizadas as bandas em ambas as espécies. O par de iniciadores específicos para *C. dubliniensis* resultam em amplicons de 288 pb, resultando em uma segunda banda visível para esta espécie.

4.8 Identificação das amostras de *Staphylococcus* spp.

4.8.1 Produção de catalase

A verificação da produção de catalase foi realizada para diferenciar estafilococos (prova positiva) de estreptococos (prova negativa). Culturas puras foram semeadas por esgotamento em ágar BHI, e incubadas a 37°C durante 24 horas. Após esse período, parte de uma colônia isolada foi transferida para uma lâmina. Adicionou-se sobre o esfregaço uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A prova foi considerada positiva quando houve formação de bolhas de oxigênio (efervescência), indicando a presença da enzima catalase (Koneman et al., 2008). Foi utilizado como controle positivo *S. aureus* (ATCC 6538) e controle negativo *S. mutans* (ATCC 35688).

4.8.2 Sistema API[®] Staph (Biomérieux, França)

Os isolados de estafilococos coagulase-negativos foram semeados em ágar TSA e incubadas a 37°C por 24 horas. As suspensões foram feitas nas ampolas de API Staph Medium com turvação equivalente a escala 0,5 de MacFarland e foram inoculadas nas galerias imediatamente após a sua preparação. A condição de anaerobiose, necessária em alguns testes, foi obtida cobrindo os poços com óleo de parafina. As galerias foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura de cada galeria foi feita consultando o quadro de leitura fornecido no manual do sistema. Os resultados das reações espontâneas foram anotados nas fichas, e em seguida foram revelados os testes que necessitavam da

adição de reagentes. Após a interpretação dos resultados, a identificação foi feita a partir do perfil numérico como descrito previamente no item 4.7.1.

4.9 Identificação das amostras de Enterobactérias e *Pseudomonas*

A identificação dos bacilos Gram-negativos foi feita por meio de testes bioquímicos contidos nas galerias do Sistema API[®] 20 E (Biomérieux, França).

4.9.1 Sistema API[®] 20 E (Biomérieux, França)

As culturas puras de bacilos Gram-negativos foram semeadas por esgotamento em ágar MacConkey e incubadas por 24 horas a 37°C. Uma colônia isolada de cada meio foi coletada com alça de platina e suspensões de cada amostra foram feitas em tubos de ensaio (13 x 100 mm) contendo 5 ml de água destilada esterilizada. Com auxílio de pipetas automáticas as suspensões foram inoculadas em cada poço das galerias. Para criar uma condição de anaerobiose, em determinados testes, foi adicionado óleo de parafina. Em seguida, as galerias foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada da mesma maneira descrita nos itens anteriores.

4.10 Identificação das amostras de *Enterococcus*

A identificação dos cocos Gram-positivos foi feita por meio de testes bioquímicos contidos nas galerias do Sistema API® 20 STREP (Biomérieux, França).

4.10.1 Sistema API® 20 STREP (Biomérieux, França)

As culturas puras foram semeadas em ágar Columbia (Himedia, Índia) acrescido de sangue a 10% e incubadas por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento, foi preparada uma suspensão em 3 ml de água destilada esterilizada, padronizada na escala 4 MacFarland (Biomérieux, França). Esta suspensão foi inoculada em alguns poços da tira. Para outros testes o excedente da suspensão foi adicionada ao caldo API GP Medium (Biomérieux, França) fornecida. Após homogeneização, esta suspensão foi inoculada nos respectivos tubos. Para as condições de anaerobiose necessárias em alguns testes, foi adicionado óleo de parafina na parte superior dos respectivos poços. As galerias foram incubadas a 37°C e a leitura realizada em duas etapas após 4 e 24 horas de incubação. A leitura dos testes foi realizada consultando o quadro de leitura fornecido no manual do kit. Após 4 horas de incubação, os resultados foram anotados em formulário próprio do kit. Alguns testes necessitaram ser revelados por meio da adição de reagentes e a leitura dos resultados foi realizada após 10 minutos da adição do mesmo. Após a primeira leitura, as galerias foram retornadas a estufa a 37°C até completar 24 horas de incubação. Após esse período foi realizada a leitura dos demais testes. Os resultados apresentados em código

numérico foram inseridos no programa como descrito previamente no item 4.7.1

4.11 Processamento das amostras para identificação molecular

Os métodos moleculares para a identificação de microrganismos seguiram os procedimentos descritos por Paster et al., (2001). Foram selecionados cinco amostras representativas dos grupos Anorexia Nervosa, Bulimia Nervosa e controle para esta etapa do estudo, de acordo com a ficha clínica dos pacientes (Apêndice E). O processamento laboratorial foi realizado no Laboratório de Genética Molecular e Genomas do Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), em colaboração com Professor Dr. Francisco Gorgônio da Nóbrega (Anexo C) e o doutorando Adolfo José da Mota.

4.11.1 Extração do DNA genômico: protocolo para bactérias (modificado de Sambrook e Russell, 2001).

As amostras coletadas do enxágüe bucal e de biofilme supragengival foram descongeladas e centrifugadas a 7.500 *g* por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados da coleta por enxágüe bucal foram ressuspensos em 100 μ l de uma solução contendo 0,3 M sacarose, 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 1 mM EDTA e em 5 μ l da solução de lisozima (*lysozyme*, Sigma, USA) (2mg/50 μ l), e foram mantidos à 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 5 μ l da solução de Proteinase K (Merck, USA) (1 mg/50 μ l) e 12 μ l de SDS a 10%. As amostras foram incubadas a 55°C por 2 horas, agitando os tubos a cada 30 minutos. Decorrido este período, as amostras foram

centrifugadas por 10 minutos a 7.500 *g*, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo plástico (*Eppendorf*).

Foi adicionado aos tubos 1/20 do volume de Tris-HCl, 1 M pH 8,5 e volume a volume da solução de Fenol, Clorofórmio, Álcool Isoamílico (Merck, USA) (FCI) na proporção 25:24:1, respectivamente. Em seguida, foram homogeneizados em agitador mecânico de tubos (*Vortex*) seguido de centrifugação a 7.500 *g*. por 10 minutos. Os sobrenadantes foram coletados com cautela para que não houvesse contaminação com o FCI Foi adicionado 2 vol. de éter etílico, nova agitação mecânica seguida de uma centrifugação por 5 minutos a 7.500 *g*. O éter foi aspirado em um sistema a vácuo. Foi adicionado RNase (USB) para uma concentração final de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e incubado a 37 °C por 1h. Repetiu-se a extração com FCI e éter. Após a última extração com éter, os tubos foram mantidos abertos em um banho seco (*Thermolyne Type 16500*) à 42°C por 10 minutos para retirar o restante de éter da solução.

Para a recuperação do DNA genômico foi adicionado 20 μg de acrilamida linear como carreador, 1/20 do volume de 5M NaCl e 3 volumes de etanol absoluto. A solução foi mantida em -20°C por 30 minutos e em seguida foi centrifugada por 15 minutos à 7.500 *g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado por duas vezes tendo uma centrifugação intermediária por 5 minutos a 7.500 *g*. Os tubos permaneceram aberto em temperatura ambiente para a evaporação completa do etanol e em seguida o precipitado foi redissolvido em 30 μl de 10 mM TE, pH 7,5.

4.11.2 Extração de DNA genômico: protocolo para fungos (modificado de Philippsen et al., 2004)

As amostras coletadas do enxágüe bucal e de biofilme supragengival foram descongeladas e centrifugadas a 7.500 *g* por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido a um tubo plástico (*Eppendorf*) contendo 100 μ l de uma solução de lise da parede celular (0,9 M sorbitol; 0,1 M EDTA; 50 mM dithiothreitol - DTT, Calbiochem, USA; Zymolyase® 165 μ g por mL, ICN, USA). Os tubos foram incubados em banho-maria 37°C por 30 minutos. Após este período, foram centrifugados a 2.500 *g*. por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o depósito foi ressuspensionado em outra solução para lise da membrana plasmática (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% SDS). Em seguida, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos para a extração total do DNA. Decorrido este período, foi acrescentado às amostras 60 μ l 5M de acetato de amônio (Quimex, Brasil) e foram mantidas no gelo por 20 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 *g*. por 15 minutos. Cerca de 130 μ l do sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo plástico contendo 3 μ L de acrilamida linear como carreador (BRL, USA) e 150 μ L de isopropanol, o sistema foi homogeneizado e mantido em congelador a -20°C por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 7.500 *g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 200 μ L de etanol 80% e centrifugação 5 minutos a 7.500 *g*. Os tubos permaneceram aberto em temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol. O precipitado foi redissolvido em 30 μ L de tampão TE/RNAse (10mM TE, 10 μ g/mL RNAse, pH 7,5).

4.11.3 Amplificação do gene 16S rRNA bacteriano e do gene 28S rRNA de fungos e regiões ITS vizinhas

Os gene 16S (bacteriano) e região D1/D2 do gene 28S (fungos) ambos do cistron ribossomal foram amplificados nas condições usuais usando um conjunto de iniciadores genéricos que amplifica bem para a grande maioria de bactérias e fungos. O tamanho esperado do amplicom para bactérias era de 1800 pb e para fungos de 600 pb.

A PCR para bactéria foi feita com o kit GoTaq da Promega. Para uma reação de 25 μ l, foi utilizado 1X do tampão para PCR, 3 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,4 μ M dos iniciadores D88 e E 94 (Quadro 1), 5 μ l do produto total de extração, 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) e água desmineralizada esterelizada q.s.p. A mesma reação foi realizada para fungos trocando-se apenas os iniciadores para Uni-f e Uni-r.

Quadro 1: Descrição dos iniciadores utilizados

Primer	Seqüência	Referência
D88	5' GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG	Paster et al., 2001
E94	5'GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA	Paster et al., 2001
Uni-f	5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG	Donnelly et al., 1999
Uni-r	5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG	Donnelly et al., 1999

A amplificação foi realizada no termociclador Express Thermal Cycler (Hybaid Limited) com um programa para fungos e outro para bactérias. O programa para fungos constou de uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de: 30 s a 95°C, 30 s a 58°C e 50 s a 72°C. Ao término dos 30 ciclos, para que a atividade terminal transferase da Taq DNA polimerase adicionasse uma base adenina às extremidades das cadeias criando pontas coesivas nos amplicons, foi procedido um único ciclo de alongação à 72ª por 10 minutos.

O programa para bactérias constou de uma desnaturação inicial à 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de: 40 s a 95°C, 30 s a 58°C, 2 min a 72°C. Ao término dos 35 ciclos, foi realizado um único ciclo de alongação final a 72°C por 10 minutos.

Após as amplificações pela PCR, alíquotas de 2 µl dos produtos pós-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (10 mg/ml). Após o término da eletroforese o gel foi exposto em um transluminador Fotodyne (FOTO/UV-26), usando máscara de proteção Fotodyne acoplada à máquina Kodak DC290 Digital para fotodocumentação. A análise foi feita através do software Kodak 1D 3.5.3 (Scientific Image Systems – Kodak)

4.11.4 Quantificação em espectrofotômetro

A quantificação do produto de amplificação também foi realizada com o objetivo de obter melhores resultados na clonagem. Um microlitro do produto de PCR foi ressuscitado em 49 μL de água destilada (diluição de 50 vezes) e quantificado por espectrofotometria (Spectrophotometer U 2001, HITACHI). O programa mede a absorvância nos comprimentos de onda de 260, 280 e 320 nm. Para converter o valor obtido com a leitura em 260 nm para a concentração de DNA em $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ foi usada a seguinte equação: $\text{WL}_{260} \times K \times \text{Diluição} = \text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Em que WL_{260} é o valor da leitura no comprimento de onda de 260 nm, K é a constante para o DNA (50) e a diluição usada para a amostra quantificada.

4.11.5 Procedimentos de clonagem

As clonagens e manipulações respectivas com DNA seguiram protocolos clássicos (Sambrook; Russell, 2001) e utilizamos o sistema TOPO-TA (Invitrogen, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Este vetor tem extremidades coesivas complementares às extremidades existentes nos amplicons e incorpora uma topoisomerase que efetua a ligação diretamente (Figura 1). As transformações de bactérias foram feitas com células competentes da linhagem TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen, USA). Realizamos uma reação para um volume final de 1,5 μL , 25% da sugerida pelo manual. Foi usado 25 ng do produto de PCR ($\sim 0,5\mu\text{l}$), 0,25 μl de *Salt Solution*, 0,25 μl do vetor e água Milli Q q.s.p. A mistura foi incubada a 23 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos.

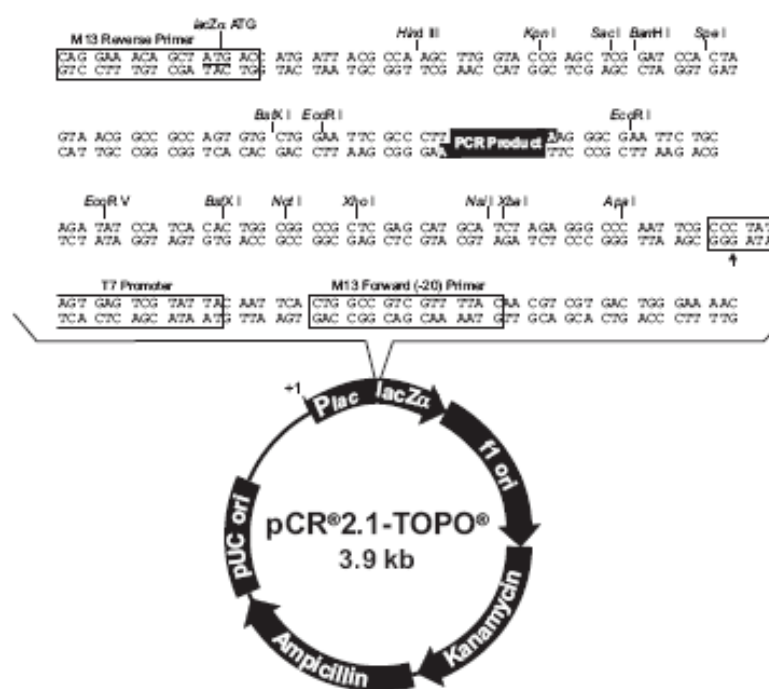


Figura 1: Mapa do vetor de clonagem (Manual do TOPO TA cloning Kit – Invitrogen)

O volume total da ligação foi adicionado em 200 μ l de suspensão de células competentes TOP 10, do próprio kit de clonagem, após homogeneização delicada, foi colocado no gelo por 30 min. Foi aplicado um choque térmico a 42°C por 30 s, seguido de gelo por 1 min. Em seguida, foi adicionado 300 μ l do meio SOC. (Invitrogen, USA) diretamente no tubo das células competentes. Estes tubos foram colocados no incubador rotatório (Classic C24, USA) 250 r.p.m. por 1 hora a 37°C.

Decorrido este período, o volume total foi semeado para crescimento das colônias. O crescimento foi feito em placas de Petri contendo o meio de Luria-Bertani (Himedia, Índia), com ampicilina (USB,

Reino Unido) (LA), antibiótico necessário para a seleção dos clones contendo o vetor e 40 µl de X-GAL (USB, Reino Unido) (40 mg X-GAL dissolvidos em 1 ml de N,N-dimetilformamida, Merck, Alemanha). As placas foram incubadas a 37°C por no máximo 24 h.

Os clones brancos (provavelmente contendo o inserto) foram coletados e repicados em meio LA e permaneceram na estufa a 37°C por 24h.

4.11.5 Preparação do DNA plasmidial

As preparações do DNA plasmidial (pDNA) para o seqüenciamento foram feitas utilizando a “*boilling prep*” descrita por Marra et al. (1999), assim como uma adaptação do procedimento de lise alcalina de Birnboim (1983).

Mini preparações dos plasmídeos foram realizadas em placas *deep well* para 96 amostras (Marra et al., 1999) com o meio Luria-Bertani (LB) e incubação a 37°C, 250 r.p.m., por 24 horas. Após o crescimento, as placas foram centrifugadas a 2.000 *g*, a 20°C por 10 minutos. Foi desprezado o sobrenadante, deixando drenar bem sobre papel absorvente. A ressuspensão foi em 25 µl de água destilada sob agitação (Vortex) por aproximadamente 10 minutos.

Em seguida, foi adicionado a placa 70 µl de solução de lise: Para 7 mL dissolvemos 4,2 mg de lisozima em 7mL de Stet Tween 20 (0,1 M NaCl; 5%, volume a volume de Tween 20; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 M Tris HCl pH 8,0), e acrescentamos 133 µl de RNAase (10 mg/ml), agitou-se por 1 minuto em agitador mecânico permanecendo em seguida por 5 minutos em temperatura ambiente.

As placas foram levadas ao forno de microondas em alta potência até que se observou fervura. O procedimento foi repetido por mais duas vezes. Imediatamente após, a placa foi removida do microondas e 300 μ l de água destilada gelada foi adicionada e homogeneizada (Vortex) por 15 segundos. As placas permaneceram no gelo por 30 minutos e em seguida foram centrifugadas por 30 minutos a 2.500 *g*, a 4°C.

Duzentos microlitros do sobrenadante foram coletados e transferidos para placas novas previamente preparadas com 100 μ l de 5 M acetato de amônio e permaneceram no freezer a -20°C por 30 minutos, em seguida foram e centrifugadas por 30 minutos a 2.500 *g*, a 4°C. Novas placas foram preparadas com 130 μ l de isopropanol (Merck, Alemanha), e 20 μ l de 2,5 M acetato de sódio (Quimex, Brasil) para receber 180 μ l do sobrenadante da placa anterior. A seguir, estas foram mantidas em freezer a -20°C por 30 minutos e posteriormente centrifugadas por 30 minutos a 2.500 *g*, a 4°C.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de pDNA lavado com 200 μ l de etanol (Merck, Alemanha) 80% por duas vezes com uma centrifugação intermediária a 2.500 *g*, a 4°C. por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante foi desprezado, seguindo-se secagem a vácuo por 5 minutos. A seguir, o precipitado foi ressuscendido em 30 μ l de TE 5 mM pH 7,5.

4.11.6 Seqüenciamento de DNA

As reações de seqüenciamento foram preparadas em microtubos estéreis de 0,2 ml. Para uma reação de 10 μ l foram utilizados 2,0 μ l de mix Kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing, 0,4 μ M

dos iniciadores 78SS e 79SR (um para cada reação) (Quadro 2) e aproximadamente 800 ng de pDNA e água Milli Q q.s.p.

Quadro 2: Descrição dos iniciadores 78SS e 79SR

Número	Iniciadores	Seqüência	Referência
78SS	M13 Fw	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT	TOPO TA cloning kit
79SR	M13 R	5' CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO TA cloning kit

A termociclagem constou de 40 ciclos de: 30 s a 95°C; 30 s a 50°C e 2 min a 60°C.

4.11.7 Precipitação das reações de seqüenciamento

Foi adicionado às amostras 6 µL do carreador glicogênio dissolvido em 5 M acetato de amônio, seguido de um pulso de centrifugação a 1.000 *g.* em centrífuga refrigerada e homogeneização em agitador de tubos (Vortex). Foram adicionados 50 µL de etanol 95% homogeneizando-se por inversão 3 vezes seguido de um pulso de 1.000 *g.* As amostras foram levadas ao freezer -80°C permanecendo a esta temperatura por 20 minutos.

As placas foram centrifugadas a 2.500 *g.* por 40 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado seguido de um pulso a 200 *g.* com os tubos invertidos sobre papel absorvente. Foram adicionados 110 µL de etanol 80% a cada amostra e foram centrifugadas por 15 minutos a 4°C a 2.500 *g.* Novamente o sobrenadante foi desprezado seguido de um pulso

a 600 g com os tubos invertidos sobre papel absorvente. O precipitado foi lavado mais uma vez com 110 μ L de etanol 80% e centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi então desprezado seguido de um pulso de 1.000 g com os tubos invertidos. Finalmente, as amostras foram submetidas à secagem a vácuo por exatamente 1 minuto.

As amostras foram ressuspensas em 10 μ L de formamida e em seguida submetidas à desnaturação por 5 min a 95°C antes de serem aplicadas no seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As configurações do aparelho adotadas seguiram as recomendações do fabricante.

4.12 Análise dos resultados

4.12.1 Análise dos resultados de isolamento e identificação fenotípica

A análise dos resultados da técnica de cultivo foi realizada através da comparação entre os resultados obtidos para o grupo de pacientes portadores de Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa em relação ao grupo controle. Foram ainda comparados os resultados entre os pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa e entre os pacientes com Anorexia Nervosa com subtipo Purgativo e com o subtipo Restritivo. Os dados obtidos para a contagem de microrganismos foram transformados em valores de logaritmo de unidades formadoras de colônia por mililitros (log de UFC/ ml) e a partir das medianas para os grupos em estudo foram realizadas a análise de variância, por meio do teste estatísticos de Mann-Whitney (nível de significância de 5%) para a comparação entre os grupos.

4.12.2 Análise das reações de seqüenciamento

As análises dos resultados obtidos após o seqüenciamento foi realizada em colaboração com o doutorando Luciano Bernardes do Departamento de Programa em Genética (Faculdade de Medicina – USP, Ribeirão Preto)

Para converter os cromatogramas obtidos pelo seqüenciador em arquivos tipo fasta, foi executado o programa Phred (Ewing; Green, 1998) configurado para gerar arquivos do tipo “phd.1”. Após este processamento foram verificados os comprimentos das seqüências, em pares de bases. Somente as seqüências cujo comprimento foi igual ou maior a 200 (duzentos) bases foram processadas adiante, aquelas cujos comprimentos não satisfizeram a esta condição foram eliminadas dos processamentos seguintes. Os arquivos selecionados foram processados pelo programa Phd2fasta que copiou dos arquivos “phd.1” as bases nucléicas e concentrou todas essas seqüências em formato fasta num único arquivo (multifasta de sequências), o mesmo foi feito para os valores de qualidade relativos as bases nucléicas, concentrando-os em um outro único arquivo (multifasta de qualidades). Em seguida, os arquivos multifasta foram analisados pelo programa Cross_match (<<http://www.phrap.org>>) para identificação dos trechos característicos dos vetores (pCR2.1-TOPO e pGEM-T Easy Vector) utilizados na clonagem dos fragmentos. Novamente foi checado o comprimento de cada seqüência e aquelas menores que 200 (duzentos) pares de bases foram eliminadas. Os dados foram separados em dois grupos por tipo de organismos (fungos e bactérias), e foram subdivididos de acordo com o local de coleta e os grupos estudados. Assim, para o grupo de organismos “bactéria”, todos aqueles nomeados como “controle bochecho” foram dispostos juntos (em um único diretório), o mesmo foi feito para “controle sulco gengival”, para “experimento bochecho” e ‘experimento sulco gengival. Os arquivos foram processados pelo

software de agrupamento (assembly) CAP3 (Huang; Madan, 1999), o qual criou os “Contigs” e “Singlets”. Foram realizadas as comparações dos arquivos “Contigs” e “Singlets” (seqüências fasta) com o banco de seqüências nucléicas não redundantes (nr), obtido do o banco de dados do GenBank (NCBI) (<<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db>) (atualizado em abril de 2009), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al, 1997), configurado na opção “blastn”.

Como tais fragmentos de genes expressos foram oriundos do DNA ribossomal, um banco de dados apenas com seqüências da mesma porção foi utilizado objetivando uma normalização dos dados a serem usados na construção das árvores, uma vez que as seqüências geradas nesse trabalho eram bastante divergentes em relação ao tamanho e oriundas de uma clonagem não orientada. O banco de dados do “Ribosomal Database Project” (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu/>; Cole et al., 2009; Cole et al., 2007) é uma coleção de dados específica da região 16S, extraídos do banco de dados de seqüências do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI). Para realizar as comparações entre os dados deste trabalho com os dados do banco RDP, foram selecionadas 424.473 seqüências (em 09/09/2009), cujos comprimentos foram iguais ou maiores que 1200 pares de base, com boa qualidade, tanto para organismos cultiváveis quanto para os não cultiváveis ou “*uncultured*”.

Por comparações, a cada clone foi inferida uma função biológica. Baseados nestas funções inferidas foram feitas categorizações automatizadas, por *script* desenvolvido em linguagem de programação “*Practical Extraction Report Language*” (<http://www.perl.org>), considerando o nome da espécie e sub-espécie e, assim, todos aqueles clones que tinham os mesmos nomes foram atribuídos à mesma categoria. Em seguida, foi selecionado como representante, dentro de cada categoria (filó, família, gênero e espécie), uma seqüência (do banco de dados RDP), observando critérios como: comprimento em pares de bases, identidade com o clone, *e-value* e *gaps*. Exceções foram aceitas apenas

para as categorias “*uncultured*”, as quais puderam ter mais de um representante. A seleção das seqüências representantes foi um processo manual baseado na experiência de profissionais da área da biologia.

Depois de selecionados, os representantes foram múltiplo alinhados pela ferramenta ClustalW (<http://www.clustal.org/>; Larkin et al., 2007), segundo parâmetros “*default*”. Em seguida foi construída a árvore filogenética, com auxílio da ferramenta MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>; Kumar et al., 2008; Tamura et al., 2007), utilizando como parâmetros: o método de agrupamento de vizinhos “*Neighbor-Joining*”(NJ), e modelo de substituição “Kimura 2 parâmetros”. Ainda, foram realizados 1000 testes de confiabilidade filogenética por “*bootstrap*” e, dados ausentes e “*gaps*” foram tratados por “*pairwise deletion*”.

Seguindo a mesma metodologia de bactérias, foram feitos os processamento de dados de fungos, porém o banco de dados utilizado foi o não-redundante do site do “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI).

5 RESULTADO

Foram coletadas amostras 59 pacientes, sendo 32 portadores de Anorexia Nervosa e 27 de Bulimia Nervosa, entre 19 e 58 com média de 27,29 anos e desvio padrão de 7,24.

O mesmo número de indivíduos pareados (quanto à idade, gênero e condições bucais) foram coletados para o grupo controle, a idade variou entre 18 e 57anos (média de 26,18 anos e desvio padrão de 6,9).

Os dados individuais referentes aos pacientes do grupo de estudo e indivíduos controle estão apresentados no Apêndice E (Quadro 3 e 4). Os dados referentes aos valores de UFC/ml e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados estão apresentados no Apêndice F (Tabela 15 e 16).

5.1 Métodos de cultivo

5.1.1 Gênero *Candida*

Dentre todos os indivíduos incluídos no estudo, 72 (61%) foram positivos para leveduras do gênero *Candida*, e 46 (39%) foram negativos. No grupo de estudo observou-se uma maior porcentagem de indivíduos positivos para leveduras do gênero *Candida* (74,6%) quando comparada com o grupo controle (47,45%). A tabela 1 representa a

distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para leveduras do gênero *Candida* em ambos os grupos.

Tabela 1 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para leveduras do gênero *Candida* nos grupos de estudo e controle

	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	44	74,6	30	50,84	74	62,71
Negativos	15	25,4	29	49,15	44	37,28
Total	59	100	59	100	118	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

Foram obtidas um total de 210 amostras de leveduras, sendo que 147 das amostras foram coletadas do grupo de Anorexia e Bulimia Nervosas e 63 do grupo controle. A tabela 2 mostra as espécies isoladas e as porcentagens identificadas em cada grupo por meio do sistema API 20 C AUX de identificação.

Tabela 2 - Identificação dos isolados de *Candida* spp. nos grupos de estudo e controle

Espécies	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	120	81,63	51	80,9	171	81,42
<i>C. dubliniensis</i>	8	5,44	3	4,76	11	5,23
<i>C. parapsilosis</i>	6	4,08	0	0	6	2,85
<i>C. glabrata</i>	4	2,72	3	4,76	7	3,33
<i>C. zeylanoides</i>	3	2,04	0	0	3	1,42
<i>C. tropicalis</i>	4	2,72	3	4,76	5	2,38
<i>C. krusei</i>	2	1,36	2	3,17	4	1,90
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	1	1,58	1	0,47
Total	147	100	63	100	210	100

n= número de indivíduos

% = porcentagem

Sete cepas foram identificadas como *C. famata*, com baixa porcentagem de discriminação e foram submetidas ao teste complementar de formação de hifa/pseudohifa proposto pelo sistema API para confirmação. Destas, 5 amostras foram identificadas como *C. albicans* e 2 como *C. tropicalis*. Todas as cepas identificadas como *C. dubliniensis* pelo sistema API20 C AUX foram confirmadas no teste molecular.

A comparação entre as contagens de leveduras (UFC/mL) na cavidade bucal do grupo de estudo (ANBN) e do grupo controle foi realizada pelo teste Mann-Whitney (5%). Observou-se que a distribuição das contagens de leveduras obtidas nos pacientes do grupo controle (mediana = 12,5 UFC/mL e faixa interquartil = 350 UFC/mL) diferiu da distribuição do grupo ANBN (mediana = 987,5 UFC/mL e faixa interquartil = 3513 UFC/mL), sendo esta diferença estatisticamente significativa (p-

valor = 0,00001). Comparação entre as contagens de leveduras (UFC/mL) entre os pacientes com Anorexia Nervosa (n = 32) e Bulimia Nervosa (n = 27) também foi realizada, a distribuição dos valores do grupo AN (mediana = 1106,3 UFC/mL e faixa interquartil = 3444 UFC/mL) não diferiu da distribuição obtida para o grupo BN (mediana = 575 UFC/mL e faixa interquartil = 3938 UFC/mL). Esta diferença foi considerada não estatisticamente significativa (p-valor = 0,9389). Como dentre os pacientes do grupo Anorexia Nervosa havia pacientes com o subtipos purgativo (n=21) e restritivo (n=11), foi realizada a comparação entre estes subtipos. A distribuição dos valores do grupo ANP (mediana = 1225 UFC/mL e faixa interquartil = 3357 UFC/mL) não diferiu da distribuição obtida para o grupo ANR (mediana = 1275 UFC/mL e faixa interquartil = 6138 UFC/mL). Esta diferença foi considerada estatisticamente insignificante (p-valor = 0,9522).

A distribuição dos valores para as comparações realizadas pode ser observada na Figura 2 (Gráficos A, B e C).

5.1.2 Gênero *Staphylococcus*

Estafilococos foram isolados a partir de 111 (94%) indivíduos incluídos neste estudo. Tanto no grupo de estudo (96,6%), quanto no grupo controle (91,53%), a porcentagem de indivíduos positivos para *Staphylococcus* spp. foi elevada. A tabela 3 representa a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Staphylococcus* spp. em ambos os grupos.

Tabela 3 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Staphylococcus* spp. nos grupos AN/BN e controle

	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	57	96,6	54	91,53	111	94
Negativos	2	3,4	5	8,47	7	6
Total	59	100	59	100	118	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

Foram identificadas um total de 284 isolados de estafilococos, sendo que 207 das amostras foram coletadas do grupo de Anorexia e Bulimia Nervosas e 77 do grupo controle. A tabela 4 demonstra as espécies isoladas e identificadas em cada grupo por meio do sistema API STAPH.

Tabela 4 - Identificação dos isolados de *Staphylococcus* spp. nos grupos de estudo e controle

Espécies	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>S. epidermidis</i>	101	48,8	39	50,6	140	49,3
<i>S. aureus</i>	55	26,6	19	24,7	74	26,1
<i>S. haemolyticus</i>	6	2,89	0	0	6	2,11
<i>S. capitis</i>	6	2,89	1	1,29	7	2,46
<i>S. warneri</i>	9	4,34	3	3,89	12	4,22
<i>S. saprophyticus</i>	5	2,41	5	6,49	10	3,52
<i>S. hominis</i>	5	2,41	4	5,19	9	3,16
<i>S. xylosus</i>	5	2,41	1	1,29	6	2,11
<i>S. sciuri</i>	0	0	1	1,29	1	0,35
<i>S. chromogenes</i>	7	3,38	0	0	7	2,46
<i>S. simulans</i>	0	0	1	1,29	1	0,35
<i>S. lentus</i>	2	0,96	0	0	2	0,7
<i>S. cohnii</i>	2	0,96	1	1,29	3	1,05
<i>S. auriculares</i>	1	0,48	0	0	1	0,35
<i>S. caprae</i>	1	0,48	1	1,29	2	0,7
<i>Micrococcus spp.</i>	2	0,96	1	1,29	3	1,05
Total	207	100	77	100	284	100

n= número de indivíduos

% = porcentagem

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre a contagem de estafilococos (UFC/mL) obtidos na cavidade bucal dos indivíduos controle (mediana = 5375 UFC/mL e faixa interquartil = 1125 UFC/mL) e aquela observada para o grupo de estudo (mediana = 1362,5 UFC/mL e faixa interquartil = 3187 UFC/mL; p-valor = 0,0007).

Para comparação entre AN e BN não houve diferença estatisticamente significativa (grupo AN: n= 32 mediana =1400 UFC/mL e faixa interquartil = 3406 UFC/mL; grupo BN : n= 27 mediana = 1250 UFC/mL e faixa interquartil = 2700 UFC/mL; p-valor =0,7207). O mesmo ocorreu na comparação entre os subtipos da Anorexia Nervosa (grupo ANP: n= 21 mediana =1362,5 UFC/mL e faixa interquartil = 3100 UFC/mL; grupo ANR: n= 11 mediana = 1637,5 UFC/mL e faixa interquartil = 3937 UFC/mL; p-valor = 0,7660).

A distribuição dos valores para as comparações realizadas pode ser observada na Figura 2 (Gráficos A, B e C).

5.1.3 Enterobacteriaceae e Pseudomonaceae

Em 76 dos 118 indivíduos incluídos no estudo foram isolados enterobactérias e pseudomonas, correspondendo a 64,40% do total. No grupo de estudo estes microrganismos foram isolados a partir de 41 indivíduos (69,49%) e no grupo controle em 35 dos 59 indivíduos coletados (59,32%). A tabela 5 representa a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para enterobactérias e pseudomonas em ambos os grupos.

Tabela 5 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para enterobactérias e pseudomonas nos grupos ANBN e controle

	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	41	69,49	35	59,32	76	64,40
Negativos	18	30,51	24	40,67	42	35,59
Total	59	100	59	100	118	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

Foi obtido um total de 183 amostras de enterobactérias/pseudomonas, sendo que 94 das amostras foram coletadas do grupo de Anorexia e Bulimia Nervosas e 89 do grupo controle. A tabela 6 demonstra as espécies isoladas e identificadas em cada grupo por meio do sistema API 20E.

Tabela 6 - Identificação dos isolados de enterobactérias e pseudomonas dos grupos de estudo e controle

Espécies	ANBN		Controle		(continua) Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterobacter cloacae</i>	31	33	19	21,3	50	27,3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	4,25	16	18	20	10,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6,38	8	8,98	14	7,65
<i>pneumoniae</i>						
<i>Enterobacter sakazakii</i>	2	2,12	2	2,24	4	2,18
<i>Escherichia coli</i>	3	3,19	0	0	3	1,63
<i>Serratia marcescens</i>	7	7,44	3	3,37	10	5,46
<i>Pantoea spp.</i>	1	1,06	2	2,24	3	1,63
<i>Citrobacter freundii</i>	5	5,31	4	4,49	9	4,91
<i>Serratia liquefaciens</i>	10	10,6	12	13,5	22	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1,06	0	0	1	0,54
<i>ozanae</i>						
<i>Enterobacter asburiae</i>	2	2,12	3	3,37	5	2,73
<i>Serratia odorífera</i>	1	1,06	1	1,12	2	1,09
<i>Morganella spp.</i>	2	2,12	0	0	2	1,09
<i>Serratia ficaria</i>	1	1,06	0	0	1	0,54
<i>Salmonella spp.</i>	0	0	1	1,12	1	0,54
<i>Klebsiella terrigena</i>	3	3,19	0	0	3	1,63
<i>Citrobacter koseri</i>	3	3,19	0	0	3	1,63
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	1,06	0	0	1	0,54
<i>Shigella spp.</i>	1	1,06	0	0	1	0,54

Tabela 6 - Identificação dos isolados de enterobactérias e pseudomonas dos grupos de estudo e controle

(conclusão)

Espécies	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Chryseomonas luteola</i>	04	4,25	0	0	04	2,18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	01	1,06	04	4,49	05	2,73
<i>Pseudomonas luteola</i>	05	5,31	07	7,86	12	6,55
<i>Hafnia alvei</i>	0	0	01	1,12	01	0,54
<i>Serratia plymuthica</i>	0	0	01	1,12	01	0,54
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	01	1,12	01	0,54
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0	0	02	2,24	02	1,09
<i>Acinetobacter baumannii calcoaceticus</i>	0	0	01	1,12	01	0,54
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	01	1,12	01	0,54
Total	94	100	89	100	183	100

n= número de indivíduos

% = porcentagem

Não houve diferença estatisticamente significante entre a distribuição dos valores obtidos nas contagens da cavidade bucal dos pacientes do grupo controle (mediana = 25 UFC/mL e faixa interquartil = 1400 UFC/mL) e do grupo ANBN (mediana = 362,5 UFC/mL e faixa interquartil = 1900 UFC/mL; p-valor = 0,3121). O mesmo ocorreu para os dados comparados entre AN e BN (grupo AN com mediana = 306,3 UFC/mL e faixa interquartil = 1881 UFC/mL; grupo BN com mediana = 525 UFC/mL e faixa interquartil = 1900 UFC/mL; p-valor = 0,7400). Na comparação entre os subtipos de Anorexia Nervosa, também não houve

diferença estatisticamente significativa (grupo ANP: n= 21; mediana = 512,5 UFC/mL e faixa interquartil = 2000 UFC/mL; grupo ANR: n= 11; mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 463 UFC/mL; p-valor = 0,1052).

A distribuição dos valores para as comparações realizadas pode ser observada na Figura 2 (Gráficos A, B e C).

5.1.4 Gênero *Enterococcus*

No grupo de estudo estes microrganismos foram isolados a partir de 19 indivíduos (32,2%) e no grupo controle em somente 5 indivíduos (8,5%). A tabela 7 representa a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para enterococos em ambos os grupos.

Tabela 7 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para enterococos nos grupos AN/BN e controle

	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	19	32,2	5	8,5	24	20,33
Negativos	40	67,8	54	91,5	94	79,66
Total	59	100	59	100	118	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

Foram identificadas, um total de 42 isolados de enterococos, sendo que 36 das amostras foram coletadas do grupo de Anorexia e Bulimia Nervosas e 6 do grupo controle. A tabela 8 demonstra

as espécies isoladas e identificadas em cada grupo por meio do sistema API 20 STREP.

Tabela 8 - Identificação dos isolados de enterococos dos grupos de estudo e controle

Espécies	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
<i>Enterococcus faecalis</i>	34	94,4	6	100	40	95,23
<i>Enterococcus durans</i>	1	2,77	0	0	1	2,4
<i>Enterococcus faecium</i>	1	2,77	0	0	1	2,4
Total	36	100	6	100	42	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

Houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores obtidos nas contagens da cavidade bucal dos pacientes do grupo controle (mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 0 UFC/mL) e do grupo ANBN (mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 13 UFC/mL; p-valor = 0,0016). Para os dados comparados entre AN e BN não houve diferença estatisticamente significativa (grupo AN com mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 16 UFC/mL; grupo BN com mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 25 UFC/mL; p-valor = 0,3363). Na comparação entre os subtipos de Anorexia Nervosa, também não houve diferença estatisticamente significativa (grupo ANP: n= 21; mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 64,5 UFC/mL; grupo ANR: n= 11; mediana = 0 UFC/mL e faixa interquartil = 0 UFC/mL; p-valor = 0,4542)

A distribuição dos valores para as comparações realizadas pode ser observada na Figura 2 (Gráficos A, B e C).

5.1.5 Estreptococos do grupo *mutans*

Colônias características de estreptococos do grupo *mutans* foram observadas nos 111 (93,22%) indivíduos incluídos neste estudo. A tabela 9 representa a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para estreptococos do grupo *mutans* em ambos os grupos.

Tabela 9 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para estreptococos do grupo *mutans* nos grupos de estudo e controle

	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	59	100	52	88,13	111	93,22
Negativos	0	0	7	11,87	7	6,78
Total	59	100	59	100	118	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

As colônias características foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml).

Houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores obtidos nas contagens da cavidade bucal dos

pacientes do grupo controle (mediana = 938 UFC/mL e faixa interquartil = 11175 UFC/mL) e do grupo ANBN (mediana = 19125 UFC/mL e faixa interquartil = 78750 UFC/mL; p-valor = 0,0001). Para os dados comparados entre AN e BN não houve diferença estatisticamente significativa (grupo AN com mediana = 18125 UFC/mL e faixa interquartil = 71563 UFC/mL; grupo BN com mediana = 23750 UFC/mL e faixa interquartil = 116250 UFC/mL; p-valor = 0,7320). Na comparação entre os subtipos de Anorexia Nervosa, também não houve diferença estatisticamente significativa (grupo ANP: n= 21; mediana = 22500 UFC/mL e faixa interquartil = 115625 UFC/mL; grupo ANR: n= 11; mediana = 16250 UFC/mL e faixa interquartil = 28125 UFC/mL; p-valor = 0,6914)

A distribuição dos valores para as comparações realizadas pode ser observada na Figura 2 (Gráficos A, B e C).

5.1.6 Gênero *Lactobacillus*

Colônias características de *Lactobacillus* foram observadas em 92 (78%) indivíduos incluídos neste estudo. No grupo de estudo, 57 (96,6%) pacientes foram positivos para este microrganismo, sendo que no grupo controle, 35 (59,32%) indivíduos foram observados lactobacilos. A tabela 10 representa a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Lactobacillus* em ambos os grupos.

Tabela 10 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Lactobacillus* spp. nos grupos de estudo e controle

	ANBN		Controle		Total	
	n	%	n	%	n	%
Positivos	57	96,6	35	59,32	92	78
Negativos	2	3,4	24	40,67	26	22
Total	59	100	59	100	118	100

n= número de indivíduos

%= porcentagem

Houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores obtidos nas contagens da cavidade bucal dos pacientes do grupo controle (mediana = 425 UFC/mL e faixa interquartil = 1125 UFC/mL) e do grupo ANBN (mediana = 8750 UFC/mL e faixa interquartil = 3187 UFC/mL; p-valor = 0,00001). Para os dados comparados entre AN e BN não houve diferença estatisticamente significativa (grupo AN com mediana = 3531,3 UFC/mL e faixa interquartil = 52737 UFC/mL; grupo BN com mediana = 9450 UFC/mL e faixa interquartil = 79512 UFC/mL; p-valor = 0,2938). Na comparação entre os subtipos de Anorexia Nervosa, também não houve diferença estatisticamente significativa (grupo ANP: n= 21; mediana = 21250 UFC/mL e faixa interquartil = 90506 UFC/mL; grupo ANR: n= 11; mediana = 1000 UFC/mL e faixa interquartil = 14137 UFC/mL; p-valor = 0,1475). A distribuição dos valores para as comparações realizadas pode ser observada na Figura 2 (Gráficos A, B e C).

5.1.7 Unidades formadoras de colônias por mililitro

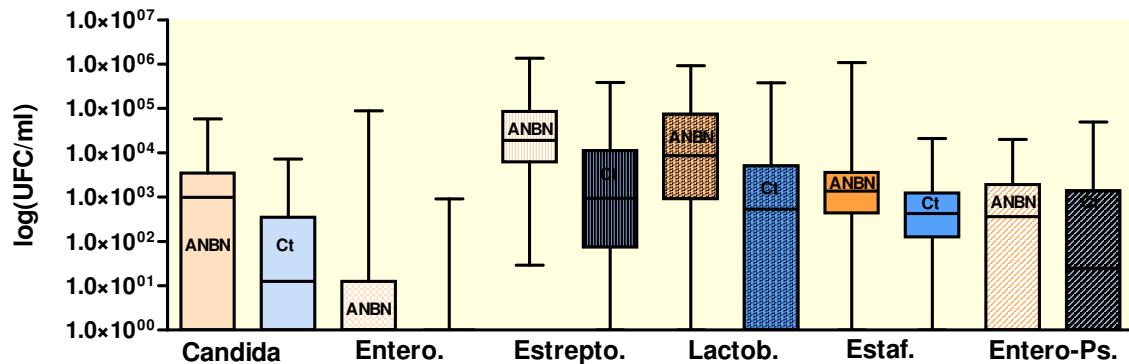
Após o crescimento adequado em ágar Sangue, as colônias obtidas foram contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml) e analisadas pelo teste de estatístico de Mann-Whitney (5%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores obtidos nas contagens da cavidade bucal entre todos os grupos avaliados.

Para os pacientes do grupo controle a mediana foi de 10375000 UFC/mL e faixa interquartil = 15250000 UFC/mL e do grupo ANBN a mediana foi de 11125000 UFC/mL e faixa interquartil = 17125000 UFC/mL; p-valor = 0,8003. Para os dados comparados entre AN e BN os valores foram: grupo AN com mediana = 14125000 UFC/mL e faixa interquartil = 23968750 UFC/mL; grupo BN com mediana = 8875000 UFC/mL e faixa interquartil = 11250000 UFC/mL; p-valor = 0,3734. Na comparação entre os subtipos de Anorexia Nervosa, grupo ANP: n= 21; mediana = 14000000 UFC/mL e faixa interquartil = 27937500 UFC/mL; grupo ANR: n= 11; mediana = 14250000 UFC/mL e faixa interquartil = 24500000 UFC/mL; p-valor = 0,6482).

A distribuição dos valores de acordo com cada grupo avaliado pode ser observada na Figura 3.

GRÁFICO A

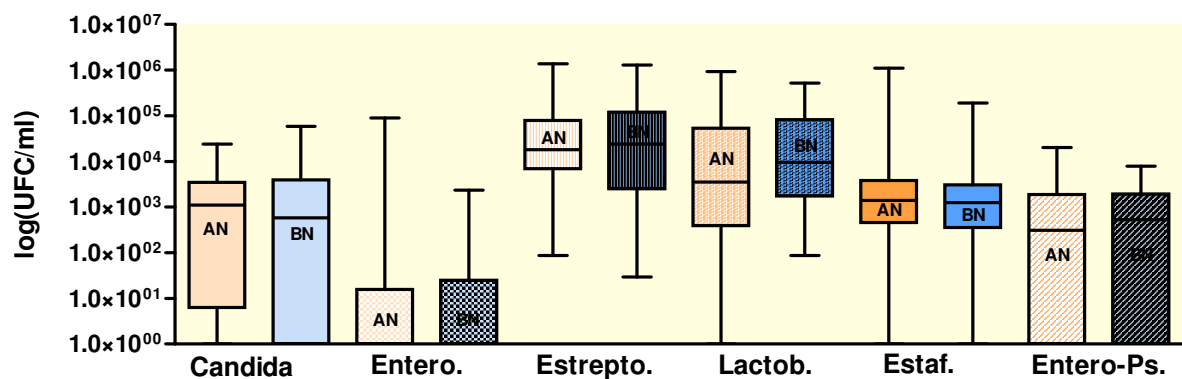
ANBN vs Controle



Log = logaritmo UFC/mL = unidades formadoras de colônias por mililitro ANBN = Anorexia Nervosa Bulimia Nervosa Ct = Controle Candida = *Candida* spp. Entero. = *Enterococcus* spp. Estrepto. = *Streptococcus* do grupo *mutans* Lactob. = *Lactobacillus* spp. Estaf. = *Staphylococcus* spp. Entero-Ps = Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

GRÁFICO B

AN vs BN



Log = logaritmo UFC/mL = unidades formadoras de colônias por mililitro AN = Anorexia Nervosa BN = Bulimia Nervosa Candida = *Candida* spp. Entero. = *Enterococcus* spp. Estrepto. = *Streptococcus* do grupo *mutans* Lactob. = *Lactobacillus* spp. Estaf. = *Staphylococcus* spp. Entero-Ps = Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

FIGURA 2 – Gráficos dos valores (*box plot*) das contagens de cada microrganismo (UFC/mL) ao redor da mediana: a) grupo de estudo (ANBN) e grupo controle; b) Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa c) Anorexia Nervosa do subtipo Restritivo e Anorexia Nervosa do subtipo Purgativo

GRÁFICO C

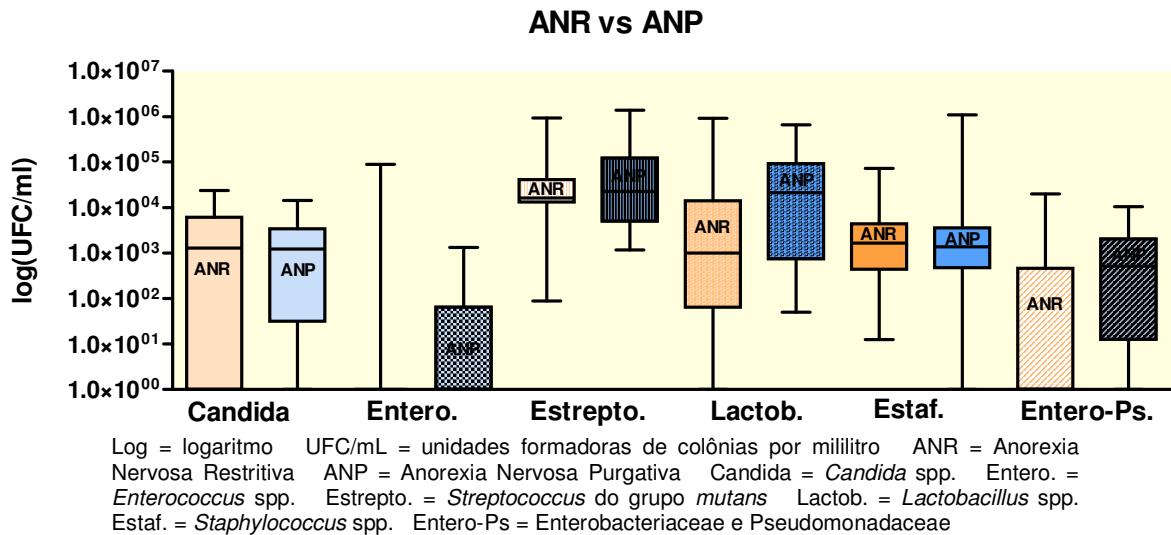
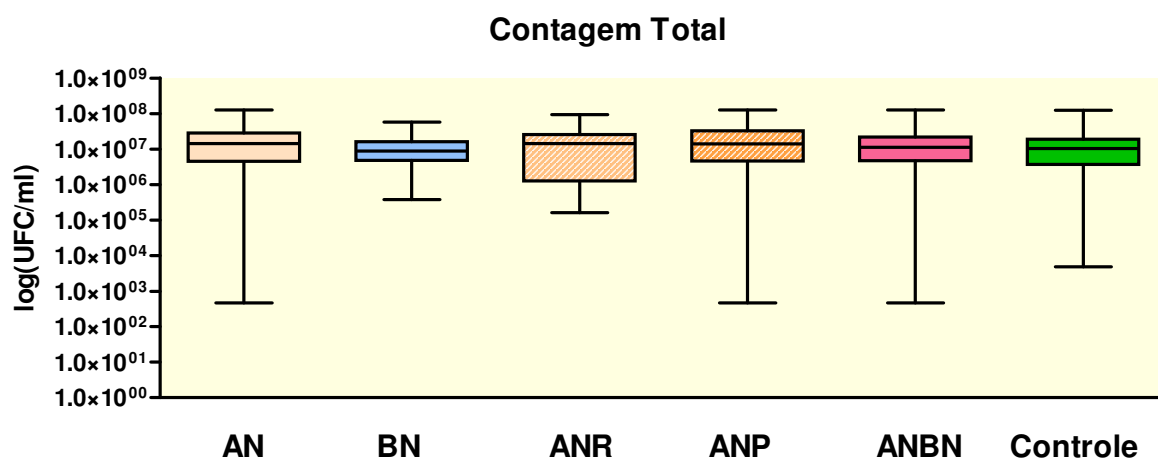


FIGURA 2 – Gráficos dos valores (*box plot*) das contagens de cada microrganismo (UFC/mL) ao redor da mediana: a) grupo de estudo (ANBN) e grupo controle; b) Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa c) Anorexia Nervosa do subtipo Restritivo e Anorexia Nervosa do subtipo Purgativo



Log = logaritmo UFC/mL = unidades formadoras de colônias por mililitro AN = Anorexia Nervosa
 BN = Bulimia Nervosa ANR = Anorexia Nervosa Restritiva ANP = Anorexia Nervosa Purgativa
 ANBN = Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa Candida = *Candida* spp. Entero. = *Enterococcus*
 spp. Estrepto. = *Streptococcus* do grupo *mutans* Lactob. = *Lactobacillus* spp. Estaf. =
Staphylococcus spp. Entero-Ps = Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

FIGURA 3 – Gráfico dos valores (*box plot*) da contagem total de microrganismo (UFC/mL) ao redor da mediana entre os grupos avaliados

5.2 Métodos independentes de cultivo

5.2.1 Bactérias

Foram gerados cerca de 130 clones para análise bacteriana da coleta por enxágüe bucal e 70 clones com insertos de bactérias para análise do biofilme supragengival para cada paciente. No total foram analisados cerca de 2000 clones para o grupo AN/BN e 1000 clones para o grupo controle. Foi realizada uma triagem das seqüências obtidas com o programa *Sequence Analysis* versão 3.7 da empresa Applied Biosystems para verificar a qualidade das mesmas e estimar se o número mínimo de clones a serem identificados estava sendo alcançado. Estas seqüências triadas foram processadas pelo colaborador. Apenas os arquivos “*Contigs*” e “*Singlets*” (seqüências fasta) contendo o número igual ou maior a 200 bases foram comparados com o banco de seqüências nucléicas (nt), obtido do site <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db> (atualizado em abril de 2009), utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), configurado na opção “blastn”.

Sessenta e duas identificações de bactérias entre filo, família ou gênero foram detectadas, sendo que 22 identificações foram encontrados somente no grupo de estudo, 6 apenas no grupo controle e 34 em ambos os grupos. Nas tabelas 11 e 12 constam os dados obtidos na identificação por similaridade das seqüências através da ferramenta BLAST, configurada como descrito.

Tabela 11 – Identificações obtidas após BLAST de acordo com o local de coleta para o grupo ANBN

(continua)

Grupo ANBN	
Cavidade bucal	Biofilme supragengival
<i>Uncultured Abiotrophia</i> sp.	<i>Abiotrophia para-adiacens</i>
<i>Abiotrophia para-adiacens</i> gene	<i>Uncultured Actinobacillus</i> sp.
<i>Actinobacterium</i>	<i>Actinobaculum</i> sp.
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Actinomyces</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp.	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>Bacillus benzoovorans</i>	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
<i>Bacillus nealsonii</i>	<i>Alysiella filiformis</i>
<i>Bacteroides gracilis</i>	<i>Bacteroides gracilis</i>
<i>Uncultured Bacillales bacterium</i>	<i>Catonella morbi</i>
<i>Uncultured Bacilli bacterium</i>	<i>Uncultured Campylobacter</i> sp.
<i>Uncultured Campylobacter</i> sp.	<i>Campylobacter concisus</i>
<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Campylobacter curvus</i>
<i>Campylobacter curvus</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Capnocytophaga</i> sp.	<i>Capnocytophaga</i> sp.
<i>Cardiobacterium valvarum</i>	<i>Uncultured Clostridiales bacterium</i>
<i>Catonella</i> sp.	<i>Uncultured Corynebacterium</i> sp.
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	<i>Uncultured Dialister</i> sp.
<i>Clostridiales bacterium</i>	<i>Dialister pneumosintes</i>
<i>Eubacteriaceae oral</i>	<i>Uncultured Eikenella</i> sp.
<i>Eubacterium infirmum</i>	<i>Eubacteriaceae oral</i>
<i>Eubacterium</i> sp.	<i>Eubacterium infirmum</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Eubacterium</i> sp.
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Uncultured Firmicutes</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Gemella</i> sp.	<i>Fusobacterium periodonticum</i>
<i>Granulicatella</i> sp.	<i>Fusobacterium</i> sp.
<i>Uncultured Haemophilus</i> sp.	<i>Uncultured Gemella</i> sp.
<i>Hyphodontia abieticola</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Lachnospiraceae bacterium</i>	<i>Uncultured Granulicatella</i> sp.
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Granulicatella</i> sp.
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Haemophilus genomus</i> sp.
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Haemophilus</i> sp.
<i>Lactobacillus ultunensis</i>	<i>Uncultured Johnsonella</i> sp.
<i>Marasmius nodulocystis</i>	<i>J. ignava</i>
<i>Uncultured Megasphaera</i> sp.	<i>Kingella oralis</i>
<i>Megasphaera genomus</i> sp.	<i>Uncultured Lachnospiraceae bacterium</i>

Tabela 11 – Identificações obtidas após BLAST de acordo com o local de coleta para o grupo ANBN

(conclusão)

Grupo ANBN	
Cavidade bucal	Biofilme supragengival
<i>Uncultured Paenibacillus</i> sp.	<i>Leptotrichia wadeii</i>
<i>Peptococcus</i> sp. oral clone	<i>Neisseria bacilliformis</i>
<i>Uncultured Peptostreptococcus</i> sp.	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	<i>Oribacterium</i> sp.
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Paenibacillus humicus</i>
<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Peptostreptococcus</i> sp.
<i>Prevotella multiformis</i>	<i>Prevotella genom</i> sp.
<i>Uncultured Rothia</i> sp.	<i>Prevotella</i> sp.
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
<i>Selenomonas infelix</i>	<i>Selenomonas</i> sp. oral
<i>Selenomonas noxia</i>	<i>Selenomonas infelix</i>
<i>Uncultured Streptococcus</i> sp.	<i>Selenomonas noxia</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>Streptococcus intermedius</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Streptococcus suis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Streptococcus vestibularis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Terrahaemophilus aromaticivorans</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Uncultured bacterium</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Uncultured beta proteobacterium</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>Uncultured firmicute</i>	<i>Treponema</i> sp.
<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>	<i>Uncultured bacterium</i>
<i>Uncultured marine microorganism</i>	<i>Uncultured gamma proteobacterium</i>
<i>Unidentified oral bacterium</i>	<i>Uncultured human oral bacterium</i>
<i>Veillonella</i> sp.	<i>Veillonella</i> sp.
	<i>Veillonella parvula</i>

ANBN = Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa

Tabela 12 – Identificações obtidas após BLAST de acordo com o local de coleta para o grupo controle

(continua)

Grupo Controle	
Cavidade bucal	Biofilme supragengival
<i>Abiotrophia para-adiacens</i>	<i>Bergeyella</i> sp.
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Catonella morbi</i>
<i>Atopobium rimae</i>	<i>Uncultured Campylobacter</i> sp.
<i>Uncultured Bacillales bacterium</i>	<i>Campylobacter showae</i>
<i>Uncultured Catonella</i> sp.	<i>Cardiobacterium valvarum</i>
<i>Catonella morbi</i>	<i>Uncultured Clostridiales bacterium</i>
<i>Uncultured Campylobacter</i> sp.	<i>Clostridiales bacterium</i>
<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Eubacterium</i> sp.
<i>Campylobacter curvus</i>	<i>Uncultured Filifactor</i> sp.
<i>Cardiobacterium valvarum</i>	<i>Firmicutes</i> sp.
<i>Catonella</i> sp.	<i>Fusobacterium</i> sp.
<i>Uncultured Clostridiales bacterium</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Uncultured Corynebacterium</i> sp.	<i>Granulicatella</i> sp.
<i>Dialister</i> sp.	<i>Uncultured Haemophilus</i> sp.
<i>Dialister invisus</i>	<i>Kingella oralis</i>
<i>Dialister pneumosintes</i>	<i>Uncultured Lachnospiraceae</i>
<i>Eubacteriaceae oral</i>	<i>Lactobacillus</i> sp.
<i>Uncultured Eubacterium</i> sp.	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>
<i>Eubacterium</i> sp.	<i>Uncultured Megasphaera</i> sp.
<i>Eubacterium infirmum</i>	<i>Peptostreptococcus</i> sp.
<i>Uncultured Filifactor</i> sp.	<i>Uncultured Porphyromonas</i> sp.
<i>Firmicutes</i> sp.	<i>Selenomonas</i> sp.
<i>Fusobacterium alocis</i>	<i>Selenomonas noxia</i>
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>
<i>Gemella</i> sp.	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Granulicatella</i> sp.	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Uncultured Haemophilus</i> sp.	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Megasphaera genomu</i> sp.	<i>Uncultured bacterium</i>
<i>Uncultured Neisseria</i> sp.	<i>Uncultured human oral bacterium</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Uncultured marine microorganism</i>
<i>Uncultured Oribacterium</i> sp.	<i>Veillonella</i> sp.
<i>Oribacterium sinus</i>	
<i>Uncultured Peptococcus</i> sp.	
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	
<i>Porphyromonas</i> sp.	

Tabela 12 – Identificações obtidas após BLAST de acordo com o local de coleta para o grupo controle
(conclusão)

Grupo Controle	
Cavidade bucal	Biofilme supragengival
<i>Prevotella</i> sp.	
<i>Selenomonas noxia</i>	
<i>Uncultured Staphylococcus</i> sp.	
<i>Streptococcus anginosus</i>	
<i>Streptococcus constellatus</i>	
<i>Streptococcus mitis</i>	
<i>Streptococcus mutans</i>	
<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>Streptococcus sanguinis</i>	
<i>Streptococcus</i> sp.	
<i>Streptococcus suis</i>	
<i>Tannerella forsythensis</i>	
<i>Treponema</i> sp.	
<i>Uncultured bacterium</i>	
<i>Uncultured marine microorganism</i>	
<i>Uncultured rumen bacterium</i>	
<i>Unidentified oral bacterium</i>	

As Figuras 4, 5, 6 e 7 representam as árvores filogenéticas das espécies bacterianas ou filotipos a partir dos representantes e utilizando as ferramentas descritas em Materiais e Métodos.

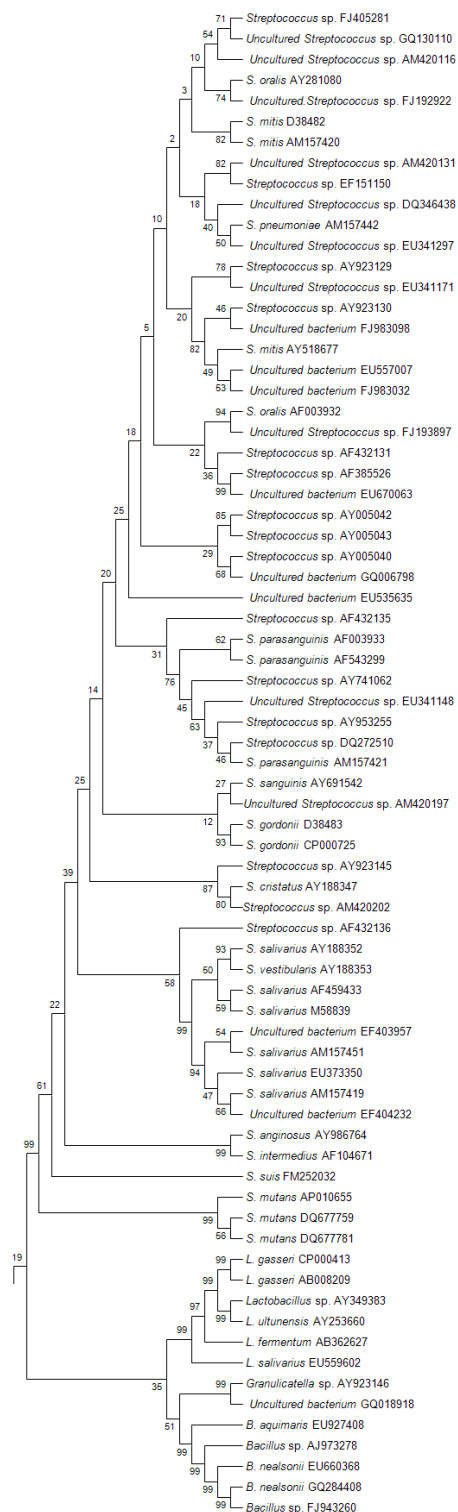


FIGURA 4 – (continua)

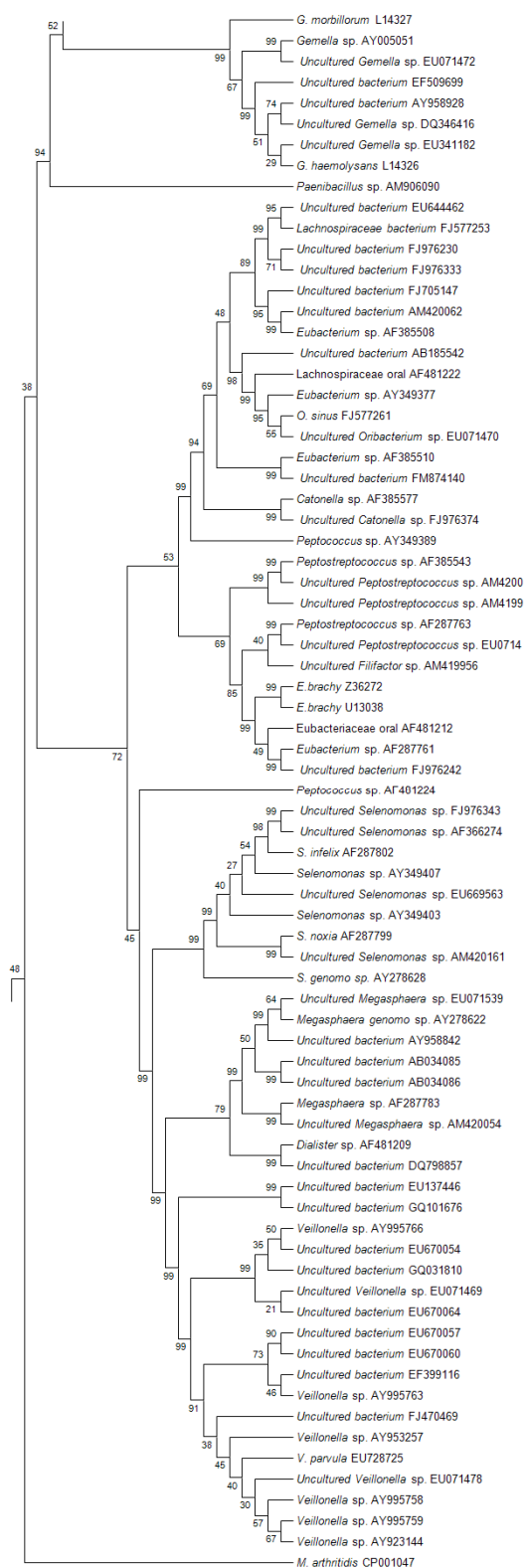


FIGURA 4 – (continuação)

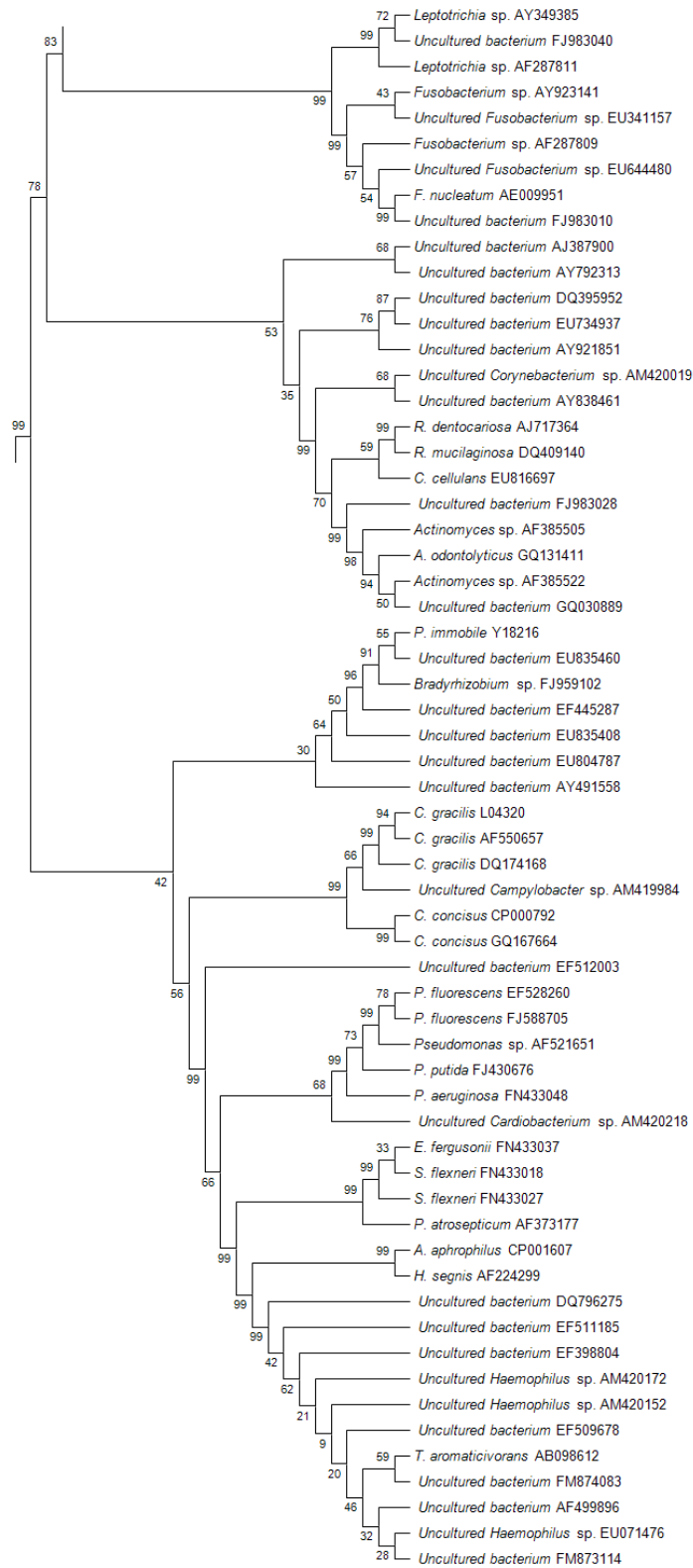


FIGURA 4 – (continuação)

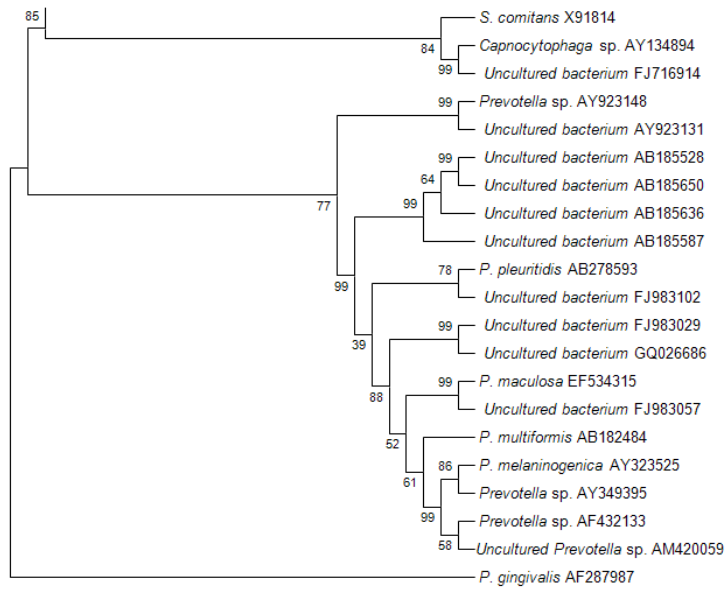


FIGURA 4 – (conclusão)

FIGURA 4– Árvore filogenética das espécies bacterianas ou filotipos identificados nas amostras da cavidade bucal do grupo ANBN (experimental)

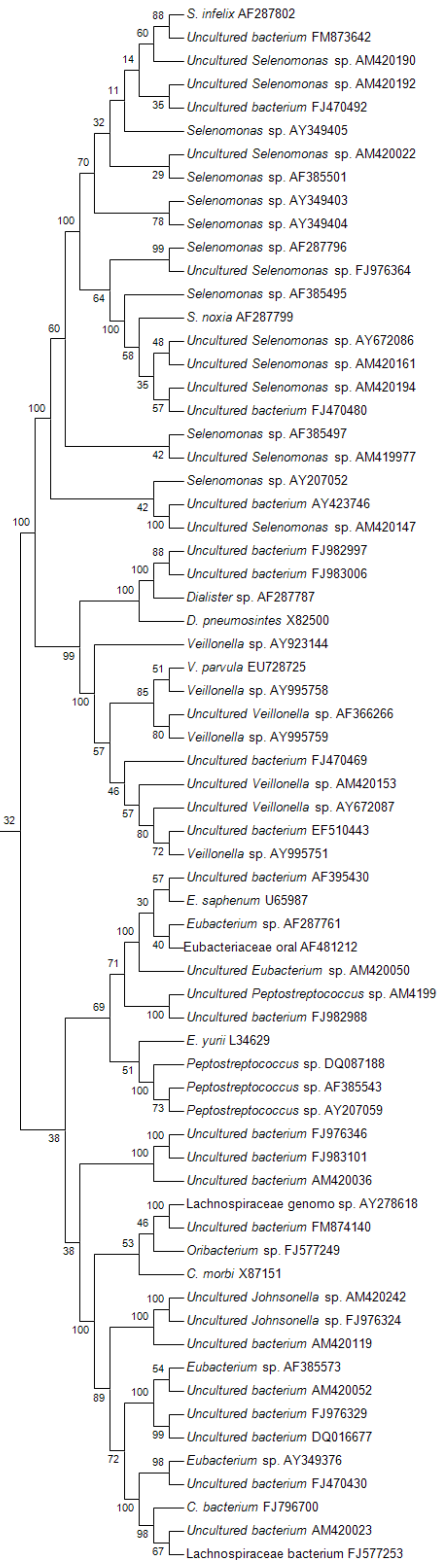


FIGURA 5 – (continua)

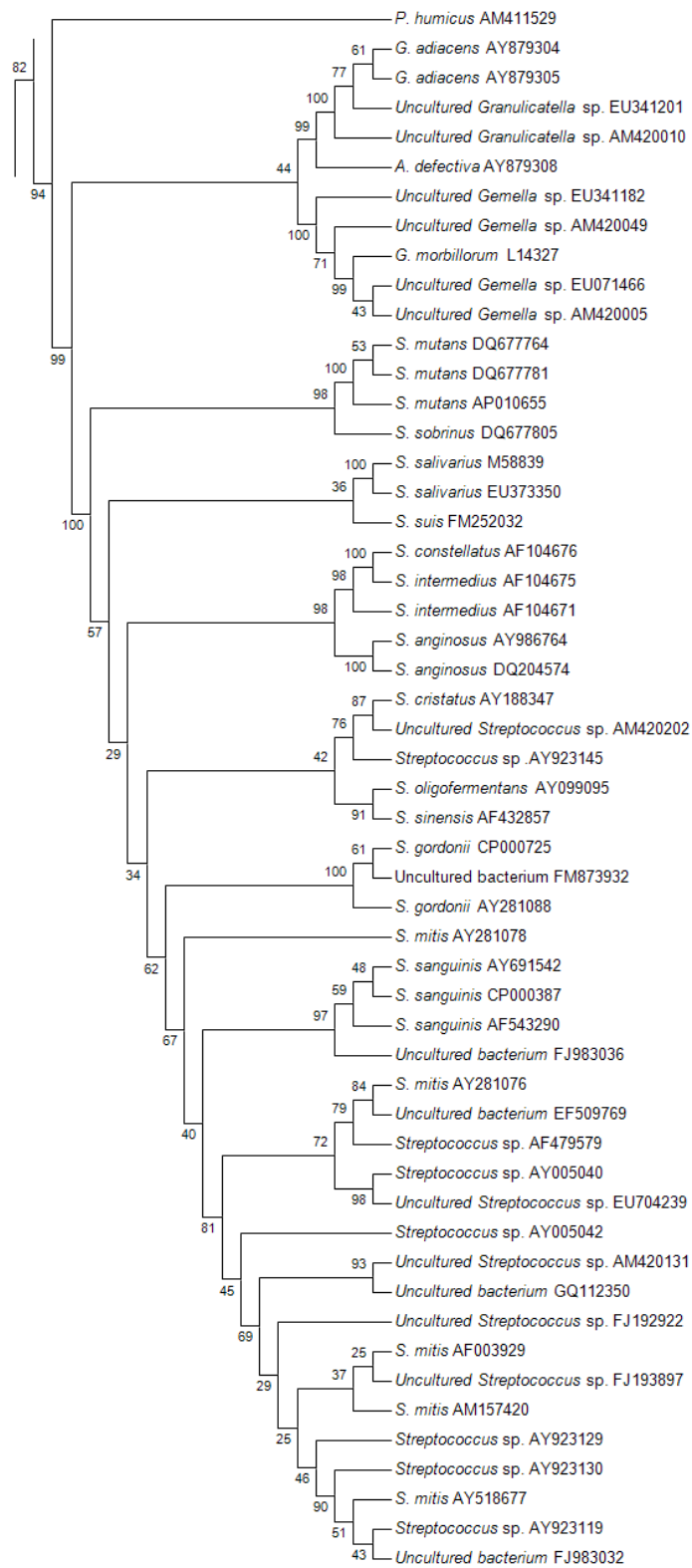


FIGURA 5 – (continuação)

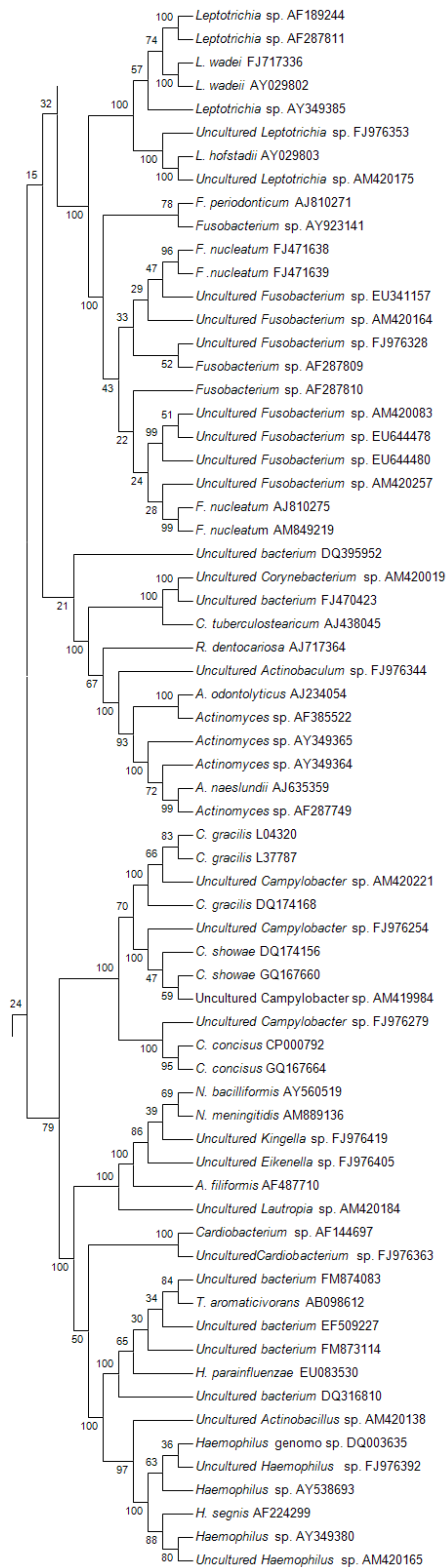


FIGURA 5 – (continuação)

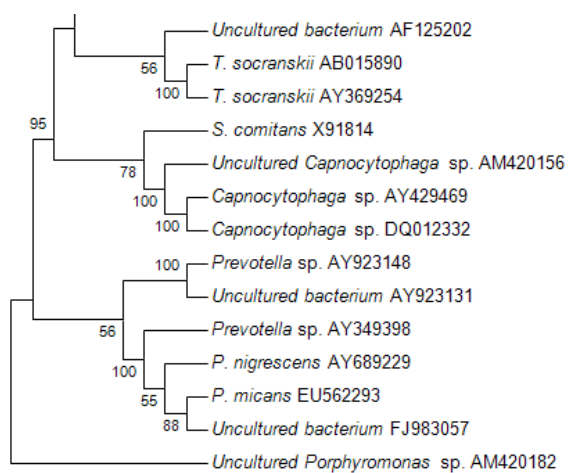


FIGURA 5 – (conclusão)

FIGURA 5 – Árvore filogenética das espécies bacterianas ou filotipos identificados nas amostras do biofilme supragengival do grupo ANBN

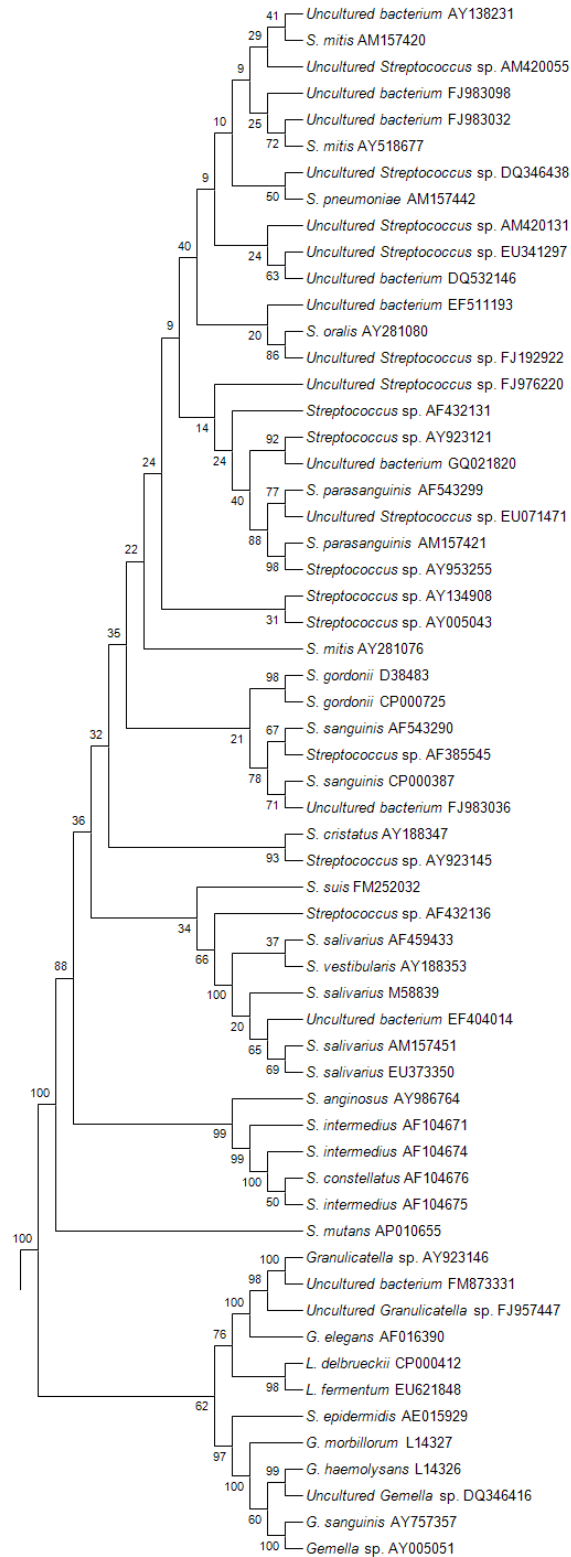


FIGURA 6 – (continua)

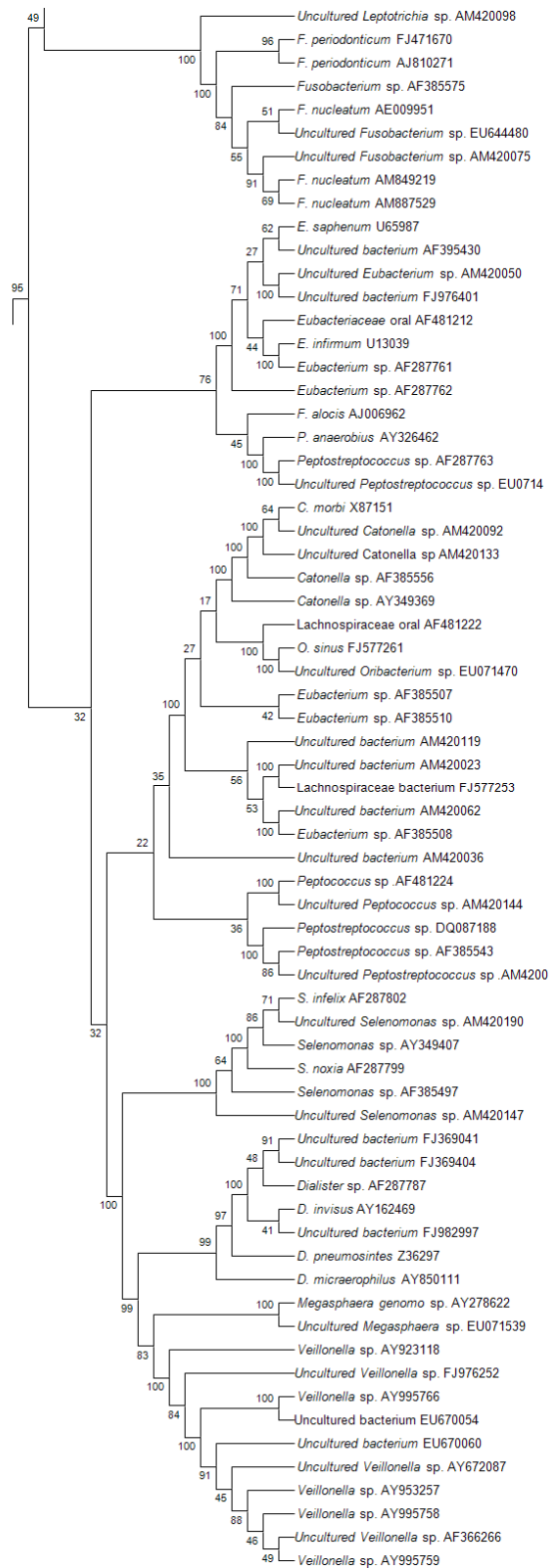


FIGURA 6 – (continuação)

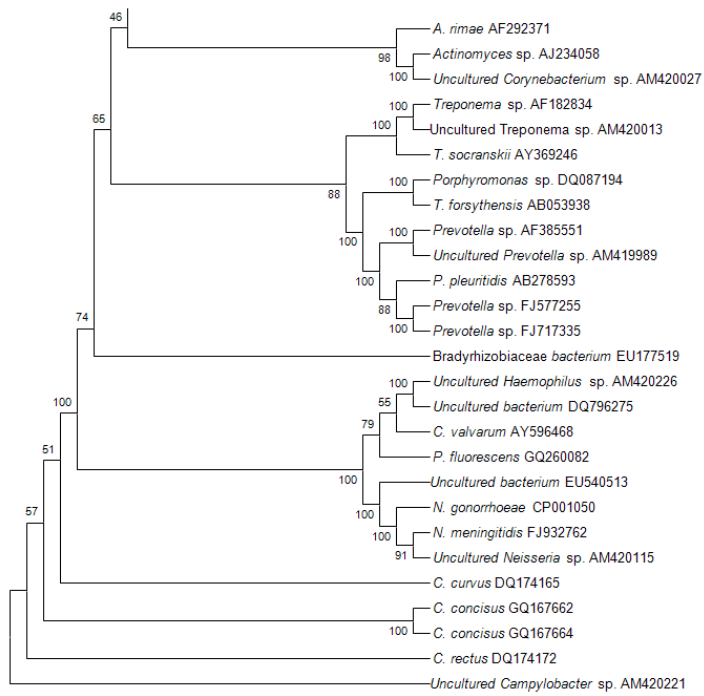


FIGURA 6 – (conclusão)

FIGURA 6 – Árvore filogenética das espécies bacterianas ou filotipos identificados nas amostras da cavidade bucal do grupo controle

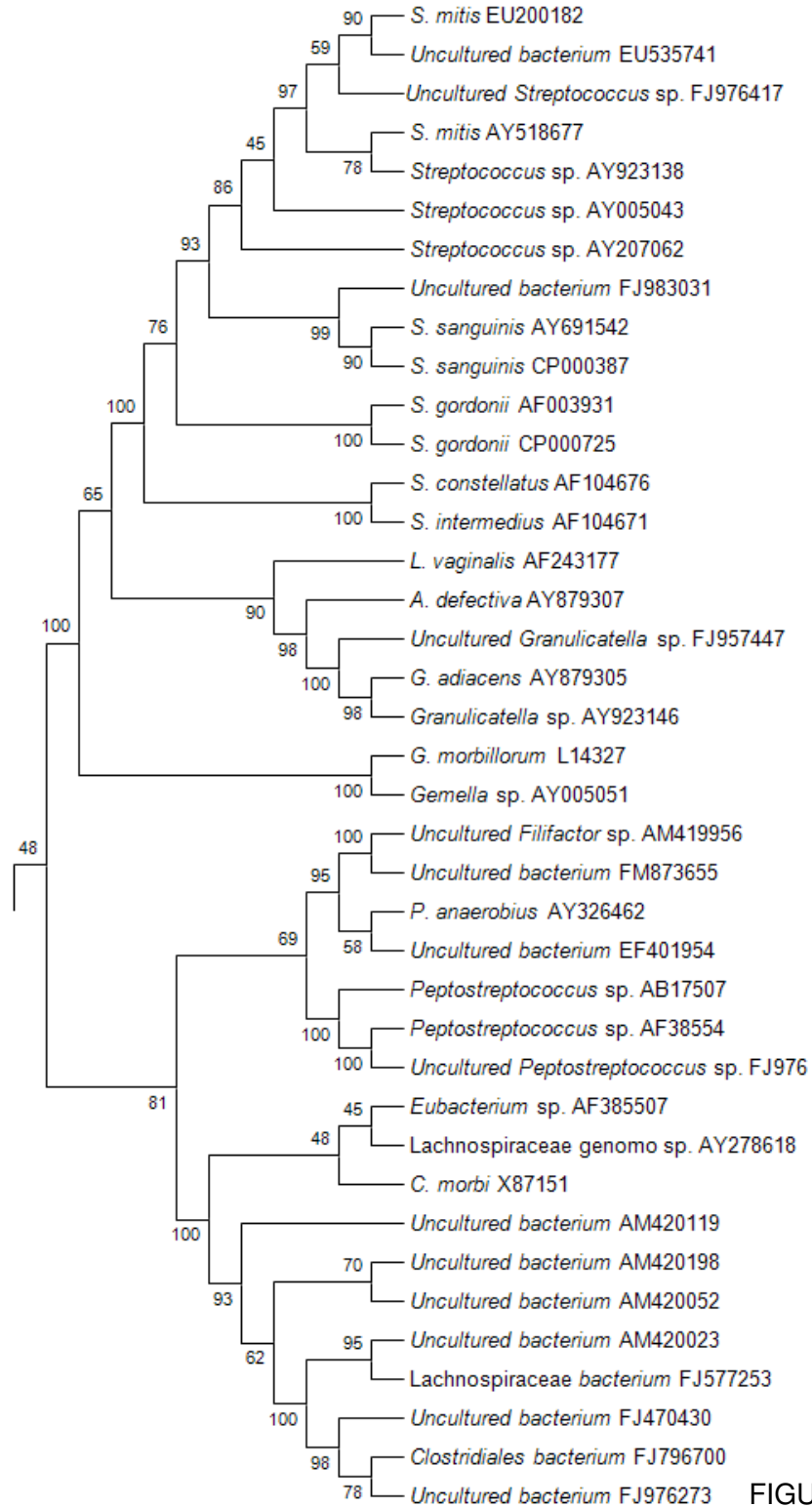


FIGURA 7 – (continua)

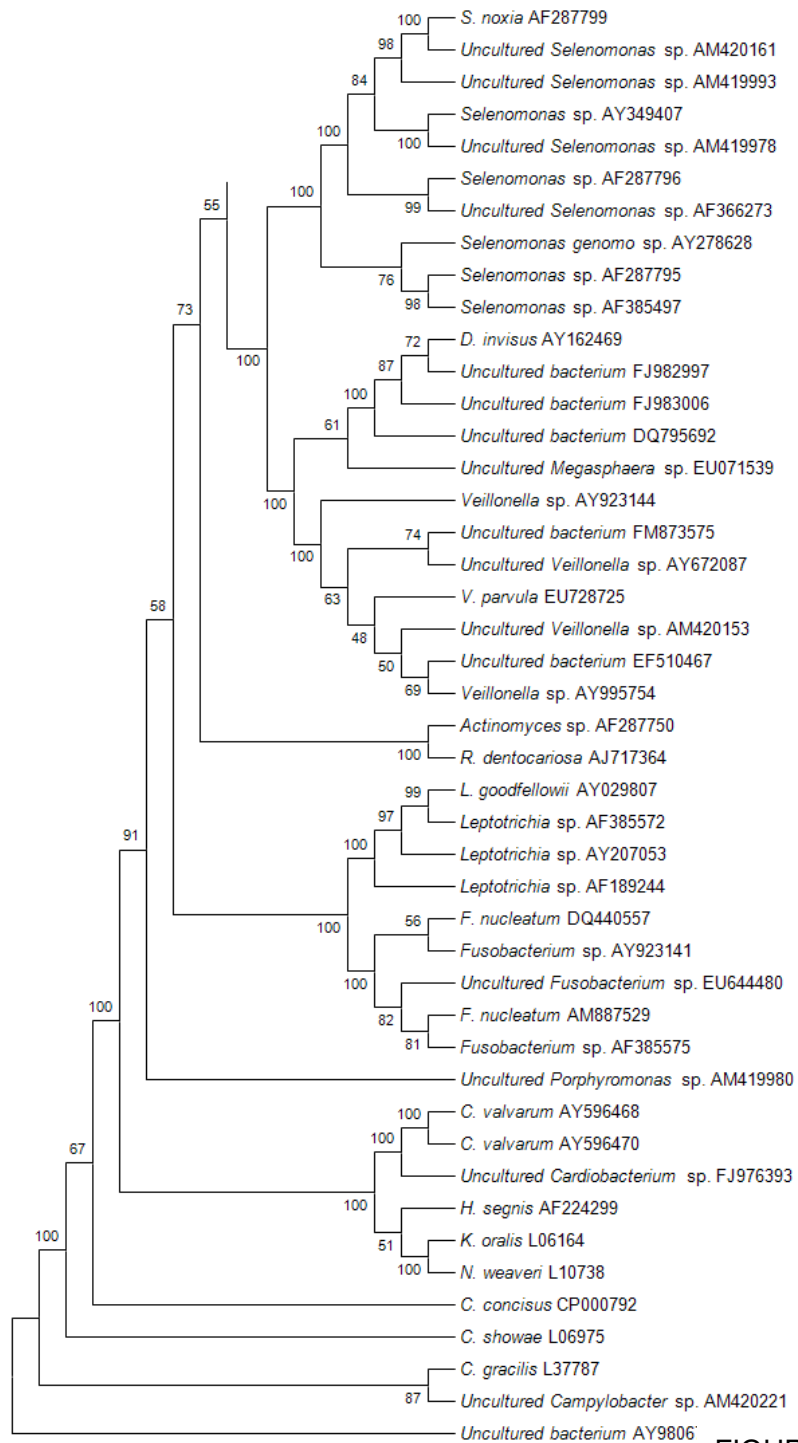


FIGURA 7 – (conclusão)

FIGURA 7 – Árvore filogenética das espécies bacterianas identificados nas amostras do biofilme supragengival do grupo controle

5.2.2 Fungos

Para a análise molecular de fungos, foram gerados 70 clones para cavidade bucal e 30 para biofilme supragengival para cada paciente.

No total foram identificadas 13 espécies de fungos diferentes, sendo que oito somente foram detectados no grupo de estudo, um somente no grupo controle e 4 espécies em ambos os grupos. As tabelas 13 e 14 mostram as identificações obtidas por similaridade das seqüências através da ferramenta BLAST, configurada como descrito

Tabela 13 – Identificações obtidas após BLAST de acordo com o local de coleta para o grupo ANBN

ANBN	
Cavidade bucal	Biofilme supragengival
<i>Arthroderma gypseum</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Candida sp.</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Clasporium sp.</i>
<i>Kazachstania zonata</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	<i>Pichia norvegensis</i>
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Uncultured ascomycete</i>
	<i>Uncultured cladosporium</i>
	<i>Uncultured compost fungus</i>
	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Tabela 14 – Identificações obtidas após BLAST de acordo com o local de coleta para o grupo controle

CONTROLE	
Cavidade bucal	Biofilme supragengival
<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

As Figuras 8, 9, 10 e 11 representam as árvores filogenéticas das espécies fúngicas ou filotipos a partir dos representantes e utilizando as ferramentas descritas em Materiais e Métodos.

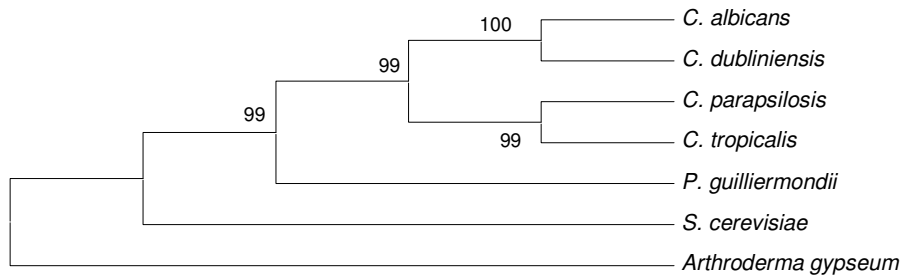


FIGURA 8 – Árvore filogenética das espécies ou filotipos de fungos identificados nas amostras da cavidade bucal do ANBN

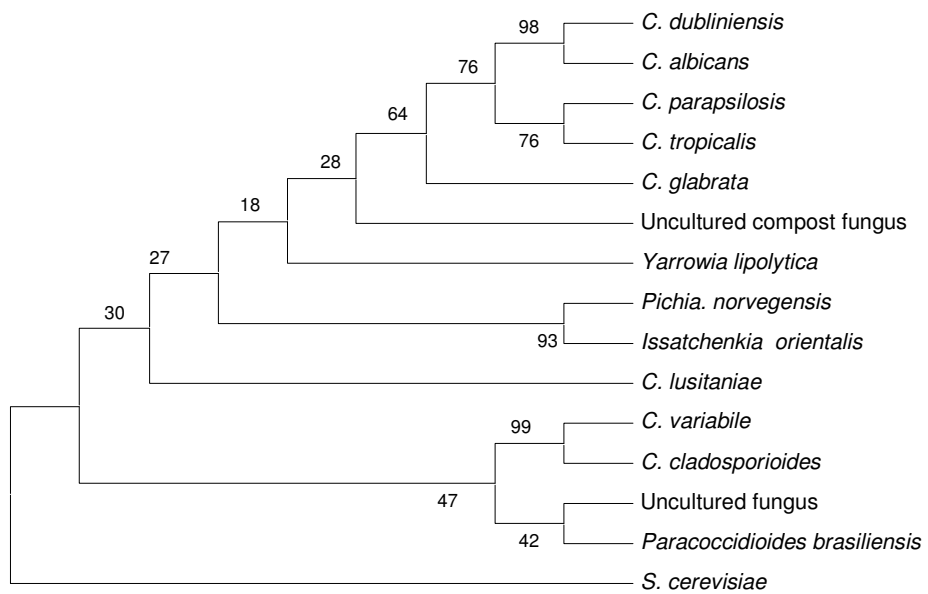


FIGURA 9 – Árvore filogenética das espécies ou filotipos de fungos identificados nas amostras de biofilme supragengival do grupo ANBN

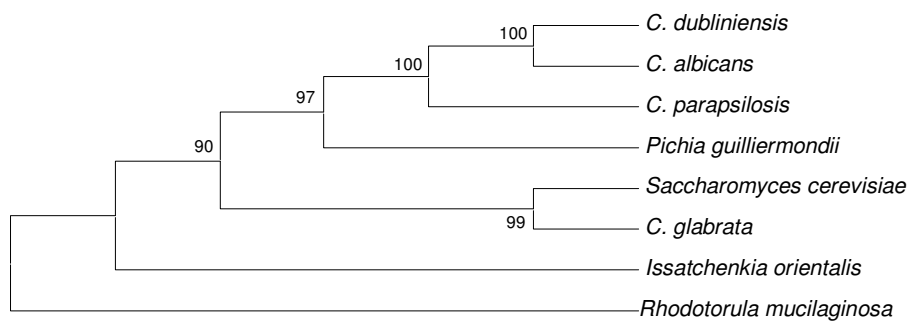


FIGURA 10 – Árvore filogenética das espécies ou filotipos de fungos identificados nas amostras da cavidade bucal do grupo controle

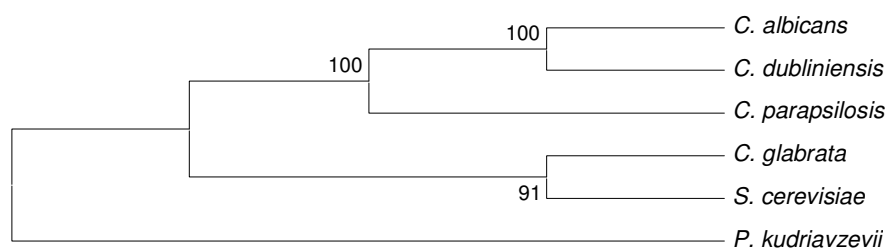


FIGURA 11 – Árvore filogenética das espécies ou filotipos de fungos identificados nas amostras de biofilme supragengival do grupo controle

6 DISCUSSÃO

A microbiota bucal é relativamente estável em indivíduos saudáveis, mas alterações sistêmicas e/ou locais podem romper o equilíbrio biológico entre microbiota e o hospedeiro (Dáhlen, 2006).

A deficiência nutricional somada à indução de vômitos, muitas vezes presente nos pacientes com transtornos alimentares, podem acarretar tanto alterações sistêmicas, com conseqüente imunossupressão, quanto mudanças na microbiota comensal bucal.

As alterações clínicas bucais neste grupo de pacientes são extensamente descritas na literatura, porém pouco se sabe quanto à microbiota bucal. Candidose e queilite angular (Alonso et al., 2001; Debate et al., 2005), sendo esta última lesão possivelmente associada à presença de *Staphylococcus aureus* (Smith et al., 2001; Smith et al., 2003; Monroy et al., 2005), estão entre as lesões relatadas neste grupo, porém estudos versando sobre estes microrganismos não foram realizados com esta população. Portanto, este estudo foi o primeiro a avaliar de maneira ampla a composição microbiana da cavidade bucal de pacientes com Anorexia e Bulimia Nervosas.

Embora estudos prévios demonstrem as vantagens da utilização de métodos independentes de cultivo para este propósito (Paster et al., 2001; Aas et al., 2005), empregamos simultaneamente técnicas de cultura para alguns gêneros de fungo e bactérias freqüentemente relacionados a patologias bucais e sistêmicas, objetivando aprofundar a investigação para aqueles microrganismos considerados oportunistas, como enterobactérias, estafilococos e leveduras (Rams et al., 1990; Slots et al., 1990; Flynn; Slots, 1993; Pannuti et al., 2001). Reservatórios bucais destes patógenos potenciais

podem ocasionar infecções bucais ou sistêmicas e comprometer a vida de pacientes debilitados ou imunocomprometidos (Jobbins et al., 1992; Dahlén, 1993).

O grupo de estudo foi composto por 32 portadores de Anorexia Nervosa e 27 de Bulimia Nervosa. Esta diferença entre o número de indivíduos que compõem cada grupo ocorreu devido à maior dificuldade na finalização do grupo de pacientes bulímicos, que pode ter ocorrido pela menor procura destes pelo tratamento, visto que, na maioria das vezes, estes pacientes mantêm um peso normal e apresentam complicações clínicas mais brandas.

A ficha clínica utilizada para avaliação do grupo de estudo foi padronizada juntamente com a equipe de atendimento odontológico do Instituto de Psiquiatria. Foram avaliados dados demográficos, história médica e odontológica. Na anamnese, os pacientes foram questionados quanto às informações referentes ao transtorno alimentar, bem como as demais condições sistêmicas. Quanto às práticas compensatórias para evitar o ganho de peso, a auto-indução de vômito (69,5%) foi a mais relatada, seguida pelo uso de laxantes (50,8%), diuréticos (32,2%), anorexígenos (anfetaminas ou medicamentos para emagrecer) (18,6%) e prática de exercícios (6,8%). A média do IMC de 18,6 reflete uma normalidade apenas aparente para o grupo, pois mascara alguns casos extremos como o IMC=11,7 de uma paciente, e o incremento na média pode ser explicado pela resistência de algumas pacientes que quando questionadas sobre o peso, respondiam não saber. A terapia farmacológica mostrou-se bastante variável. Para sua indicação são consideradas manifestações como a distorção da imagem corporal, sintomas depressivos, alterações de apetite e outras comorbidades associadas (Appolinario; Bacaltchuk, 2002; Cabrera, 2006). A combinação de fármacos é estabelecida de acordo com o caso clínico e é modificada conforme a evolução do quadro geral do paciente. Dentre as comorbidades, a depressão foi a mais relatada (52,54%) pelas pacientes.

Transtorno obsessivo compulsivo, transtorno de ansiedade, afetivo e de personalidade, auto-mutilação, esquizofrenia, síndrome do pânico também foram citadas e 15, 25% responderam não apresentar nenhuma comorbidade.

Em relação aos hábitos dos pacientes do grupo de estudo, 23,7% eram fumantes; 6,8% eram etilistas e 1,6% relataram dependência química. No projeto inicial, indivíduos fumantes fariam parte dos critérios de exclusão, entretanto, fomos advertidos que critérios de exclusão muito restritivos poderiam dificultar ainda mais a coleta de indivíduos com o transtorno alimentar, levando-se em conta a baixa prevalência destas doenças. A associação entre o fumo e várias modificações na cavidade bucal, como alterações na saliva, bactérias e fungos comensais da microbiota bucal, células epiteliais bucais e na resposta sistêmica e local do hospedeiro (Kamma et al., 1999; Edwardson et al., 1999; Soysa; Ellepola, 2005; Arredondo et al., 2005) são descritas, por outro lado, diferenças relacionadas ao fumo na prevalência bucal de microrganismos potencialmente superinfectantes em pacientes HIV-positivos não foram detectadas em estudo anterior (Back-Brito, 2006). Ainda que a influência do fumo sobre a microbiota bucal seja controversa, adotamos esta variável como critério de pareamento dos indivíduos controles.

Inicialmente indivíduos do gênero masculino seriam excluídos do estudo, devido à baixa prevalência destes transtornos neste gênero, e a fim de evitar uma eventual variável nos resultados quanto aos gêneros. Porém, ao encontrar indivíduos do sexo masculino durante o atendimento, decidimos incluí-los nos procedimentos de coleta para análise posterior, mas não contabilizados para o número total de indivíduos do gênero feminino, proposto no projeto deste estudo (n= 25 para Anorexia Nervosa e n= 25 para Bulimia Nervosa). O grupo controle também foi pareado quanto ao gênero.

As condições de saúde bucal foram avaliadas em ambiente odontológico apropriado, sempre pela mesma dupla de dentistas. A presença de lesões bucais associadas ao transtorno descritas na literatura foram observadas, somente 6,8% apresentaram perimólise e 1,6% apresentaram ulcerações em tecido moles. As lesões mais comuns foram 50,8% cárie, 39% gengivite, 25,42% ressecção gengival e 11,8% abrasão. Sialodenose e ilhas de amálgama não foram observadas. De acordo com os relatos dos pacientes avaliados, uma paciente referiu história prévia de candidose bucal e 27,1% relataram ardência bucal, porém todos os pacientes não apresentavam lesões sugestivas de candidose no momento da coleta. Segundo Russo et al. (2008), essa sensação de ardor bucal pode ocorrer devido a atrofia da mucosa em consequência da falta de algumas vitaminas e outros nutrientes. O índice de CPO-D também foi avaliado e registrado, sendo utilizado como um dos parâmetros das condições bucais para a escolha de indivíduos controle. Os pacientes avaliados que requeriam tratamento odontológico, puderam ser atendidos na própria unidade.

A coleta das amostras bucais por enxágüe bucal foi escolhida baseada nos relatos de Samaranayake et al. (1986) que relata ser um método simples e sensível para se detectar por cultivo a presença na cavidade bucal de leveduras, *Staphylococcus aureus* e coliformes. Estes autores concluíram também que a técnica do enxágüe bucal é versátil e tão sensível quanto às técnicas de *imprint* e metodologias salivares, além de apresentar maior praticidade, pois o tempo clínico despendido na coleta de saliva é em média de 15 minutos e o de coleta de enxágüe bucal apenas 1 minuto (Willians; Lewis, 2000).

Em nosso estudo piloto, avaliamos os métodos de coleta por enxágüe bucal, saliva estimulada e coleta com *swab*. Um fator determinante na escolha pelo método de enxágüe bucal foi a limitação observada no grupo de estudo durante as coletas. As pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa quando examinadas, apresentam

um reflexo aumentado de regurgitação, impossibilitando algumas formas de coleta, possivelmente por utilizarem com frequência a auto-indução de vômitos como prática compensatória de ganho de peso. Esta forma de coleta nos trouxe benefícios em relação à aplicabilidade clínica, mas foram necessários vários testes para padronização dos procedimentos moleculares, pois os trabalhos publicados utilizavam normalmente coleta das amostras bucais por *swab*, saliva, biofilme dental ou por meio de cones de papel.

Além da coleta de amostra da cavidade bucal por meio do enxágüe bucal realizamos também a coleta de biofilme supragengival, estrutura composta por grande quantidade de microrganismos firmemente aderida à superfície dental. Para tal, foi realizada a coleta de biofilme supragengival marginal nos dentes incluídos para a determinação do Índice de Higiene Oral Simplificado (Greene e Vermillion, 1964), com auxílio de explorador dental esterilizado, de acordo com Sedgley et al. (2006). A coleta de biofilme dental subgengival não foi foco do presente estudo já que segundo a literatura, doenças periodontais são raramente encontradas nos pacientes com desordens alimentares porque a maioria deles são relativamente jovens (De Moor, 2004).

O ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, foi o meio utilizado para o isolamento de leveduras, por ser o meio de cultura mais comumente empregado nas rotinas laboratoriais para este fim, por se tratar de um meio barato, confiável e bem estabelecido para leveduras do gênero *Candida*; contudo, muitas colônias apresentam características morfológicas semelhantes, dificultando o isolamento em caso de cultura mista (Beighton et al., 1995). Para facilitar esta discriminação, poderíamos ter utilizado um meio diferencial cromogênico, porém este meio de cultura é mais caro e há controvérsias em relação às contagens de colônias quando comparado com ágar Sabouraud dextrose. Ribeiro (2003) relatou que o ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol apresentou maior número de colônias (UFC/ml) de saliva em relação ao CHROMágar, e que

esta diferença poderia ser explicada pelo fato do CHROMágar ser um meio mais seletivo e conseqüentemente inibir parcialmente alguns isolados de *Candida*. No estudo de Beighton et al. (1995) esta diferença não foi observada. Como o enfoque deste estudo também era avaliar a prevalência deste gênero, a partir de resultados quantitativos, optou-se pelo uso do ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol. Avaliamos que com o isolamento de três colônias de cada morfologia distinta para identificação fenotípica, somado ao emprego de técnicas genotípicas, conseguimos obter resultados representativos deste gênero para os grupos estudados, tanto quantitativos quanto qualitativos. No estudo de Siqueira et al. (2007), também utilizando ambas as técnicas para avaliar microrganismos de canais radiculares, fizeram o isolamento de 1 ou 2 colônias com morfologia diferente.

No presente estudo, 44 pacientes do grupo de estudo foram positivos para *Candida* spp., o que corresponde a 74,6%. No grupo controle, houve menor freqüência de isolamento (50,84%). Estes resultados estão próximos aos encontrados em outros estudos, em que grupos com alterações sistêmicas ou locais apresentam maior freqüência de isolamento em relação aos indivíduos controle (Webb et al., 1998; Ellepola; Samaranayake, 2000; Sánchez-Vargas et al., 2005; Back-Brito et al., 2008).

Em geral, o isolamento de *Candida* da cavidade bucal não é uma evidência de infecção, uma vez que fungos desse gênero são comensais, para diagnosticá-la, aspectos clínicos devem ser considerados (Samaranayake; Mac Farland, 1990; Ellepola; Samaranayake, 2000), porém como há relatos de candidose como uma das alterações clínicas freqüentemente observadas na mucosa bucal destes pacientes (Alonso et al., 2001; Russo et al., 2008), deve haver uma avaliação mais criteriosa afim de não se subestimar a epidemiologia para esse grupo. Esta alta freqüência de isolamento nos pacientes pode estar relacionada à deficiência nutricional, como a redução de ferro, zinco,

vitamina K entre outras vitaminas solúveis em água (Jabra-Rizk et al., 2001; Russo et al., 2008); prática de auto-indução de vômitos, que torna o pH bucal mais ácido e alguns estudos sugerem que o ambiente mais ácido favorece a colonização por estas espécies (Webb et al., 1998; Davis, 2003; Monroy et al., 2005); ou poderia ainda estar relacionada à dieta no caso das pacientes bulímicas; já que os alimentos escolhidos para ingestão nas crises compulsivas geralmente são de carboidratos e sacarose (Aranha et al., 2008).

A identificação fenotípica dos isolados de levedura foram realizadas pelo sistema API 20 C AUX (Biomérieux, França). Este teste verifica a habilidade do isolado em utilizar determinado substrato como única fonte de energia. O perfil da reação de assimilação fornece um código numérico, e por comparação deste perfil com uma base de dados, o isolado é identificado em gênero e espécie. É um método de identificação de fácil execução e interpretação, além de oferecer o resultado em menor tempo (72hs) quando comparado a identificação fenotípica clássica (formação de tubo germinativo, produção de clamidoconídeos em microcultivo, fermentação e assimilação) (Williams; Lewis, 2000; Silva; Candido, 2005). Para a correta identificação, algumas vezes são necessárias a realização de uma prova complementar, em que se verifica a formação de hifa/pseudohifa após crescimento do isolado em ágar arroz. Sete isolados foram identificados como *C. famata*, mas com baixa porcentagem de discriminação e foram submetidos ao teste complementar proposto pelo sistema API para confirmação. Destas, 5 amostras foram identificadas posteriormente como *C. albicans* e 2 como *C. tropicalis*. Todas as cepas identificadas como *C. dubliniensis* pelo sistema API 20 C AUX foram confirmadas no teste molecular corroborando os bons resultados de diferenciação entre *C. albicans* de *C. dubliniensis* pelo sistema API 20 C AUX (Silva; Candido, 2005).

Entretanto, o sistema API 20 C AUX apresenta algumas limitações que foram observadas durante os procedimentos de

identificação. Com esse sistema não é possível distinguir entre as espécies *C. krusei* e *C. inconspícua*, constando no resultado o nome de ambas as espécies. Também não é possível identificar de *C. lipolytica*, uma vez que esta espécie apresenta o mesmo perfil de assimilação de *C. krusei*. Para minimizar a possibilidade de uma identificação errada é possível diferenciar estas espécies com a prova de fermentação de carboidratos, em que *C. krusei* fermenta somente a glicose, e *C. lipolytica* não fermenta nenhum dos carboidratos do teste (Sandven, 1990; Koneman et al., 2008).

Dentre as espécies identificadas no grupo de estudo, *C. albicans* foi a mais freqüentemente isolada (81,63%), seguida de *C. dubliniensis* (5,44%), *C. parapsilosis* (4,08%), *C. glabrata* (2,72%), *C. tropicalis* (2,72%), *C. zeylanoides* (2,04%), *C. krusei* (1,36%). No grupo controle *C. albicans* também foi a espécie mais isolada (80,09%), seguida de *C. dubliniensis* (4,76%), *C. tropicalis* (4,76%), *C. glabrata* (4,76%), *C. krusei* (3,17%), e *C. guilliermondii* (1,58%).

A literatura demonstra que *C. albicans* é a espécie prevalente isolada do corpo humano, tanto como um organismo comensal, quanto como patógeno oportunista (Ellepola; Samaranayake, 2000; Koga-Ito et al., 2006). Infecções bucais e vaginais por *C. albicans* são comuns em indivíduos com comprometimento imunológico e em casos mais severos de imunossupressão podem estar relacionados à infecção sistêmica (Hube, 2004). Dentre os trabalhos com isolados bucais, esta espécie sempre aparece como a espécie mais freqüente em diversos grupos, tanto em indivíduos saudáveis, quanto naqueles com alterações sistêmicas ou bucais e em casos de candidose (Jabra-Rizk et al., 2001; Darwazeh et al., 2002; Grimoud et al., 2003; Belazi et al., 2004; Belazi et al., 2005).

O grupo de estudo apresentou maior diversidade de espécies quando comparado ao grupo controle, resultado já observado em estudos anteriores com pacientes com outros fatores predisponentes

(Martins et al., 2002; Ribeiro, 2003; Komiyama et al., 2004; Querido, 2006; Back-Brito et al., 2009; de Araújo Navas et al., 2009). Embora a prevalência de espécies não-*albicans* tenha representado apenas 18,37% dos isolados no grupo de estudo, este resultado é importante, visto que os relatos sobre infecções ocasionadas por espécies não-*albicans* têm aumentado significativamente nos últimos anos e as candidemias provocadas por *C. albicans* de modo geral possuem melhor prognóstico em relação às espécies não-*albicans* (Hazen, 1995; Eggimann et al., 2003; Al-Abeid et al., 2004; Laupland et al., 2005; Koneman et al., 2008).

A identificação da espécie *C. zeylanoides* identificada somente no grupo de estudo nos despertou interesse por ser uma espécie associada à onicomicoses (Koneman et al., 2008). Um estudo relata que a presença de onicofagia está relacionada a quadros de ansiedade ou a auto-agressões (Alonso et al., 2001), o que poderia explicar o isolamento desta espécie em amostras bucais. Esta espécie também já foi relacionada à candidemia e artrites por Eggimann et al., 2003.

Para os procedimentos moleculares, optou-se por não agrupar as amostras, análise em “*pool*”, para que, se necessário, houvesse a possibilidade de relacionar os resultados com a história médica e odontológica do paciente, assim, as bibliotecas foram geradas separadamente para cada material de coleta (bochecho e biofilme dentário) e por paciente. Para bactérias, as bibliotecas foram geradas com o amplicom do gene 16S do cistron ribossomal, bastante utilizado em outros estudos por se tratar de uma região conservada (Kroes et al., 1999; Kolenbrander, 2000; Paster et al., 2001; Kazor et al., 2003; Aas et al., 2005; Marchini et al., 2007, Campos et al., 2008); Para fungos, optamos pela região D1/D2 do gene 28S do cistron ribossomal (Kurtzman; Robnett, 1997). Realizamos a amplificação por PCR a partir do DNA genômico e utilizamos iniciadores genéricos tanto para bactérias quanto para fungos.

Outra alteração sugerida pelo relator foi o aumento do número de clones a serem avaliados, no projeto inicial seriam 100 clones

no total por paciente, que foi alterado para 300 clones. Com base na literatura e em trabalhos anteriores realizados no laboratório, prevíamos uma maior diversidade para bactérias, assim, dos 300 clones selecionados por paciente, 200 correspondiam à análise de bactéria e 100 à análise de fungos. Dois terços de ambas as bibliotecas tinham como origem o material genético coletado a partir da cavidade bucal e um terço a partir do biofilme supragengival.

Nos procedimentos moleculares foram encontradas dificuldades para recuperação de DNA total de fungo a partir das amostras. A possibilidade de haver uma maior massa de DNA bacteriano nas amostras da cavidade bucal que poderia estar agindo como inibidor para amplificação foi testada. Separamos alguns tubos do excedente de enxágüe bucal que foi armazenado em um ultracongelador a -80°C . Fizemos o protocolo de extração utilizado para bactérias a partir de 500 μl deste material, mas não gerou bons resultados de amplificação para nenhuma amostra testada. Um segundo teste incluiu suspensões de *C. albicans* em PBS de acordo com as escalas 0,5 e 1 de MacFarland que alíquotamos em volumes de 100 μl . Enxágüe bucal de um voluntário sabidamente *Candida* negativo foi coletado e após confirmação por semeadura em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, alíquotas de 400 μL deste material foi armazenado para procedimentos posteriores. Alguns dos reagentes citados em um protocolo de extração, descrito no “*Guide to yeast genetics and molecular biology*” para extração de DNA de *Saccharomyces cerevisiae* (Philippsen et al., 2004) foram testados. Duas alíquotas de enxágüe bucal foram contaminadas com 100 μl das suspensões fúngicas e uma alíquota do enxágüe bucal não foi contaminada, para servir de controle negativo. Os procedimentos descritos na metodologia para extração de DNA fúngico a partir das amostras de enxágüe bucal foram realizados. Reações de PCR para amplificação de DNA de fungo e de bactérias foram realizadas. A reação de PCR para DNA bacteriano serviu como controle positivo para refutar,

em caso de amplificação, a possível existência de inibidores no produto da extração de DNA total, e para fungos, reações contendo pares de iniciadores diferentes foram realizadas, para testar se um par seria mais eficiente que o outro. Amplificação da reação para bactéria de todas as amostras testadas e para fungos foi observada e, apenas o controle negativo não amplificou. Esse resultado indicou que a presença de bactérias não agia como inibidor para os procedimentos de amplificação para fungo, além de mostrar o excelente resultado deste protocolo para extração fúngica. Procuramos ainda testar se o número de células de fungo na amostra total (enxágüe bucal) seria um fator limitante na recuperação de DNA fúngico nestas amostras. Para este teste uma suspensão de *C. albicans* em PBS de acordo com a escala 0,5 de MacFarland foi preparada e a partir desta, realizamos diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:10.000. Suspensões puras e também alíquotas de bochecho contaminadas com cada suspensão foram utilizadas para os procedimentos de extração, além de uma alíquota do bochecho puro para controle. Semeamos uma alíquota de 100 µl da suspensão 0,5 e das demais diluições em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol para avaliação da contagem média (UFC/ml) em cada suspensão. Os valores de UFC/ml para a suspensão 0,5 e diluições 1:100, 1:500, 1:1000 e 1: 10.000 foram: incontáveis, 697, 146, 97 e 8 respectivamente. Como houve amplificação de todas as amostras testadas (suspensão e diluições puras e suspensões e diluição mais bochecho), confirmamos a eficiência do protocolo de extração mesmo em valores baixos de UFC/ml.

Objetivando confirmar os resultados obtidos, excedentes de enxágüe bucal armazenado que apresentavam diferentes contagens de UFC/ml de *Candida* que os pacientes (do grupo de estudo e controle) apresentaram nos procedimentos de cultivo, que variaram de 9,5 a 576 UFC/ml foram utilizados. Após os procedimentos de extração das

amostras e PCR, os resultados positivos de amplificação para fungo foram confirmados.

Nos primeiros procedimentos, quando não tivemos bons resultados para extração de fungo a partir da amostra total, recorremos à literatura científica, mas verificou-se que os estudos publicados sobre fungos eram baseados na análise direta dos isolados a partir do crescimento de colônias em meio de cultura ou na utilização de re-PCR para amplificação (Miyakawa et al., 1992; San-Blas et al., 2005). Dois estudos que identificaram leveduras do gênero *Candida* diretamente da amostra, fizeram coleta de biofilme e analisaram a amostra por *pool* (Aas et al., 2007; Campos et al., 2008), que caracteriza uma amostragem bastante diferente a deste estudo. Para a cavidade bucal, a maioria dos estudos contemplou a identificação da microbiota bacteriana, como demonstrado na revisão de literatura. Recentemente, dois estudos descreveram a extração de DNA de leveduras a partir de amostras a partir de 5 ml de enxágüe bucal. Os autores concluem que a técnica de PCR *multiplex* proposta neste estudo possibilitou a identificação das espécies *Candida* mais freqüentemente isoladas, de maneira rápida e sem protocolos laboriosos e dispendiosos para extração. A metodologia sugerida e os resultados obtidos neste trabalho chama a atenção tendo em vista as dificuldades em relação à extração de DNA fúngico no início dos procedimentos moleculares. Com o intuito de investigar a eficiência da metodologia proposta, os métodos descritos foram reproduzidos, porém utilizamos inicialmente os iniciadores para fungos disponíveis no laboratório e não tivemos o mesmo resultado. A fim de reproduzir toda metodologia proposta e para eliminar qualquer possível viés, repetimos o experimento com os mesmos iniciadores descritos, e novamente os resultados não puderam ser reproduzidos.

Além deste teste, objetivamos comparar o protocolo de extração que utilizamos em nosso estudo, com alguns kits comerciais disponíveis para extração fúngica, pois em testes pilotos, verificou-se que

o protocolo padronizado neste estudo se apresenta como uma metodologia simples, que utiliza reagentes da prática rotineira do laboratório de biologia molecular, para extração de DNA fúngico de boa qualidade, que pode ser utilizado em diversas técnicas moleculares posteriores.

Após a solução das questões referentes à extração de fungos, as bibliotecas foram geradas e o seqüenciamento realizado. Os resultados da identificação a partir da similaridade das seqüências nucleotídicas obtidas com as seqüências depositadas no *GenBank* revelaram a existência de gêneros além do gênero *Candida*, o que nos levou à discussão sobre os dados obtidos com a identificação do API, pois para este, apenas o gênero *Candida* foi observado.

Para explicar essa discrepância voltamos nossos questionamentos para a taxonomia dos fungos e as mudanças que nela vem ocorrendo nas últimas décadas, principalmente após a influência dos dados moleculares. Os fungos, de uma maneira geral, apresentam as duas formas de reprodução, sexuada (telemorfo) e assexuada (anamorfo), que ocasionou no passado um sistema de dupla nomenclatura para as duas formas de uma mesma espécie desde que uma tivesse sido identificada sem saber da existência da outra forma reprodutiva. Como em geral, em meios de cultivo de prática rotineira nos laboratório a forma mais comum é a assexuada, por longo tempo os fungos identificados nesse estado eram classificados como fungos imperfeitos e colocados em um táxon “virtual”, dos deuteromicetos, até que a forma sexuada fosse identificada e permitisse sua reclassificação.

Com o advento das abordagens moleculares na taxonomia fúngica, tem-se proposto o abandono do duplo sistema de nomeação para uma classificação unificada com base na seqüência do rDNA. O gênero *Candida* conta hoje com 340 espécies anarmórficas (dados de 2007 Taxonomy-NCBI), sendo que pelo menos, 13 telemorfos já são conhecidos, tais como *Pichia* e *Debaryomyces*, já classificados

como outros gêneros (Guarro et al., 1999). Assim, nossos resultados com base na identificação molecular evidenciam que a tendência de unificação do sistema de nomenclatura está sendo gradualmente implementada, pois espécies classificadas anteriormente pela microbiologia clássica no gênero *Candida* já estão sendo reclassificadas levando em consideração a fase telemórfica dos fungos, e atualmente são classificados em gênero e espécie em: *Clavispora lusitanae*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia norvegensis* e *Yarrowia lipolytica*.

Além destes, outros fungos foram identificados genotipicamente. *Arthroderma gypseum* é o telemorfo de *Microsporium gypseum*, dermatófito que pode estar associado a infecções de pele, pêlos e unhas de seres humanos e de animais; o gênero *Cladosporium* está relacionado a infecções de pele após ferimentos traumáticos e lesões penetrantes; *Kazachstania* é composto por algumas leveduras que pertenciam ao gênero *Saccharomyces* bem como algumas espécies anteriormente atribuídas a outros gêneros. *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo responsável por uma micose sistêmica endêmica nos países da América Latina (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Não podemos afirmar que estes fungos façam parte da microbiota residente, podem ser microrganismos transitórios ou até mesmo contaminação do ambiente laboratorial (Stenderup, 1990). *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Rhodotorula* são isoladas em mucosas e pele humana, o isolamento a partir da cavidade bucal também é relatado em outros estudos com identificação fenotípica (Cannon et al., 1995; Jabra-Rizk et al., 2001; Ribeiro, 2003; Komiyama et al., 2004; Sánchez-Vargas et al., 2005; Matos, 2009). Aas et al. (2007) utilizando a técnica de amplificação do gene (18S rRNA) relataram que surpreendentemente *S. cerevisiae* foi a única espécie de fungo encontrada no paciente HIV positivo com eritema gengival linear e em dois pacientes HIV positivos com periodontite, e citaram que esta espécie tem sido associada a infecções oportunistas em pacientes com imunossupressão grave.

Outro fato intrigante quando comparamos as identificações fenotípicas com as genotípicas, foi a existência de um paciente do grupo controle que não apresentou crescimento de colônias no cultivo, sendo considerado, portanto, *Candida* negativo, ter identificação genotípica de várias espécies deste gênero, como *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. A coleta deste paciente foi realizada no mesmo dia que outros dois indivíduos controle *Candida* positivos, que diminui a possibilidade de falha durante os procedimentos de semeadura. Como a técnica molecular é mais sensível, duas hipóteses podem ser inferidas a este resultado, baixa quantidade de leveduras na amostra ou células não viáveis que impedem as técnicas baseadas em cultivo, mas não às moleculares. A possibilidade de contaminação durante a extração, PCR ou clonagem, foi descartada, pois usamos controles negativos em todos os processos. Outro cuidado tomado para evitar principalmente a contaminação pós-PCR, foi irradiar com luz UV pipetadores automáticos e ponteiros usadas durante os procedimentos bem como utilizar alíquotas pequenas dos reagentes, em geral de uso único.

Para *Staphylococcus* o número de pacientes positivos foi alto em ambos os grupos, perfazendo 96,6% de indivíduos positivos no grupo de transtornos alimentares e 91,53% no grupo controle. Estudos anteriores com outros grupos de estudo e indivíduos controle já demonstraram não haver diferenças quantitativas em relação a estes microrganismos (Jacksons et al., 1999; Jacksons et al., 2000; Smith et al., 2001; Back-Brito, 2006; Querido, 2006). Smith et al. (2001) concluíram que as espécies de estafilococos podem ser freqüentemente isoladas da cavidade bucal de crianças ou adultos, saudáveis ou com alguma doença sistêmica. Devido aos altos valores de isolamento relatados, Jacksons et al. (1999) e Jacksons et al. (2000) têm considerado que os estafilococos fazem parte da microbiota bucal normal. Nossos resultados corroboram esta hipótese, uma vez que observamos grande número de indivíduos

positivos, mas em relação às contagens destes microrganismos (UFC/ml) entre os dois grupos, houve maior isolamento de estafilococos no grupo com transtorno alimentar.

Em relação às espécies identificadas, os grupos apresentaram espécies e porcentagens de isolamento variadas. *S. epidermidis* foi a espécie prevalente dentre as amostras coagulase-negativas e *S. aureus* foi a espécie coagulase-positiva mais frequentemente isolada, em ambos os grupos. O grupo de estudo apresentou maior diversidade de espécies coagulase-negativas, como *S. warneri*, *S. capitis*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. hominis*, *S. chromogenes*, *S. lentus*, *S. cohnii* também descritas em outros estudos (Rams et al., 1990; Dáhlen & Wikstrom, 1995; Jacksons et al., 1999; Jacksons et al., 2000; Smith et al., 2003; Loberto et al., 2004; Murdoch et al., 2004; Back-Brito, 2006; Querido et al., 2006). Foi também identificado dentre os isolados do grupo de estudo o gênero *Micrococcus*. A família Micrococcaceae inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus*. Os membros do gênero *Micrococcus* são encontrados no meio ambiente e como microbiota transitória na pele de humanos e vários outros mamíferos (Koneman et al., 2008).

Em nossos resultados da identificação molecular, houve a detecção de *Staphylococcus* spp. somente no grupo controle (2 clones). Observando outros estudos que avaliaram amostras da cavidade bucal, também ocorreu baixa identificação deste gênero de microrganismo. Paster et al. (2001) avaliando amostras de placa subgingival identificaram *Staphylococcus warneri* no grupo de pacientes com periodontite refratária. Em 2002, Paster et al., também relataram a identificação de 4 clones de *S. aureus* de um total de 109 clones avaliados pertencentes a dois pacientes e dois clones de *S. epidermidis* de um total de 184 clones também avaliados de dois pacientes. Siqueira et al. (2007) identificaram *S. aureus*, *S. saccharolyticus*, *S. epidermidis* e *S. pasteurii* por seqüenciamento do gene rRNA de canais radiculares infectados após

cultivo. Lockart et al. (2008) identificaram *S. epidermidis* em amostras de sangue, após escovação e após extração dental nos grupos placebo e amoxicilina, e *S. warneri* no grupo após escovação e após extração dental no grupo amoxicilina. Fato interessante é reportado no estudo de Bahrani-Mougeot et al. (2008) e Woo et al. (2008) sobre a técnica de seqüenciamento do 16S RNA não diferenciar muitas vezes espécies deste gênero, como *S. aureus* de *S. epidermidis* e que para tal seria necessário realizar o teste de coagulase para a identificação final destas espécies. Embora estas espécies estejam intimamente relacionadas geneticamente, suas características patogênicas são significativamente diferentes.

Enterobactérias e pseudomonas foram isoladas em 59,32% do grupo controle e em 69,49% do grupo de estudo, e não houve diferença estatisticamente significativa entre as contagens destes microrganismos entre os grupos. Para alguns autores as bactérias entéricas são consideradas transitórias na cavidade bucal ou quando são encontradas os números são reduzidos. Todavia, o aumento do número destes microrganismos pode indicar um desequilíbrio da microbiota bucal (Schmidt-Westhausen et al., 1991; Figueirêdo et al., 2001; Hägg et al., 2004). Portanto a presença destes microrganismos na cavidade bucal parece estar associada a fatores sistêmicos e locais, porém as porcentagens de isolamento relatadas na literatura em diferentes grupos fazem com que este assunto permaneça controverso. Jobbins et al. (1992) relataram isolamento de coliformes em 49% dos pacientes com neoplasia maligna. Öhman et al. (1995) e Pannuti et al. (2001), relataram pequena prevalência destes microrganismos em pacientes idosos e deficientes mentais, respectivamente. Senpuku et al. (2003) encontraram enterobactérias em 16% dos idosos avaliados e em 6% dos indivíduos controle e pseudomonas em 14% no grupo de estudo e 6% nos indivíduos saudáveis. Prevalência maior de enterobactérias e/ou pseudomonas na cavidade bucal foi observada por Santos & Jorge (1998) em indivíduos

brasileiros saudáveis (51%). Hägg et al. (2004) relataram aumento significativo da prevalência de enterobactérias após a inserção do aparelho fixo nos pacientes avaliados. Back-Brito (2006) observou que enterobactérias e/ou pseudomonas foram identificadas na cavidade bucal de 77,7% do grupo HIV e em 40% nos sítios periodontais e o grupo controle apresentou menor frequência de isolamento em ambos os locais de coleta (44,4% na cavidade bucal e 6,6% nos sítios periodontais).

O ágar MacConkey foi utilizado para o isolamento das bactérias Gram-negativas por se tratar de um meio seletivo, que evita o crescimento de bactérias Gram-positivas a partir de cultivos mistos (Ohkusu, 2000; Koneman et al., 2008; Fillius et al., 2003). A caracterização fenotípica das espécies das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae necessitam de uma bateria de provas bioquímicas. O sistema de identificação API 20E (Biomérieux, França) possibilita a determinação de 21 características as quais estão entre os grupos de provas mais amplamente usadas pelos sistemas compactos. O sistema é um dos mais utilizados nos laboratórios clínicos e possui uma base de dados abrangente que inclui cepas comuns e atípicas. O API 20E tem sido comparado, nos últimos vinte anos, com vários outros sistemas e, devido a sua grande aceitação no mercado dos laboratórios clínicos e microbiológicos, tornou-se o padrão-ouro entre os sistemas comerciais (O'hara, 2005; Koneman et al., 2008).

O grupo de estudo apresentou maior diversidade de espécies, sendo que *Enterobacter cloacae* foi à espécie prevalente dentre os isolados da família Enterobacteriaceae e *Pseudomonas luteola* foi a espécie da família Pseudomonaceae mais frequentemente isolada. O isolamento clínico de *E. cloacae* é comum, sendo descrito na cavidade bucal e em bolsas periodontais por vários autores (Slots et al., 1990; Moor et al., 1993; Dählen & Wikstrom, 1995; Santos & Jorge, 1998, Back-Brito, 2006; Querido, 2006). Fortis et al. (1998) citaram que a incidência de *Klebsiella* varia de acordo com a presença de alguns fatores que

influenciam a resposta imune assim como a má-nutrição, correspondendo a 26% em alguns casos. Em nossos resultados, observamos que houve maior isolamento do gênero *Klebsiella* no grupo controle (24 isolados) em relação ao grupo de estudo (14 isolados), porém maior número de espécies foi identificado neste último grupo citado.

A identificação de microrganismos pertencentes a estas famílias também não é freqüentemente relatada na literatura utilizando técnicas moleculares. Em nosso estudo, foram detectados o gênero *Pseudomonas* (1clone) no bochecho do grupo controle e a família Enterobacteriaceae (3 clones), nas amostras de bochecho dos grupos de estudo e controle e no biofilme dentário do grupo de estudo. A identificação dos gêneros que compõem as famílias destes microrganismos em outros estudos genotípicos também é escassa. *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, Enterobacteriaceae foram as identificações encontradas em trabalhos de cárie, biofilme subgingival e lesões endodônticas (Paster et al., 2001; Munson et al., 2004; Sakamoto et al., 2008)

Para isolar *Enterococcus*, optamos pelo ágar Enterococcosel, as colônias sugestivas de enterococos apresentavam-se como colônias pequenas, escuras e com halo marrom. Diversos testes bioquímicos, tais como reações de fermentação, hidrólise de pirrolidonil- β -naftilamida (PYR), motilidade, produção de pigmentos, são necessários para diferenciar as espécies de *Enterococcus* (André et al., 2005; Koneman, 2008). Segundo Winston et al. (2004), os métodos tradicionais para identificar espécies de *Enterococcus* são dispendiosos em custo, tempo e esforços, assim, o sistema API 20 Strep foi selecionado para a identificação dos isolados por ser um método mais rápido, dispensando a padronização dos diversos testes necessários à identificação e de sabida acurácia para este fim. (Garcia-Garrote et al., 2000; Mihaila-Amrouche et al., 2004).

Com essa metodologia foi possível isolar enterococos de 19 (32,2%) pacientes do grupo Anorexia e Bulimia Nervosas e de 5 (8,5%) indivíduos do grupo controle. São poucos os estudos que analisaram a prevalência de *Enterococcus* spp. na cavidade bucal. Chomicz et al. (2004) relatou alta frequência de isolamento em pacientes com diabetes *mellitus* insulino-dependentes (60%) e baixa em pacientes controle (6,6%). Komiyama (2008) avaliou, por enxágüe bucal, a presença de enterococos na cavidade bucal humana de grupos de indivíduos controle subdivididos por faixa etária. O grupo dos pacientes de 35-59 anos teve uma frequência de isolamento (30%) próxima à encontrada em nosso grupo de estudo e o grupo de 4-11 anos próxima ao do grupo controle, 10%. Em seu estudo, foi observada uma maior diversidade de espécies (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. avium*). Sedgley et al. (2004) relataram o isolamento por enxágüe bucal de *E. faecalis* em 11% dos pacientes que estavam sobre tratamento endodôntico e em 1% nos estudantes de odontologia sem história de tratamento endodôntico. Em 2006, Sedgley analisaram a presença desses microrganismos em vários sítios na boca incluindo sulco gengival e canais radiculares, verificando maior prevalência em ventre de língua e mucosa bucal de pacientes adultos.

Não houve identificação deste gênero pelos procedimentos moleculares neste estudo. Na literatura, estudos com esta metodologia genotípica encontram *E. faecalis* em amostras de biofilme subgengival e associados a infecção endodôntica após falha terapêutica (Paster et al., 2001; Sakamoto et al., 2008).

Estreptococos do grupo *mutans* foram isolados em 100% das amostras no grupo de estudo e em 85,13% no grupo controle. Para lactobacilos, o grupo de estudo apresentou 96,6% de isolamento, enquanto no grupo controle 59,32% dos indivíduos foram positivos. Estes dois grupos de microrganismos desenvolvem-se bem em pH ácido e estão relacionados à atividade de cárie (Koga-Ito & Jorge, 2007). Estudos

sobre a prevalência de cárie dental em pacientes com transtornos alimentares são conflitantes. Alguns pesquisadores reportaram que pacientes com Bulimia Nervosa exibem um alto índice de cárie dental conseqüente do consumo exagerado de carboidratos durante os episódios de compulsão alimentar, além de apresentarem higiene bucal deficiente. Além disso, o uso de antidepressivos tem como conseqüência a xerostomia e isso pode ocasionar no aumento de lesões cervicais cariosas (Stege et al., 1982). Alonso et al. (2001) relataram que o aparecimento de cáries dos pacientes com transtornos alimentares parece ser variável, como na população em geral. Estes autores concluem que a atividade de cárie nestes pacientes depende da duração e freqüência da crise bulímica, da dieta, índice de higiene bucal, do grau de xerostomia e dos medicamentos que tomam. A associação entre índice de cáries e a freqüência de indução de vômitos ainda é incerta segundo Moor (2004). Hurst et al. (1977) assim como Milosevic & Slade (1989) reportaram não haver diferenças significativas no número de cárie dental entre pacientes com Anorexia Nervosa e pacientes controles. Para estes autores, o único grupo no qual o índice de cárie mostra-se significativamente aumentado é o dos pacientes com compulsão alimentar devido ao alto consumo de alimentos calóricos e carboidratos, aumentando o risco de desenvolver cáries.

O ágar Mitis Salivarius acrescido de sacarose e bacitracina é o meio seletivo mais utilizado para estreptococos do grupo *mutans*, em que as colônias características destes microrganismos são convexas, opacas, com aparência de vidro esmerilhado (Jorge, 2007). O ágar Rogosa é utilizado para isolamento de espécies de lactobacilos, uma vez que este gênero prefere habitat com baixo pH, como o fornecido por este meio, mas sua seletividade não é absoluta. As colônias de lactobacilos são identificadas pela morfologia discóide característica (Munson et al., 2004; Jorge, 2006). Estes dois meios de cultura foram escolhidos pelas características de seletividade e possibilidade de

diferenciação morfológica das colônias, o que permitiria uma contagem adequada. Para estes dois grupos de microrganismos houve diferenças estatisticamente significantes dessas contagens, sendo maior no grupo de estudo. Um estudo de 1991 avaliou a presença de *S. mutans* e lactobacilos na cavidade bucal de 15 pacientes anoréxicas e relatou não haver diferença da presença destes microrganismos entre este grupo e o grupo controle, contudo, o tamanho amostral (n=15) deste estudo foi bastante reduzido, sendo, portanto, pouco representativo (Liew et al., 1991).

Embora, neste estudo, estreptococos e lactobacilos não tenham sido isolados para uma identificação fenotípica posterior, os resultados genotípicos contemplaram a diversidade destas espécies entre os grupos. Grande diversidade de espécies de *Streptococcus* foi identificada em ambos os grupos. *S. mutans* e *S. sobrinus* foram identificados no biofilme dentário no grupo de estudo, estes microrganismos são associados à cárie, e muitos estudos moleculares tem confirmado a presença desses em lesões de cárie (Munson et al., 2004; Chhour et al., 2005; Aas et al., 2008). Aas et al. (2005) avaliando diferentes nichos bucais relataram que *S. mitis* foi a espécie mais comum, em todos os sítios e de todos os pacientes avaliados. Estes autores também relacionaram outras espécies de acordo com o nicho de coleta e concluíram que *S. sanguinis* e *S. australis* apresentam predileção por colonizar tecido mole e *S. intermedius* preferencialmente colonizam o biofilme subgengival.

Os lactobacilos são microrganismos relacionados com a progressão de cárie e estão diretamente relacionados com a alta e freqüente ingestão de carboidratos sendo *L. casei* e *L. fermentum* as espécies mais comuns (Ahumada et al., 2001). Munson et al., 2004 relataram grande variedade de espécies de lactobacilos no estudo da microbiota de lesões de cárie. Não houve detecção de lactobacilos nas amostras de biofilme supragengival no grupo de estudo, mas uma maior

diversidade de espécies deste gênero foi observada nas amostras do bochecho.

Além destes microrganismos que foram cultivados, os resultados genotípicos demonstraram a presença de *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Actinomyces* e *Atopobium*, microrganismos já descritos em estudos moleculares relacionados à cárie (Aas et al., 2008; Preza et al., 2008; Preza et al., 2009).

Não podemos afirmar quanto ao risco de cárie, pois para tanto, outros parâmetros deveriam ter sido avaliados, mas como nossos resultados demonstram maior isolamento (por cultivo) e maior variedade de espécies (molecular) de microrganismos fortemente relacionados com cárie nos pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa, julga-se necessário um cuidado maior quanto à prevenção de cárie neste grupo.

As técnicas de cultivo permitiram no passado a associação de diversos microrganismos a diferentes doenças. Robert Kock (1843-1910) demonstrou de maneira direta o significado etiológico das bactérias como agentes de doença infecciosa, o que foi confirmado posteriormente por Pasteur e outros cientistas (Jorge, 2006). Embora haja limitações nesta metodologia, como microrganismos fastidiosos de difícil cultivo pelos métodos microbiológicos tradicionais ou dificuldade em se estabelecer meios de cultura e condições adequadas para espécies relatadas como não cultiváveis, estas técnicas trazem informações importantes na correlação agente etiológico e doença. Técnicas de cultivo demonstram a presença de microrganismos viáveis, que podem ser contados para uma análise quantitativa. Estes microrganismos isolados podem ser submetidos a vários ensaios para sua caracterização, como testes de adesão em diferentes materiais, produção de enzimas ou substratos, entre outros, que podem estar relacionados à virulência. Além disso, com o cultivo destes isolados, o perfil de suscetibilidade frente a diferentes antimicrobianos pode ser realizado, visando orientar as opções de tratamento utilizadas na prática clínica (Parahitiyama et al., 2009).

Está bem estabelecido atualmente que a análise molecular detecta microrganismos que não podem ser cultivados, no entanto, também está se tornando evidente que existem outros microrganismos que são encontrados por meio de cultura que não são detectados na análise molecular (Munson et al., 2004). Alguns vieses desta técnica são relatados na literatura (Suzuki; Giovannoni, 1996; Suau et al., 1999; Becker et al., 2002). Problemas que podem ocorrer desde a extração de DNA da amostra até a PCR são descritos. Na extração, a lise da parede celular de microrganismos Gram-positivos é mais difícil do que de Gram-negativos, mas a freqüente detecção de microrganismos Gram-positivos do filo Firmicutes, por exemplo, pela análise molecular sugerem que a falha de lise não é responsável pela baixa identificação deste grupo de bactérias. A quantidade de G+C na fita molde de DNA (DNA *template*), o uso de iniciadores genéricos, o número de ciclos utilizados, parece influenciar na amplificação por PCR (Dutton et al., 1993; Suzuki; Giovannoni, 1996; Suau et al., 1999; Becker et al., 2002; Munson et al., 2004; de Lillo et al., 2006). A ligação do inserto durante os procedimentos de clonagem, o número de clones e a seleção destes ao acaso para a formação das bibliotecas também podem contribuir para a subestimação de algumas espécies menos abundantes.

Comparando os resultados de identificação observou-se que houve pouca detecção de estafilococos, enterobactérias, pseudomonas e enterococos pelos procedimentos moleculares. Como já discutido, espécies de estafilococos foram isolados em quase todos os indivíduos do grupo de estudo e controle, para enterobactérias em cerca de 50% dos pacientes avaliados e enterococos houve menor freqüência de isolamento por técnicas de cultivo. Na tentativa de elucidar tal resultado, cinco isolados de estafilococos e cinco de enterobactérias foram submetidos aos procedimentos de extração, seguindo o protocolo realizado na extração das amostras de bochecho e do biofilme. Verificou-se a eficiência do protocolo de extração tanto para as bactérias Gram-

positivas (estafilococos) quanto para as Gram-negativas (enterobactérias) avaliando o produto da extração em gel de agarose 1%. Uma reação de amplificação com os iniciadores genéricos para bactérias e sob o mesmo ciclo utilizado anteriormente foi realizada, e obteve-se a confirmação de amplificação de todas as amostras testadas. Estes resultados refutam a possibilidade de falha durante os procedimentos referentes à extração e amplificação, e nos leva a questionar sobre a quantidade destes microrganismos frente à população microbiana total que habita a cavidade bucal.

Muitos trabalhos com metodologias moleculares têm trazido informações sobre identificação de microrganismos, respondendo quem são os microrganismos encontrados em determinado nicho bucal seja de diferentes grupos de indivíduos ou de afecções, mas há muito a se estudar em relação à proporção, a interação e o que significa a presença destes na cavidade bucal ou em determinada condição.

Este estudo foi delineado para identificar a população bacteriana e fúngica que habita a cavidade bucal em pacientes com Anorexia e Bulimia Nervosas. De acordo com a nossa proposta, primeiramente observamos a presença ou ausência de determinados gêneros ou espécies no grupo de estudo e controle e notamos maior diversidade de microrganismos no grupo de estudo.

Algumas das identificações genotípicas obtidas trazem como informação o filo (como Firmicutes), ordem (ex.: Bacillales), família (como exemplo Eubacteriaceae e Lachnospiraceae) ou gêneros (ex.: *Peptococcus*) não chegando ao nível do táxon espécie. Muitas destas identificações de filós, famílias, gêneros ou espécies foram encontradas em outros estudos a partir de amostras bucais, em outras populações de estudo ou afecções bucais específicas (Kroes et al., 1999; Kolenbrander, 2000; Paster et al., 2001; Munson et al., 2002; Kazor et al., 2003; Munson et al., 2004; Aas et al., 2005; Kumar et al., 2005; Marchini et al., 2007; Campos et al., 2008). Muitos desses microrganismos estão relacionados a

infecções sistêmicas oportunistas ou bucais (Paster et al., 2001), como destacamos a seguir.

O gênero *Actinomyces* foi encontrado em ambos os grupos. Munson et al., 2004 relataram que o filo *Actinobacteria* foi sub-representado nas análises moleculares quando comparado ao cultivo. Este filo é composto por organismos Gram-positivos com o DNA contendo grande quantidade de G+C, fatores que poderiam ocasionar falha durante extração e amplificação. Porém Kumar et al. (2005) testaram a extração e amplificação utilizando *A. viscosus* em uma mistura com outras espécies, e esta espécie foi detectada com comparável sensibilidade, sugerindo que o viés pode ser atribuído a sobre-representação com a técnica de cultivo. A espécie *A. naeslundii* é uma bactéria Gram-positiva freqüentemente encontrada na cavidade bucal. Estas bactérias estão entre as espécies pioneiras na formação do biofilme dentário e têm sido detectadas em doenças bucais, como a cárie dental, periodontites e lesões endodônticas. Estas bactérias são capazes de metabolizar carboidratos de ácidos orgânicos e também podem acumular polissacarídeos intracelulares, propriedades relacionadas ao potencial cariogênico dessas bactérias (Munson et al., 2002; Munson et al., 2004; Kumar et al., 2005). *A. odontolyticus* também é relacionada com cárie dental, mas há estudos que relatam infecções sistêmicas destes microrganismos em pacientes imunossuprimidos (Cone et al., 2003).

Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans foi identificado no biofilme dentário do grupo com transtorno alimentar. Este microrganismo tem sido encontrado com baixa abundância nos estudos moleculares (Kroes et al., 1999; Paster et al., 2001; Hutter et al., 2003; Faveri et al., 2008). Segundo Faveri et al. (2008), os estudos de cultivo demonstram que esta espécie está presente na proporção entre 2 a 5% do total da microbiota subgingival cultivável. Os autores acreditam, que mesmo a despeito desta baixa proporção, *A. actinomycetemcomitans*

deve ser relacionado com doença periodontal devido as suas características de virulência e agressão ao periodonto.

Variantes nutricionais de estreptococos (NVS) foram inicialmente descritas em 1961 como um novo tipo de estreptococos que exibiam um comportamento satélite ao redor de outras colônias de bactérias. Por estudos de hibridação DNA-DNA, Bouvet et al. em 1989 demonstraram que NVS isolados poderiam ser divididos em dois grupos, *Streptococcus defectivus* e *Streptococcus adiacens*; essas duas novas espécies mostraram baixa afinidade com a referência de DNA de outras cepas de *Streptococcus*. Em 1995, um novo gênero, *Abiotrophia*, foi criado, e as duas espécies foram transferidas, sendo reclassificadas em *Abiotrophia defectiva* e *Abiotrophia adiacens*. "Abiotrophia" significa vida com deficiência nutricional e remete para as espécies "que requerem suplementação no meio de crescimento". Desde então, três novas espécies foram adicionadas, *Abiotrophia elegans* (relacionadas a endocardite em humanos), *Abiotrophia balaenopterae* (isolada a partir de uma baleia) e, mais recentemente *Abiotrophia para-adiacens* (endocardite em humanos), que tem sido proposto para algumas cepas semelhantes a *A. adiacens*. Filogeneticamente, o gênero *Abiotrophia* consiste em duas linhagens distintas, *A. defectiva* e um grupo semelhante composto por: *A. adiacens*, *A. balaenopterae*, e *A. elegans*. Por isso, recentemente foi proposto que estas últimas três espécies devem ser reclassificadas em um novo gênero, *Granulicatella* (Christensen; Facklan, 2001). O gênero *Abiotrophia* foi encontrado em ambos os grupos, a espécie *Abiotrophia defectiva* é encontrado principalmente na superfície dentária e é considerado uma espécie bacteriana benéfica (Corby et al., 2005; Aas et al., 2005), porém alguns estudos relataram casos de endocardite causada por este microrganismo (Lin; Hsu, 2007; Assche; Stephens, 2008). O gênero *Granulicatella* também foi identificado em ambos os sítios estudados e nos dois grupos avaliados.

Siqueira e Rôças (2005) relataram que *Catonella morbi* e *Granulicatella adiacens* foram detectadas em 33% e 19%, respectivamente, de canais radiculares associados com periodontite apical crônica, 30% e 10%, respectivamente, dos casos diagnosticados como periodontite apical aguda, e 16% e 11%, respectivamente, das amostras colhidas de coleção de abscessos apicais agudos. Em infecções endodônticas primárias *C. morbi* ocorreu em 26% e *G. adiacens* em 14%. Em nosso estudo, *C. morbi* foi detectado em ambos os grupos estudados.

Campylobacter sp. é um importante patógeno veiculado pelos alimentos e os produtos de origem aviária são os mais implicados na transmissão desses microrganismos aos humanos. Estas bactérias são a primeira causa de gastroenterite em humanos nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos (Friedman et al., 2004). Várias espécies de *Campylobacter* são freqüentemente encontradas na cavidade bucal, e alguns, como *C. rectus*, *C. gracilis* e *C. showae*, têm sido relacionados com doença periodontal em humanos. *C. curvus*, são isolados a partir de humanos. Na cavidade bucal, geralmente estão presentes no ambiente gengival saudável ou doente (Kroes et al., 1999; Paster et al., 2001). Assim, o significado médico para *C. curvus* e seus reservatórios além da gengiva são em grande parte desconhecido (Han et al., 2005). Em nosso estudo, espécies de *Campylobacter* foram isoladas tanto no grupo com transtorno alimentar, quanto no grupo controle e em ambos locais de coleta.

O gênero *Capnocytophaga* compreende bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos, capnofílicos, fusiformes e com motilidade. Alguns estudos relataram que este gênero parece ter importante papel na etiologia de infecções periodontais, pois tem sido isolado em grande número dessas lesões, embora também seja encontrado no sulco gengival de pessoas sem doença periodontal (Batista et al., 2004; Aas et al., 2007). *C. ochracea* é encontrada na microbiota subgengival e já foi correlacionada com sepse grave em pacientes

imunocomprometidos e também com um abscesso cerebral causada por um isolado multi-resistente (Desai et al., 2007). Este gênero também foi descrito em amostras subgingivais de pacientes HIV positivos (Aas et al., 2007) e foi isolado somente no grupo ANBN.

Os microrganismos dos gêneros *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* e *Kingella* são responsáveis por 3% dos casos de endocardites. Apresentam propriedades clínicas e microbiológicas semelhantes entre si, são os bacilos Gram-negativos, mais facilmente isolados em meios aeróbicos, suas culturas necessitam de tempo prolongado de incubação para crescimento (média 3 dias) e podem ser considerados como parte da flora normal do trato respiratório superior e da orofaringe. Algumas características comuns foram identificadas nas endocardites por esses agentes, como o diagnóstico difícil pela natureza fastidiosa e culturas negativas (Petti et al., 2006). Nos estudos moleculares, estes microrganismos tem sido freqüentemente encontrados em amostras da cavidade bucal (Paster et al., 2002;

Cellulosimicrobium cellulans, microrganismo somente encontrado no grupo de estudo, é um bacilo Gram-positivo pertencente à subordem Micrococccineae. É considerado um agente patogênico incomum, mas foi isolado em caso de bacteremia (Rowlinson et al., 2006). Uma característica interessante desse microrganismo é que ele apresenta diversas enzimas líticas para leveduras, e várias delas tem sido utilizadas comercialmente para extração de DNA fúngico, como as *lyticase*, *zymolyases* e *quantazyme* (Ferrer, 2006).

O gênero *Corynebacterium* sp. é considerado parasita das mucosas ou pele de mamíferos, ocasionalmente são encontrados em outras fontes; alguns são patogênicos para mamíferos, possuindo um grande número de espécies, as quais vivem em uma variedade de habitat, incluindo alguns importantes patógenos para os animais e para o homem (Koneman et al., 2008).

Há carência de informações clínicas e microbiológicas sobre as doenças humanas causadas pelo gênero *Dialister* devido à dificuldade associada ao cultivo e identificação bioquímica destes microrganismos. Com o advento das técnicas moleculares, tem crescido o interesse sobre estes microrganismos e seu potencial patogênico, principalmente em microbiota mista. As bactérias do gênero *Dialister* têm sido identificadas em infecções bucais com uma maior frequência (Munson et al., 2002; Bahrani-Mougeot et al., 2008). *Dialister pneumosintes*, uma espécie frequentemente associado a infecções purulentas, abscessos cerebrais e feridas de mordida (Rouse'e et al., 2002), também tem sido considerado como um patógeno periodontal em potencial e em infecções endodônticas (Ghayoumi et al., 2002; Siqueira; Rôças, 2002; Aas et al., 2007).

Eubacterium spp. tem sido encontrado em abscessos dentoalveolares e infecções endodônticas (Wade et al., 1997; Saito et al., 2006). O gênero *Filicator* também tem sido descrito no caso de infecções endodônticas refratárias (Siqueira; Rôças, 2004).

Gemella morbillorum e *Gemella haemolysans* são bactérias comensais do trato respiratório superior humano. Contudo, como patógenos oportunistas, são capazes de causar infecções graves, como endocardite, bacteriemia, meningite, entre outras (Zolezzi et al., 2007). No estudo de Aas et al. (2007) *G. morbillorum* representaram 84% dos clones identificados e estavam presentes em 5 dos 14 pacientes HIV positivos. *G. haemolysans* estava presente na biblioteca de clones geradas a partir do material coletado de pacientes saudáveis no estudo de Kroes et al., 1999. Estas duas espécies foram isoladas em ambos os grupos.

O principal habitat de *Leptotrichia* na cavidade bucal humana é o biofilme dental. Amostras de *Leptotrichia buccalis* têm sido ocasionalmente recuperadas a partir de sangue em doentes com neutropenia e endocardite (Patel et al., 1999).

Espécies dos gêneros *Rothia*, *Selenomonas* e *Capnocytophaga* são consideradas oportunistas ou patógenos emergentes. *Selenomonas sputigena* e *Treponema socranskii* são freqüentemente encontrados em pacientes com doença periodontal (Faveri et al., 2008). Uma vez que pacientes com transtornos alimentares têm muitas alterações sistêmicas que podem predispor à ocorrência de doenças locais e sistêmicas a presença desses microrganismos é um achado importante.

O gênero *Neisseria* é composto por cocos Gram-negativos anaeróbios que são parasitas da boca e dos tratos intestinal e respiratório do homem e outros animais. *Neisseria meningitidis* é uma bactéria do tipo coco Gram-negativo cujo hospedeiro natural é o ser humano e podem causar meningites, infecção do sangue e outras infecções graves em crianças e adultos. *Neisseria gonorrhoeae* é o agente causal da gonorréia, uma doença de transmissão sexual que pode infectar a uretra, a vagina e o ânus e que pode se propagar pelas articulações. Muitas outras espécies de *Neisseria* habitam normalmente na garganta, na boca, na vagina e no intestino, mas raramente causam doença, mas podem atuar como patógenos oportunistas. *N. elongate* foi associada à ocorrência de endocardite (Hsiao et al., 2008). O isolamento deste gênero em amostras bucais já foi descrito em outros estudos (Paster et al., 2002; Munson et al., 2004)

Espécies do gênero *Veillonella* foram encontradas em todos os nichos bucais de indivíduos saudáveis avaliados por Aas et al., (2005). Embora estas bactérias façam parte da microbiota bucal comensal humana, também estão envolvidas com o desenvolvimento de cárie dental, desenvolvendo um papel importante na produção de ácidos (Aas et al., 2008).

Espécies relacionadas com a doença periodontal, como *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. e *Fusobacterium* spp. foram detectadas em ambos os grupos, enquanto a espécie *Tannerella*

forsythensis foi somente isolada no grupo controle, enquanto *A. actinomycentemcomitans* foi encontrada somente no grupo de estudo.

Algumas espécies que não são associadas à cavidade bucal, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Terraheemophilus* mas que estão amplamente distribuídas no ambiente, foram detectadas por Paster et al. (2002), Sakamoto et al. (2008) e neste estudo.

O método molecular que empregamos no presente estudo, nos permite avaliar a composição da microbiota bucal, mas não nos permite uma análise quantitativa. Alguns estudos apresentam os números de clones identificados correlacionando a uma proporção daquele dado microrganismo, porém, como discutido anteriormente, o número de clones correspondente a determinada espécie não pode ser extrapolado em relação à prevalência desta espécie, devido aos possíveis vieses inerentes a própria técnica.

Recentemente, foi publicado um estudo sobre a microbiota bucal de indivíduos obesos, relatando forte associação entre a ocorrência de obesidade e a bactéria *Selenomonas noxia*, encontrada na boca (Goodson et al., 2009). A técnica molecular utilizada neste estudo foi “*checkerboard*” com sondas de DNA específicas para 40 espécies de bactérias bucais. Com esta técnica, os autores calcularam uma porcentagem estimada das espécies em cada amostra (“DNA percent”). Baseados nesta análise, os autores relataram que esta espécie foi encontrada em um grau elevado em mais de 90% das mulheres obesas e sugerem que este microrganismo poderá servir como indicador da doença. Embora nosso estudo não tenha contemplado uma relação quantitativa, houve a identificação desta espécie em ambos os grupos avaliados neste estudo, assim como em outros estudos (Paster et al., 2001; Munson et al., 2004; Aas et al., 2007; Faveri et al., 2008). Portanto, a hipótese de um microrganismo servir como marcador para uma dada doença deve ser vista com cautela e questionamentos, como se a

presença deste é causa ou conseqüência de determinada condição, devem ser feitos.

Vários trabalhos a respeito da microbiota bucal que utilizam a análise filogenética a partir da seqüência do gene 16S do RNA ribossomal têm corroborado com as especulações a respeito da existência de grande diversidade de microrganismos não cultiváveis. Resultado semelhante foi obtido em nosso estudo, entretanto em uma segunda análise dos *singlets* ou *contigs* que geraram tal identificação, verificamos que boa parte dos singlets apresentavam uma qualidade ruim, com muitas sobreposições de bases ou “N”, e, portanto, foram descartados. Em relação aos *contigs*, observamos que o processamento inicial (CAP3) tolerou várias trocas de bases em seqüências similares. Ao comparar tais seqüências com o banco de nucleotídios configurado em “Megablast”, observamos que tais trocas já eram suficientes para promover a primeira identificação de não cultivável, para uma em nível de família, ou gênero e em alguns casos, gênero e espécie. Algumas seqüências, após esta análise, permaneceram com a identificação de não cultivável, reafirmando a aplicabilidade desta técnica molecular para identificação destes microrganismos.

A observação de que trocas de bases toleradas pelo programa poderiam promover uma identificação equivocada nos remeteu a alguns problemas que têm sido discutidos quanto à análise dos resultados gerados pelo seqüenciamento. A qualidade das seqüências obtidas, a escolha de programas adequados para análise, a atribuição de espécies final baseada nos resultados de similaridade, além da qualidade dos depósitos de seqüências submetidos ao *GenBank* torna difícil a interpretação dos resultados e podem interferir na correta identificação dos microrganismos (Patel, 2001; Devulder et al., 2003; Woo et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos, não se pode definir uma microbiota específica, característica do grupo com transtorno alimentar, mas notou-se que há diferenças quantitativas e qualitativas na

composição da microbiota bucal desses pacientes, utilizando método dependente e independente de cultivo. Observou-se que a combinação destas metodologias parece ser uma abordagem interessante dos estudos sobre diversidade microbiana, trazendo informações abrangentes e complementares. Espera-se que este primeiro *screening* microbiológico da cavidade bucal de pacientes com Anorexia e Bulimia Nervosas traga contribuições à epidemiologia clínica destes transtornos, já que a literatura carece de informações a este respeito. Desse modo, esperamos que outros estudos sejam realizados no intuito de se compreender melhor as interações entre as alterações decorrentes destes transtornos e microbiota bucal.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos por métodos dependentes e independentes de cultivo sobre a diversidade microbiológica existente na cavidade bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa pudemos concluir que:

- a) houve diferenças quantitativas e qualitativas para leveduras do gênero *Candida*, estafilococos e enterococos, que foram avaliados por técnicas de cultivo e identificação fenotípica. O grupo de estudo apresentou maior isolamento e maior diversidade de espécies destes microrganismos;
- b) a prevalência de enterobactérias e pseudomonas na cavidade bucal foi similar nos grupos estudados, porém maior número de indivíduos positivos e maior diversidade de espécies foi observada no grupo de estudo;
- c) houve maior número de estreptococos do grupo *mutans* e lactobacilos (UFC/ml) avaliado pelo método de cultivo no grupo de estudo e maior variedade de espécies destes microrganismos foram observadas pela identificação genotípica também neste grupo;

- d) em relação a composição bacteriana realizada pela identificação genotípica, o grupo dos pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa apresentou maior diversidade (22) frente ao grupo controle (6);

- e) os métodos moleculares para identificação fúngica demonstraram haver maior diversidade de fungos, além do gênero *Candida*, sendo que o grupo de estudo apresentou maior número de gêneros e/ou espécies diferentes.

8 REFERÊNCIAS*

Aas JA, Barbuto SM, Alpagot T, Olsen I, Dewhirst FE, Paster BJ. Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. J Clin Periodontol. 2007;34(3):189-95.

Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol. 2008;46(41):1407-17.

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5721-32.

Abreu CN, Cangelli Filho R. Anorexia nervosa e bulimia nervosa: abordagem cognitivo-construtivista de psicoterapia. Rev Psiq Clin. 2004; 31(4):177-83.

Abuchaim ALG. Aspectos históricos da anorexia e bulimia. Rev Psiquiatr RS. 2002;24(2):199-208.

Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. PNAS. 2004;101(51):17837-42.

Ahmad S, Khan Z, Mokaddas E, Khan ZU. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. J Med Microbiol. 2004;53(7):633-7.

* Baseado em:
International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Ahumada M, del C, Bru E, Colloca ME, Lopez ME, Nader-Macias ME. Lactobacilli isolation from dental plaque and saliva of a group of patients with caries and characterization of their surface properties. *Anaerobe*. 2001;7:71–77.

Al-Abeid HM, Abu-Elteen KH, Elkarmi AZ, Hamad MA. Isolation and characterization of *Candida* spp. in Jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. *Jpn J Infect Dis*. 2004; 57(6): 279-84.

Alonso C, Sabás M, Castillo MA, Weisstaub G, Pascual DM. Transtornos de la conducta alimentaria: repercusiones a nivel oral. *Rev Assoc Odontol Argent*. 2001;89(4): 390-5.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389-3402.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*. 1995;59(1):143-69.

Andre P, Metzger C, Petey S, Muller D, Vidon DJM. Chemiluminescence of enterococci isolates from freshwater. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;245:123-9.

Appelbe OK, Sedgley CM. Effects of prolonged exposure to alkaline pH on *Enterococcus faecalis* survival and specific gene transcripts. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:169-74.

Appolinario JC, Bacaltchuk J, Tratamento farmacológico dos transtornos alimentares. *Rev Bras Psiquiatr*. 2002; 24 (Suppl 3):54-9

Aranha ACC, Eduardo CP, Cordás TA. Eating Disorders Part I: psychiatric diagnosis and dental implications. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(6):73-81.

Arpin C, Dubois V, Maugein J, Jullin J, Dutilh B, Brochet JP, Larribet G, et al. Clinical and molecular analysis of extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteria in the community setting. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5048-54.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Marubio LM, Beaudet AL, Jolkovsky DL, Pinkerton KE, Grando AS, et al. Receptor-mediated tobacco toxicity. Regulation of gene expression through $\alpha 3\beta 2$ nicotinic receptor in oral epithelial cells. *Am J Pathol*. 2005;166:597-613.

Assche AF, Stephens DP. Infective endocarditis with *Abiotrophia defectiva*: the first Australian experience. *Crit Care Resusc*. 2008 Mar;10(1):54.

Assumpção CL, Cabral M. Complicações clínicas da anorexia nervosa e bulimia nervosa. *Rev Bras Psiquiatr*. 2002; 24 (Suppl 3): 29-33.

Bacaltchuk J, Hay P. Tratamento da Bulimia Nervosa: síntese das evidências. *Rev Bras Psiquiatr*. 1999; 21(3):184-7.

Back-Brito GN, Presença de *Candida* spp., *Staphylococcus* spp., Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal de pacientes HIV positivos.[dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2006.

Back-Brito GN, Mota AJ, Vasconcellos TC, Querido SMR, Jorge AOC. Frequency of *Candida* spp. In the oral cavity of Brazilian HIV-positive patients and correlation with CD4 cell counts and viral load. *Mycopathologia* 2009;167:81-87.

Badet C, Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J*. 2008;2:38-48. Epub 2008 Apr 29.

Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Barbuto S, Lockhart PB. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures J Clin Microbiol. 2008;46(6):2129–32.

Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Knost S, Sautter RL, et al. Identification of oral bacteria in blood cultures by conventional versus molecular methods. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo. 2008;105(6):720-4

Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from brazilian periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol. 2001;16(5):306-10.

Bartlett DW, Smith BGN. The dental impact of eating disorders. Dental update. 1994;21:404-7.

Batista OM, Barreto RC. *Capnocytophaga* e doença periodontal Rev. Bras. Ciênc. Saúde. 2004;(1/3):49-52.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):1001-9.

Beighton D, Brailsford SR Lactobacilli and *Actinomyces*: their role in the caries process. In: Stösser L, editor. Berlin: Quintessenz; 1998. p. 130-6.

Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, et al. A multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. Community Dent Health. 2004;21:96-101.

Beighton D, Brailsford S, Samaranayake LP, Brown JP, Ping FX, Grant-Mills D, et al. Multi-country comparison of caries-associated microflora in demographically diverse children. Community Dent Health. 2004 Mar;21(1 Suppl):96-101.

Beighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF et al. Use of CHROMagar *Candida* medium for isolation of yeasts from dental samples. J Clin Microbiol. 1995 Nov;33(11):3025-7.

Belazi M, Velegaki A, Fleva A, Gidarakou I, Papanau L, Baka D, et al. candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. Mycoses. 2005;48(3):192-6.

Belazi M, Velegaki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, et al. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. Oral Microbiol Immun. 2004;19(6):347-51.

Bighetti F, Santos JE, Ribeiro RPP. Grupo de orientação clínico-nutricional a familiares de portadores de transtornos alimentares: uma experiência "grata". Medicina Ribeirão Preto. 2006, 39(3):410-4.

Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 1983;100:243-55.

Borges NJBG, Sicchieri JMF, Ribeiro RPP, Marchini JS, Santos JED. Transtornos alimentares: quadro clínico. Medicina Ribeirão Preto. 2006;39(3):340-48.

Bouvet PJ, Jeanjean S. Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. Res Microbiol. 1989;140(4-5):291-9.

Branger, S. et al. *Escherichia coli* endocarditis: seven new cases in adults and review of the literature. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24(8):537-41.

Brooks, G.F.: Butel, J.S.Morse, S.A, Bastonetes Gram-negativos entéricos (Enterobacteriaceae) . In _ . Microbiologia médica. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000 .Cap.16p. 175 -84.

Burke FJT, Bell TJ, Ismail N, Hartley P. Bulimia: implications for the practicing dentist. *Brit Dent J.* 1996;180(11):421-26.

Butler KM. Enterococcal infection in Children. *Semin Pediatr Infec Dis.* 2006;17:128-39.

Cabrera CC. Estratégias de intervenção interdisciplinar no cuidado com o paciente com transtorno alimentar: o tratamento farmacológico. *Medicina Ribeirão Preto.* 2006;39(3):375-80.

Caldeira TH, Nápole RCD, Busse SR. Erosão dental e a contribuição do cirurgião-dentista no diagnóstico de Bulimia Nervosa. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 2000;54(6):465-67.

Campos MS, Marchini L, Bernardes LAS, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 419–424.

Cannon RD, Holmes AR, Mason AB, Monk BC Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? *J Dent Res.* 1995;74(5):1152-61.

Challacombe, J. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(2):202-10.

Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 2006;48(1):21-26.

Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol.* 2005;43(2) 843–9.

Chomicz L, Szubinska D, Piekarczyk J, Wojtowicz A, Piekarczyk B, Starosciak B, et al. Occurrence of subclinical infections of the oral cavity in the insuline treated diabetics. *Wiad Parazytol.* 2004;50(2):177-80.

Christensen JJ, Facklam RR. *Granulicatella* and *Abiotrophia* from human specimens. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3520-23.

Claudino AM, Borges MBF. Critérios diagnósticos para os transtornos alimentares: conceitos em evolução. *Rev Bras Psiq.* 2002; 24 (Suppl3):7-12.

Cobelo AW, Saikali MO, Schomer EZ. A abordagem familiar no tratamento da anorexia e bulimia nervosa. *Rev Psiq Clin.* 2004;31(4):184-7.

Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, et al. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* 2007;35

Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, et al.. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2009;37.

Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. *AIDS.* 1997;11(5):557-67.

Coleman H, Altini M, Nayler S, Richards A. Sialodenosis: a presenting sign in bulimia. *Head & Neck.* 1998;1(2):758-62.

Colodner, R; Eliasberg, T; Chazan, B; Raz, R. Clinical significance of bacteriuria with low colony counts of *Enterococcus* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; 25:238-41.

Cone LA, Leung MM, Hirschberg J. *Actinomyces odontolyticus* bacteremia. *Emerging Infectious Diseases.* 2003;9(12):1629-32.

Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov;43(11):5753-9.

Cordás TA. Transtornos alimentares: classificação e diagnóstico. *Rev Psiquiatr Clin*. 2004;31(4):154-7.

Cordás TA. Transtornos alimentares em discussão. *Rev Bras Psiquiatr*. 2001; 23(4):178-9.

Cordás TA; Claudino, AM. Transtornos alimentares: fundamentos históricos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2002; 24 (Suppl 3): 3-5.

Cordás, TA; Segal, A. Bulimia I: aspectos clínicos. *J Bras Psiquiatr*. 1995; 44 Suppl 1:20-4.

Dahlén G. Microbiological diagnostics in oral diseases. *Acta Odontol Scand*. 2006;64:164-68.

Dahlén G. Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring of periodontitis. *Adv Dent Res*. 1993;7(2):163-74.

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

Darwazeh AMG, Al-Dosari A, Al-Bagieh NH. Oral *Candida* and nasal *Aspergillus* flora in a group of Saudi healthy dentate subjects. *Int Dent J*. 2002;52(4):273-7.

David M, Bamberger DM, Boyd SE. Management of *Staphylococcus aureus* infections. *Am Fam Physician*. 2005;72(12):2474-81.

Davis D. Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet*. 2003;44(1):1-7.

de Araújo Navas EA, Inocêncio AC, Almeida JD, Back-Brito GN, Mota AJ, Jorge AO et al. Oral distribution of *Candida* species and presence of oral lesions in Brazilian leprosy patients under multidrug therapy. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jun 22. [Epub ahead of print]

Debate RD, Tedesco LA, Kerschbaum WE. Knowledge of oral and physical manifestations of anorexia and bulimia nervosa among dentists and dental hygienists. *J Dent Educ*. 2005; 69(3):346-54.

de Lillo A, Ashley FP, Palmer RM, Munson MA, Kyriacou L, Weightman AJ, et al. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:61–8.

de Lorenzo JL. *Microbiologia para o Estudante de Odontologia*. São Paulo: Atheneu,2004. 274p.

de Moor RJ. Eating disorder-induced dental complications: a case report. *J Oral Rehabil*. 2004 Jul;31(7):725-32.

Desai SS, Harrison RA, Murphy MD. *Capnocytophaga ochracea* causing severe sepsis and purpura fulminans in an immunocompetent patient. *J Infect*. 2007;54(2):107-9.

Devulder G, Perrière G, Baty F, Flandrois JP. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. *J Clin Microbiol*. 2003;4(4):1785-7.

Donnelly S, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology* 1999;145:1871-82.

Dutton CM, Paynton C, Sommer SS. General method for amplifying regions of very high G+C content. *Nucleic Acids Res.* 1993 Jun 25;21(12):2953-4.

Edwardson S, Bing M, Axtelius B, Lindberg B, Söderfeldt B, Attström R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1999;26(3):143-2.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(11):685-702.

Ellepola ANB, Samaranayake LP. Oral candidal Infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(2):172-98.

Endimiani A, Luzzaro F, Brigante G, Perilli M, Lombardi G, Amicosante G, *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(7):2598-605.

Enoch DA, Simpson AJH, Kibbler CC. Predictive value of isolating *Pseudomonas aeruginosa* from aerobic and anaerobic blood culture bottles. *J Med Microbiol.* 2004;53(11):1151-4.

Evans M, Davie JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002;35:221-8.

Faveri M, Mayer MPA, Feres M, de Figueiredo LC, Dewhirst FE, Paster BJ. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol.* 2008;23:112-8.

Ferrer P. Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic β -1,3-glucanases toolbox: a review. *Microbial Cell Factories.* 2006;5(10):1-8.

Figueirêdo RLQ, Batista OM, Ramalho RM; Lima EO. Estudo microbiológico da prevalência de enterobactérias na cavidade bucal de pacientes HIV positivos e sua relação com gênero *Candida*. J Bras Clin Estet Odontol. 2001;5(26):111-5.

Fillius PMG, Van Netten D; Roovers Pje; Vulto Ag ; Gyssens Ic; Verbrugh Ha; Endtz H. Comparative evaluation of three chromogenic agars for detection and rapid identification of aerobic Gram-negative bacteria in the normal intestinal microflora. Clin Microbiol Infect. 2003; 9(9): 912-8.

Flynn MJ, Slots J. Beta – haemolytic streptococci in advanced periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1993;8(5):295-7.

Foad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:122-8.

Fontana M, Zero DT. Assessing patients' caries risk. J Am Dent Assoc. 2006;137(9):1231-9.

Fortis AA, Lianou PE, Papavassiliou JT. Adherence of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* to human buccal epithelial cells, from healthy persons and HIV carriers, under the influence of Broncho Vaxom in vitro and ascorbic acid in vivo. APMIS. 1998 Apr;106(4):441-8.

Foster TJ. Immune evasion by staphylococci. Nat Rev Microbiol. 2005;3(12):948-58.

Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. of different origins. Cur Microbiol. 2004;49:255-60.

Friedman CR, Hoekstra RM, Samuel M, Marcus R, Bender J, Shiferaw B, et al. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis*. 2004 Apr 15;38 Suppl 3:S285-96.

Frydrych AM, Davies GR, McDermott BM. Eating disorders and oral health: a review of the literature. *Australian Dent J*. 2005; 50:6-15.

Garcia-Garrote F, Cercenado E, Bouza E. Evaluation of a new system VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing enterococci. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2108-11.

Ghayoumi N, Chen C, Slots J. *Dialister pneumosintes*, a new putative periodontal pathogen. *J Periodontal Res*. 2002 Feb;37(1):75-8.

Gibas C, Jambeck P. *Developing Bioinformatics Computer Skills*. 1. ed., Sebastopol, CA, USA: O'REILLY, 2001. 427 p.

Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiol*. 1998;144:829-38.

Graninger W, Ragette R. Nosocomial bacteremia due to *Enterococcus faecalis* without endocarditis. *Clin Infect Dis*. 1992;15:49-57.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Souza ELR, Ferraz CCR, Zaia AA et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

Gorgati SB, Holcberg AS, Oliveira MD. Abordagem psicodinâmica no tratamento dos transtornos alimentares. *Rev Bras Psiquiatr*. 2002;24 (Suppl 3):44-8.

Greene JC, Vermillon JR. The simplified oral hygiene index. J Am Dent Assoc. 1964;68:7-13.

Grimoud AM, Marty N, Bocquet H, Andrieu S, Lodter JP, Chabanon G. Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. J Oral Sci. 2003;45(1):51-5.

Goodson JM, Groppo D, Halem S, Carpino E. Is obesity an oral bacterial disease? J Dent Res. 2009 Jun;88(6):519-23.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999 Jul;12(3):454-500.

Gullberg, RM; Homann, SR; Phair, JP. Enterococcal bacteremia: analysis of 75 episodes. Rev Infect Dis 1989; 11: 74-85.

Ha U.; Jin S. Expression of the *soxR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is inducible during infection of burn wounds in mice and is required to cause efficient bacteremia. Infect Immunol. 1999; 67(10):5324-31.

Hägg, U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samaranayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and Enterobacteriaceae. Eur J Orthod. 2004;26(6):623-9.

Han XY, Falsen E. Characterization of oral strains of *Cardiobacterium valvarum* and emended description of the organism. J Clin Microbiol. 2005; 43(5):2370-74.

Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. β -lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(5):303-8.

Hay PJ. Epidemiologia dos transtornos alimentares: estado atual e desenvolvimentos futuros. Rev Bras Psiquiatr. 2002; 24(Suppl 3):13-7.

Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev. 1995;8(4):462-78.

Hellstrom I. Anorexia nervosa-odontological problems. Swed Dent J. 1974; 67:253-69.

Hsiao JF, Lee MH, Chia JH, Ho WJ, Chu JJ, Chu PH. *Neisseria elongata* endocarditis complicated by brain embolism and abscess. J Med Microbiol. 2008;57(Pt 3):376-81.

Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res. 1999 Sep;9(9):868-77.

Hube B. From commensal to pathogen: stage and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. Current Opinion Microbiol. 2004;7(4):336-41.

Hurst PS, Lacey JH, Crisp AH. Teeth, vomiting and diet, a study of the dental characteristics of seventeen Anorexia Nervosa patients. Postgrad Med J. 1977;53:298-305.

Hutter G, Schlagenhaut U, Valenza G, Horn M, Burgemeister S, Claus H, et al. Molecular analysis of bacteria in periodontitis: evaluation of clone libraries, novel phlotypes and putative pathogens. Microbiol 2003;149: 67-75

Iwase M, Slots J, Berthold P, Taichman NS. Leukocidal activity of staphylococci isolated from human periodontal lesions. Oral Microbiol Immunol. 1990;5(4):233-6.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Baqui AA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected individuals. J Clin Microbiol. 2000;38(6):2423-6.

Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Enwonwu CO, Onwujekwe DI Jr, Merz WG, Meiller TF. Prevalence of yeast among children in Nigeria and the United States. Oral Microbiol Immunol. 2001;16(6):383-6.

Jacobson JJ, Patel B, Asher G, Woolliscroft JO, Schaberg D. Oral *Staphylococcus* in older subjects with rheumatoid arthritis. J Am Geriatr Soc. 1997;45(5):590-3.

Jackson MS, Bagg J, Gupta MN, Sturrock RD. Oral carriage of staphylococci in patient with rheumatoid arthritis. Rheumatology. 1999;38(6):572-5.

Jackson MS, Bagg J, Kennedy H, Michie J. Staphylococci in the oral flora of healthy children and those receiving treatment for malignant disease. Microbial Ecol Health Dis. 2000;12:60-4.

Jobbins J, Bagg J, Parsons K, Finlay I, Addy M, Newcombe RG. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease. J Oral Pathol Med. 1992; 21(7):305-8.

Jordan J, Joyce PR, Carter FA, Horn J, Mcintosh VVW, Luty SE, et al. Specific and nonspecific comorbidity in Anorexia Nervosa. Int J Eat Disord. 2008; 41(1):47-56.

Jorge AOC. Microbiologia Bucal. São Paulo. Ed. Santos; 2007. p.198.

Jorge AOC. Princípios de microbiologia e imunologia. São Paulo. Ed. Santos; 2006. p.418.

Jorge AOC, Koga-Ito CY, Gonçalves CR. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. Rev Odontol Univ São Paulo. 1997;11(4):279-85.

Judd WS, Campbell CS, Stevens PF. Plant Systematics: A Phylogenetic Approach. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, MA, USA, 1999. 576p.

Kadir T, Uygun B, Akyüz S. Prevalence of *Candida* species in Turkish children: relationship between dietary intake and carriage. Arch Oral Biol. 2005;50(1):33-7.

Kamma JJ, Nakou M, Baehni PC. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. J Periodont Res. 1999;34(1):25-33.

Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 2004;15:308-96.

Kaye WH, Bulik CM, Thornton L, Barbarich N, Masters K. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. Am J Psychiatry. 2004;161:2215–21.

Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. J Clin Microbiol. 2003;4(2):558-63.

Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. J Dent Res. 2008;87(11):1016-20.

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect. 2006;36(2):78-91.

Kirschiner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi NA, Coe-Smith LP, Sockalingum GS, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J Clin Microbiol.* 2001;39(5):1763-70.

Kleier DJ, Aragon SB, Averbach RE. Dental management of the chronic vomiting patient. *J Am Dent Assoc.* 1984;108:618-21.

Klein DA, Walsh T. Eating disorders: clinical features and pathophysiology. *Physiology & Behaviour.* 2004; 81(2):359-74.

Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009;43(2):83-91.

Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:413-437.

Koga-Ito CY, Jorge AOC. Microbiologia da cárie dentária. In: Jorge AOC. *Microbiologia Bucal.* São Paulo: Livraria Editora Santos; 2007. p.71-88.

Koga-Ito CY, Martins CAP, Jorge AOC. Estudo do gênero *Candida*. In: Jorge, AOC. *Princípios de microbiologia e imunologia.* São Paulo: Ed. Santos, 2006. p.219-38.

Komiyama EY, Ribeiro PM, Junqueira JC, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Prevalence of yeasts in the oral cavity of children treated with inhaled corticosteroids. *Braz Oral Res.* 2004;18 (3):197-201.

Komiyama, EY. Prevalência e suscetibilidade de *Enterococcus* spp. isoladas da cavidade bucal humana [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho “ – UNESP, 2008.

Koneman EW, Winn WC, Allen SD, Janda WM, Procop GW, Schreckenberger PC. Diagnóstico Microbiológico. Texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 1565p.

Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;95(5):14547-52

Kumar BV, Padshetty NS, Bai KY, Rao MS. Prevalence of *Candida* in the oral cavity of diabetic subjects. J Assoc Physicians India. 2005;53:599-602.

Kumar S, Dudley J, Nei M & Tamura K MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Briefings in Bioinformatics. 2008;9:299-306.

Kuramitsu HK, Wang BY. Virulence properties of cariogenic bacteria. BMC Oral Health. 2006;15(6)(Suppl 1): 1-4

Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important *Ascomycetous* yeast based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. J Clin Microbiol. 1997;35(5):1216-23.

Lacaz CS. Leveduras de interesse médico. In: __. Tratado de micologia médica 9.ed. São Paulo: Sarvier , 2002. Cap 6, p.123-54.

Latterza AR, Dunker KLL, Scagliusi FB, Kemen E. Tratamento nutricional dos transtornos alimentares. Rev Psiq Clin. 2004;31(4):173-76.

Lavigne JP, Marchandin H, Czarniecki E, Kaye C, Sotto A. Bactériémies à *Enterococcus* spp.: etude prospective au CHU de Nimes Enterococcal bacteremia at Nimes university hospital. J Pathologic Biologic. 2005;53:539-45.

Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Elsayed S. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3): 532-7.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23:2947-2948.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita*. 2006;25(2):135-48.

Ledder RG, Gilbert P, Huws SA, Aarons L, Ashley MP, Hull PS, et al. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(2):516-23.

Leavis, HL; Bonten, MJM; Willems, RJL. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9: 1-7.

Liew VP, Frisken KW, Touyz SW, Beumont PJ, Williams H. Clinical and microbiological investigations of anorexia nervosa. *Aust Dent J*. 1991 Dec;36(6):435-41.

Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Galle' F, Signoriello G, Colella G, et al. Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplexpolymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24: 76–8.

Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol* 2007;60:1035–9.

Lin CH, Hsu RB. Infective endocarditis caused by nutritionally variant streptococci. *Am J Med Sci*. 2007;334:235-9.

Little JW. Eating disorders: dental implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2):138-43.

Loberto JCS, Martins CAP; Santos SSF; Cortelli JR; Jorge AOC. *Staphylococcus* spp. In the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. Braz J Microbiol. 2004;35(1-2):64-8.

Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. Circulation. 2008;117(24):3118-25

Mähniß B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. Mycoses. 2005; 48:55-61.

Manchanda V, Singh NP, Goyal R, Kumar A, Thukral SS. Phenotypic characteristics of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* & evaluation of available phenotypic techniques for detection of extended spectrum beta-lactamases. Indian J Med. 2005;122:330-7.

Mandel L, Kaynar A. Bulimia and parotid swelling: a review and case report. J Oral Maxillofac Surg. 1992;50:1122-5.

Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. Isolated from oral cavities of patients with diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(3):181-5.

Marchini L, Campos MS, Silva AM, Paulino LC, Nobrega FG. Bacterial diversity in aphthous ulcers. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22:225–231.

Marra MA, Kucaba TA, Hillier LW, Waterston RH. High-throughput plasmid DNA purification for 3 cents per sample. Nucleic Acids Res 1999;27(24):37

Marsou R, Bes M, Boudouma M, Brun Y, Meugnier H, Freney J, et al. Distribution of *Staphylococcus sciuri* subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. Res Microbiol. 1999;150(8):531-44.

Martins CAP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. Braz J Microbiol. 2002;33(3):236-40.

Matos BM. Avaliação do risco de cárie e microbiota fúngica em pacientes pediátricos com anemia falciforme [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2009.

Melin P, Araújo A. Transtornos alimentares em homens: um desafio diagnóstico. Rev Bras Psiquiatr. 2002; 24 (Suppl 3):73-6.

Memmel H, Kowal-Vern A, Latenser BA. Infections in diabetic burn patients. Diabetes Care. 2004;27(1):229-33.

Mihaila-Amrouche L, Schlegel L, Bouvet. A. Impact of susceptibility to antibiotics streptococci e enterococci isolated from patients with infective endocarditis on antibiotic treatment. Indian J Med Res. 2004;199(Suppl):80-3.

Milosevic A, Brodie DA, Slade PD. Dental erosion, oral hygiene, and nutrition in eating disorders. Int J Eating Disorders. 1997; 21(2):195-9.

Milosevic A, Slade PD. The orodental status on anorexics and bulimics. Br Dent J. 1989;167:66-70.

Miyakama Y, Mabuchi T, Kagaya K, Fukazawa Y. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1992;30(4):894-900.

Miyaki CY, Russo CAD, Pereira SL., Reconstrução filogenética. Introdução e método da máxima parsimonia. In: Matioli, S.R. Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos, 2001. cap. 9, p.97-107.

Miyake Y, Iwai T, Sugai M, Miura K, Suginaka H, Nagasaka N. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from tongues of children. J Dent Res. 1991;70(7):1045-7.

Monroy TB, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prothesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10 (Suppl 1):27-39.

Moor RJG. Eating disorder-induced dental complications: a case report. J Oral Rehab 2004; 31:725-32.

Moore VH, Moore WE, Riley C, Brooks CN, Burmeister JA; Smibert RM. Periodontal microflora of HIV positive subjects with gingivitis or adult periodontitis. J Periodontol. 1993;64(1): 48-56.

Morgan CM, Vecchiatti IR, Negrão AB. Etiologia dos transtornos alimentares: aspectos biológicos, psicológicos e sócio-culturais. Rev Bras Psiquiatr. 2002; 24 (Supl III):18-23.

Motta RN, Oliveira MM, Magalhães PS, Dias AM, Aragão LP, Forti AC, et al. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase-producing strains of Enterobacteriaceae isolated from diabetes foot infections in a Brazilian Diabetic Center. Braz J Infect Dis. 2003; 7(2): 29-134.

Mundy, LM; Sahm, DF; Gilmore, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev 2000; 3: 513-22.

Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. J Clin Microbiol. 2004 July. 42(7):3023-29.

Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002; 81(11):761-66.

Murdoch FE, Sammons RL, Chapple ILC. Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. *Oral Dis.* 2004;10(3):155-62.

Murray PR.ed.al. Enterobacteriaceae In : __. Microbiologia médica 3 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan;2000. Cap.29; p .193-203 .

Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and phylogenetics. Oxford University Press, Inc. 2001. 333p.

Nielsen S. Epidemiology and mortality of eating disorders. *Psychiatr Clin North Am.* 2001; 24(2): 201-14.

Oliveira EA, Santos MA. Perfil psicológico de pacientes com Anorexia e Bulimia Nervosas: a ótica do psicodiagnóstico. *Medicina Ribeirão Preto.* 2006; 39(3):353-60.

O'Hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic Gram-negative bacilli. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):147-62.

Ohkusu, K. Cost-effective and rapid presumptive identification of Gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROMagar orientation medium in conjunction with simple biochemical tests. *J Clin Microbiol.* 2000;38(12):4586-92.

Öhman SC, Osterberg T, Dahlén G, Landahl S. The prevalence of *Staphylococcus aureus*, Enterobacteriaceae species, and *Candida* species and their relation to oral mucosal lesions in a group of 79-year-olds in Göteborg. *Acta Odontol Scand*. 1995;53(1):49-54.

Panutti CM, Lotufo RFM, Cai S, Freitas NM, Ferraro AQ. Prevalência de microrganismos superinfectantes na placa bacteriana supragengival de deficientes mentais institucionalizados. *RPG Rev Pos-Grad*. 2001;8(1):35-9.

Parahitiyawa NB, Scully C, Leung WK, Yam WC, Jin LJ, Samaranayake LP. Exploring the oral bacterial flora: current status and future directions. *Oral Dis*. 2009 Jul 16. [Epub ahead of print]

Parsot C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Letters*. 2005;252:11-8.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001;183(12):3770-83.

Paster BJ, Falkler WA, Enwonwu CO, Idigbe EO, Savage KO, Levanos VA, et al. Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2187-91.

Patel A. Testing quantum dynamics in genetic information processing. *J Genet*. 2001 Apr;80(1):39-43.

Patel JB, Clarridge J, Schuster MS, Waddington M, Osborne J, Nachamkin I. Bacteremia caused by a novel isolate resembling leptotrichia species in aneutropenic patient. *J Clin Microbiol*. 1999 Jun;37(6):2064-7.

Patti JM, Bremell T, Krajewska-Pietrasik D, Abdelnour A, Tarkowski A, Rydén C, et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. *Infect Immunol*. 1994;62(1):152-61.

Pinzon V, Nogueira FC. Epidemiologia, curso e evolução dos transtornos alimentares. Rev Psiq Clin. 2004;31(4):158-60.

Pitout JDD, Moland ES, Sanders CC, Thomson KS, Fitzsimmons SR. β -lactamases and detection of β -lactam resistance in *Enterobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(1): 35-9.

Pergoraro CN, Sakamoto FFO, Domingues LA. Perimólise: etiologia, diagnóstico e prevenção. Rev Assoc Paul Cir Dent 2000;54(2):156-61.

Petersen A, Dalsgaard A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. Environ Microbiol. 2003;5(5):395-402.

Petti CA, Bhally HS, Weinstein MP, Joho K, Wakefield T, Reller, LB, et al. Utility of extended blood culture incubation for isolation of *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* and *Kingella* organisms: a retrospective multicenter evaluation. J Clin Microbiol. 2006;44(1):257–259.

Philippsen P, Stotz A, Scherf C. DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Guthrie C, Fink GR. Methods in enzymology. Academic Press; 2004 . Cap. 11,169

Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. J Clin Microbiol. 2008 Jun;46(6):2015-21.

Preza D, Olsen I, Willumsen T, Boches SK, Cotton SL, Grinde B, Paster BJ. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28(5):509-17.

Prieto-Prieto J, Calvo A. Microbiological bases in oral infections and sensitivity to antibiotics. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2004; 9 (Suppl 1):11-8.

Querido SMR. Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2006.

Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol Immunol.* 1990;5(3):166-8.

Relman DA, Falkow, S. Identification of uncultured microorganisms: expanding the spectrum of characterized microbial pathogens. *Infect Agen Dis.* 1992;1(5):245-53.

Relman DA. The identification of uncultured microbial pathogens. *J Infect Dis* 1993;168(1):1-8.

Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999; 284:1308-10.

Ribeiro KMN, Busse SR. Anorexia nervosa em adolescentes do sexo masculino: relato de casos. *Infanto Rev Neuropsiq da Inf e Adol.* 2002; 10(2):53-5.

Ribeiro, PM. Presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de receptores de transplante cardíaco [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; 2003.

Robb ND, Smith BG. Anorexia e bulimia nervosa: conditions of interest for the dental practitioner. *J Dent.* 1996; 24:7-16.

Roberts MW, Li SH. Oral findings in anorexia e bulimia nervosa: a study of 47 cases. *J Am Dent Assoc.* 1987; 115:407-10.

Roe D, Karandikar B, Bonn-Savage N, Gibbins B, Roullet JB. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother* 2008 Apr;61(4):869-76.

Rogosa M, Mitchell JA, Wieman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J Dent Res*. 1951;30(5):682-9.

Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, Mackenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2001;39(9):3282-9.

Romaro RA, Itokazu FM. Bulimia nervosa: revisão da literatura. *Psic Refl Crit* 2002; 15(2):407-412.

Rousée JM, Bermond D, Piémont Y, Tournoud C, Heller R, Kehrl P, et al. *Dialister pneumosintes* associated with human brain abscesses. *J Clin Microbiol*. 2002 Oct;40(10):3871-3.

Rowlinson MC, Bruckner DA, Hinnebusch C, Nielsen K, Deville JG. Clearance of *Cellulosimicrobium cellulans* bacteremia in a child without central venous catheter removal. *J Clin Microbiol*. 2006 Jul;44(7):2650-4.

Ruff JD, Koch MD, Perkins S. Bulimia: dentomedical complications. *Gen Dent*. 1992; 48:48-52.

Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, Beaulieu A, Tibayrenc M, Andremont A. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immunol*. 2001;69(1):584-8.

Russo LL, Campisi G, Fede OD, Liberto CD, Panzarella V, Muzio LL. Oral manifestations of eating disorders: a critical review. *Oral Diseases*. 2008;14: 479-84.

Sader, HS; Biedenbach, D; Jones, RN. Evaluation of Vitek and API 20S for species identification of *Enterococci*. *Diag Microbiol Infect Dis* 1995; 22:315-9.

Saito D, Leonardo Rde T, Rodrigues JL, Tsai SM, Höfling JF, Gonçalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol*. 2006 Jan;55(Pt 1):101-7.

Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21:112–22.

Sakamoto M, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Benno Y. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:275–81.

Salzano FT, Cordás TA. Tratamento farmacológico de transtornos alimentares. *Rev Psiq Clin*. 2004; 31(4):188-94.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

Samaranayake LP, Macfarlae TW. *Oral candidosis*. London: Wright; 1990. 265 p.

Samaranayake LP, Mc Farland TW, Lamey PJ, Ferguson M. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *J Oral Pathol*. 1986; 15:386-8.

San-Blas et al. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):4255–7.

Sánchez-Vargas LO, Ortiz-López NG, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cashat-Cruz M, et al., Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. Rev Iberoam Micol. 2005; 22(2):83-92, June.

Sandvén P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. Acta Odontol Scand. 1990;48(1):27-36.

Santos SSF, Jorge AOC. Presença de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal humana. Rev Odontol UNESP. 1998; 27(2):473-84.

Santos SSF, Loberto JCS, Martins CAP, Jorge AOC. Prevalência e sensibilidade *in vitro* de Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. Pós-Grad Rev Odontol. 2002;5(2):74-83.

Saraiva IH, Jones RN, Erwin M, Sader H. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes a vancomicina. Rev Ass Med Brasil. 1997;43(3):217-22.

Sato S, Kanamoto T, Inoue M. *Abiotrophia elegans* strains comprise 8% of nutritionally variant streptococci isolated from human mouth. J Clin Microbiol. 1999;37:2553-6.

Schmidt-Westhausen A, Schiller RA, Pohle HD, Reichart PA. Oral *Candida* and Enterobacteriaceae in HIV-1 infection: correlation with clinical candidiasis and antimycotic therapy. J Oral Pathol Med. 1991;20(10):469-72.

Schneider, H., Métodos de análise filogenética: Um guia prático. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 114 p.

Seabra BGM, Almeida RQ, Ferreira JMS, Seabra FRG. Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa e seus efeitos sobre a saúde bucal. Rev Bras Patol Oral. 2004;3(4):195-8.

Secko D. Pathogens fight back. CMAJ. 2005;173(8):864. (Editorial)

Sedgley C, Lennan SL, Clewell A. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. Oral Microbiol Immunol. 2004;19:95-101.

Sedgley C, Back G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontics patients using culture and PCR. JOE. 2006; 32(2):104-9.

Segal A, Cordas TA, D`Elia FLGM, Larino MA, Alvarenga M. et al. Bulimia nervosa II: tratamento. J Bras Psiquiatr. 1995; 44 (Suppl 1):25-31.

Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, Tsuha Y, Miyazaki H, Hanada N. Systemic disease in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. Gerontology. 2003;49(5):301-9.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(3):297-310.

Shuter J, Hatcher B, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* binding to human nasal mucin. Infect Immun. 1996;64(1):310-8.

Sicchieri JMF, Bighetti F, Borges NJBG, Santos JE, Ribeiro RPP. Manejo nutricional nos transtornos alimentares. Medicina Ribeirão Preto. 2006; 39(3):371-4.

Silva JO, Candido RC. Evaluation of the API 20C AUX system for the identification of clinically important yeasts. Revi Soc Bras Med Trop. 2005;38(3):261-263.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Dialister pneumosintes* can be a suspected endodontic pathogen. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002 Oct;94(4):494-8.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infections by 16S rDNA-directed multiplex PCR. J Endod. 2004 Dec;30(12):851-4.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections J Clin Microbiol. 2005;43(7):3314-9.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Cunha CD, Rosado AS. Novel bacterial phylotypes in endodontic infections. J Dent Res. 2005;84(6):565-9

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Paiva SSM, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. Oral Microbiol Immunol. 2007; 22: 266-71.

Slots J, Feik D, Rams TE. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. Oral Microbiol Immunol. 1990; 5(6):305-8.

Slots J, Rams TE, Feik D, Taveras HD, Gillespie GM. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. J Periodontol. 1991;62(9):543-7.

Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. J Med Microbiol. 2001;50(11):940-6.

Smith AJ, Brewer A, Kirkpatrick P, Jackson MS, Young J, Watson S, et al. staphylococcal species in the oral cavity from patients in a regional burns unit. J Hosp Infect. 2003;55(3):184-9.

Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. Br Dent J. 2003;195(12):701-3.

Smith RS, Iglewski BH. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *J Clin Invest*. 2003;112(10):1460-5.

Smith BGN, Knight JK. An index for measuring the wear of teeth. *Br Dent J*. 1984;156:435-8.

Soll DR. *Candida* commensalisms and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop*. 2002; 81(2):101-10.

Solomon LW, Merzianu M, Sullivan M. Necrotizing sialometaplasia associated with bulimia: case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007:103:–42.

Song Y, Liu C, Mcteague M, Finegold SM. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant Gram-positive anaerobic cocci. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1363-9.

Souza LV, Santos MA. A família e os transtornos alimentares. *Medicina Ribeirão Preto*. 2006;39(3):403-9.

Soysa NS; Ellepola ANB. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral Dis*. 2005;11(5):269-73.

Stege P, Visco-Dangler L, Rye L. Anorexia nervosa: review including oral and dental manifestations. *J Am Dent Assoc*. 1982; 104:648-52.

Stenderup, A. Oral mycology. *Acta Odontol Scand*. 1990;48(1): 3-10.

Strabelli TVM, Cais DP, Zeigler R, Siciliano R, Rodrigues C, Carrara D, et al. Clustering of *Enterococcus faecalis* infections in a cardiology hospital neonatal intensive care unit. *BJID*. 2006;10(2):113-6.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Nov;65(11):4799-807.

Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *TRENDS Microbiol*. 2004;12(7):317-24.

Sullivan DJ, Coleman D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. *J Clin Microbiol*. 1998;36(2):329-34.

Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;253(1):9-17.

Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiol*. 1995;141(Pt.7):1507-21.

Suzuki J, Komatsuzawa H, Sugai M, Suzuki T, Kozai K, Miyake Y, et al. A long-term survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of children. *Microbiol Immunol*. 1997;41(9):681-6.

Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1996 Feb;62(2):625-30.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007;24:1596-1599.

Tarkowski A, Collins LV, Gjertsson I, Hultgren OH, Jonsson IM, Sakiniene E, et al. Model systems: modeling human staphylococcal arthritis and sepsis in the mouse. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):321-6.

Traebert J, Moreira EAM. Transtornos alimentares de ordem comportamental e seus efeitos sobre a saúde bucal na adolescência. *Pesqui Odontol Bras.* 2001; 15(4):359-63.

Tsang CSP, Samaranayake LP. Oral yeasts and coliforms in HIV-infected individuals in Hong Kong. *Mycoses.* 2000;43(7-8):303-8.

Touger-Decker R. Eating disorders: detection and referral the role of dental professional. *Quintessence Int.* 2006;37(3):199-201.

Tylenda CA, Roberts MW, Elin RJ, Li SH, Altemus M. Bulimia nervosa: its effects on salivary chemistry. *J Am Dent Assoc.* 1991;12:37-41.

Tyrrell GJ, Turnbull L, Teixeira LM, Lefevre J, Carvalho MGS, Facklam RR, et al. *E. gilvus* sp. nov. and *E. pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002;40(4):1140-5.

Ueno M, Jorge AOC. Cocos Gram-negativos. In: Jorge, AOC. *Princípios de Microbiologia e Imunologia.* São Paulo: Livraria Santos; 2006. Cap.9, p.115-42.

Velge P, Cloeckert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problem related to *Salmonella* enterica serotype enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet Res.* 2005;36(3):267-88.

Von Eiff C, Peters G, Heilmann, C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:677-85.

Wade, W. G., Spratt, D. A., Dymock, D. & Weightman, A. J. Molecular detection of novel anaerobic species in dentoalveolar abscesses. *Clin Infect Dis.* 1997;25 (Suppl. 2):235–236.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. *Aust Dent J.* 1998;43(1)45-50.

Werner G, Klare I, Fleige C, Witte W. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of vanA clusters. *Int J Med Microbiol.* 2008; 298(5-6):515-27.

Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000;6:3-11.

Winston LG, Pang S, Haller BL, Wong M, Chambers III HF, Perdreau-Remington F. API 20 Strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004: 287-8.

Woodmansey KF. Recognition of bulimia nervosa in dental patients: Implications for dental care providers. *Gen Dent.* 2000;48:48-52.

Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Oct;14(10):908-34.

Zolezzi PC, Cepero PG, Ruiz J, Laplana LM, Calvo CR; Gomez-Lus R. Molecular epidemiology of macrolide and tetracycline resistances in commensal *Gemella* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chem.* 2007;51(4):1487–90.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, Graziella Nuernberg Back, cirurgiã - dentista, sob a orientação da Prof. Dr^a. Cristiane Yumi Koga Ito, portadora do CPF 279 285 778 - 10, RG 28 976 210 - 8, CRO 83 558; estabelecida na Avenida Dr. Jorge Zarur, 231, apt. 302, Bloco 04, CEP 12 242-000, na cidade de São José dos Campos, cujo telefone de contato (12) 3945 0858, irei desenvolver uma pesquisa cujo título é "Avaliação da microbiota bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa".

O objetivo deste estudo é avaliar a presença de alguns microrganismos na boca (como fungos e bactérias) através da coleta não invasiva e indolor, de enxágüe bucal em pacientes com Anorexia Nervosa, Bulimia Nervosa e indivíduos controle. A coleta do material da boca será feita bochechando solução fisiológica durante 1 minuto e depois deste período este material deve ser depositado no coletor que estamos fornecendo. A solução fisiológica é esterilizada e não traz nenhum risco à sua saúde.

O Sr (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, situada na Av. Eng. Francisco José Longo, 777, CEP 12 245-000, em São José dos Campos, Fone: 3947 9033 e comunique-se com o coordenador Prof^a. Dr^a. Sueli Carvalho Mutti Naressi. Informo que será garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela colaboração.

Termo de consentimento livre e esclarecido

Acredito ter sido esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Avaliação da microbiota bucal de pacientes com anorexia nervosa e bulimia nervosa", e concordo em participar sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que a minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo e com a publicação anônima dos dados gerados por ele. Poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Data: ____ / ____ / ____

Nome do paciente: _____

Endereço completo: _____

Assinatura do paciente

RG

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Hospital das Clínicas



HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

Anex

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD ()

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Avaliação da microbiota bucal de pacientes com Anorexia Nervosa e Bulimia Nervosa
PESQUISADOR: Dra. Graziella Nuemberg Back de Brito
CARGO/FUNÇÃO: Estudante pós-graduação: INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
UNIDADE DO HCFMUSP: AMBULIM- Equipe de Odontologia do Instituto de Psiquiatria do HCFMUSP e Ambulatorio de Bulimia e Anorexia Nervosa (AMBULIM)
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO RISCO MAIOR
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Aproximadamente 12 meses

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Hospital das Clínicas

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa

Pacientes com Anorexia e Bulimia Nervosa podem apresentar alterações extra e intra-bucais em decorrência da deficiência nutricional e a indução de vômito, como desgaste dental, alterações na composição e na quantidade de saliva, assim como nos microrganismos (como fungos e bactérias) encontrados normalmente na boca. O objetivo deste estudo será avaliar a presença de alguns microrganismos na boca (como fungos e bactérias) através de enxágüe bucal em pacientes com anorexia nervosa, bulimia nervosa e indivíduos controle e a presença de possíveis alterações dentárias

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Será realizado um exame clínico utilizando os instrumentais odontológicos, como espelho, pinça e explorador. A coleta do material da boca será feita bochechando soro fisiológico durante 1 minuto e depois deste período este material deve ser depositado no coletor que estamos fornecendo. O soro fisiológico é esterilizado e não traz nenhum risco à saúde do pacientes. Este material será transportado e processado no laboratório da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP para avaliar os microrganismos presentes na boca.

3. desconfortos e riscos esperados

Desconforto mínimo como permanecer com a boca aberta durante o exame clínico e bochecho com soro fisiológico levemente salgado.

4. benefícios que poderão ser obtidos

Avaliação e orientação odontológica.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Acesso garantido pelos pesquisadores que disponibilizarão as informações pertinentes aos pacientes, sempre que solicitados

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Fica garantido a suspensão do uso do material e o desejo de saída da pesquisa a qualquer momento, pelo paciente.

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Hospital das Clínicas

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

O material e as informações sobre os paciente serão disponíveis apenas para os participantes do projeto.

Os dados serão disponíveis apenas paa os participantes do projeto.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Responsáveis – Dra. Graziella Nuemberg Back de Brito

Dra. Eliane F.G.Barbosa Prado

Dra. Cristiane Yumi Koga Ito

Endereço- Av. Ovidio Pires de Campos – 785 – Terreo - Sala 0077 - Telefone – 3069-6498

Av. Eng. José Longo 777 – tel – (012) 39479033 – São José dos Campos - SP

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
Dra. Graziella Nuemberg Back de Brito

APÊNDICE C – Ficha Clínica para pacientes controle

Nome: _____ N° prontuário: _____

Idade: _____ Sexo _____ Código de Identificação: _____

Local da Coleta: _____ Data: _____ Hora: _____

ANAMNESE- HISTÓRIA MÉDICA

01. Está tomando algum remédio? () Sim () Não Qual? _____

02. Tomou antibiótico nos últimos 45 dias? () Sim () Não

03. Está grávida? () Sim () Não

04. É diabético? () Sim () Não

05. Algum destes hábitos? () Fumo () Dependência química () Álcool

06. Já fez ou está fazendo acompanhamento ou tratamento psicológico?

() Sim () Não Qual? _____

07. Há alguma outra informação importante sobre sua saúde que não foi perguntado e que deseje comentar? _____

ANAMNESE - HISTÓRIA DENTAL

01. Tem dor, inchaço ou sangramento na gengiva? () Sim () Não

02. Tem dentes "abalados" ? () Sim () Não

03. Já fez tratamento de gengiva? () Sim () Não

04. Já teve herpes ou "sapinho" na boca? () Sim () Não _____

05. Tem ou já teve feridas na boca que demoram para cicatrizar? () Sim () Não

06. Sente a boca seca? () Sim () Não

07. Sente ardência na boca? () Sim () Não

08. Escova os dentes? () Sim () Não Quantas vezes ao dia? _____

EXAME CLÍNICO

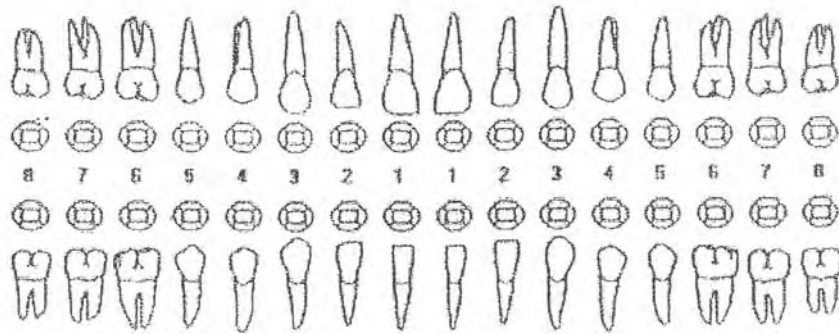
Lesões presentes: _____

Prótese: _____ Aparelho ortodôntico: _____

CPO-D: _____

APÊNDICE D – Ficha Clínica para pacientes do grupo de estudo

ODONTOGRAMA



LESÕES BUCAIS ASSOCIADAS

- Perimólise _____
 Sialoadenose _____
 Traumas/ulcerações tecido mole _____
 Queilite angular _____
 Candidose _____
 Gingivite _____
 Abrasão _____
 Ressecção gengival _____
 Ilhas de amálgama _____
 Cáries _____

Índice de CPOd _____

APÊNDICE E – Informações complementares dos grupos

Quadro 3 – Dados referentes ao grupo ANBN

(continua)

ANBN				
Paciente	Gênero	Idade	Condições bucais	Transtorno
01	F	19	CPO-D = 10	ANR
02	F	30	CPO-D = 15/Fumante	ANP
03	F	20	CPO-D = 12	ANP
04	F	23	CPO-D = 28	ANP
05	F	30	CPO-D = 19	ANR
06	F	21	CPO-D = 19	ANP
07	F	20	CPO-D = 14	ANP
08	F	28	CPO-D = 10	BN
09	M	22	CPO-D = 12	ANR
10	F	27	CPO-D = 9	BN
11	F	34	CPO-D = 23	ANR
12	F	21	CPO-D = 19	ANR
13	F	31	CPO-D = 22	ANP
14	F	44	CPO-D = 24	BN
15	F	25	CPO-D = 10	ANP
16	F	24	CPO-D = 13/Aparelho ortodôntico	BN
17	F	23	CPO-D = 15	BN
18	F	22	CPO-D = 13	BN
19	F	36	CPO-D = 22	BN
20	F	28	CPO-D = 14/Fumante	BN
21	F	28	CPO-D = 28/PPR	BN
22	M	28	CPO-D = 09/Fumante	ANP
23	F	29	CPO-D = 08	ANR
24	F	22	CPO-D = 08	BN
25	F	30	CPO-D = 24/Fumante	BN
26	F	20	CPO-D = 08/Fumante	ANP
27	F	31	CPO-D = 18	ANP
28	F	24	CPO-D = 13/Fumante	BN
29	F	30	CPO-D = 11	ANP
30	F	18	CPO-D = 06	BN
31	F	41	CPO-D = 20/Fumante	ANP
32	F	28	CPO-D = 17	BN
33	F	26	CPO-D = 09/Fumante	BN
34	F	26	CPO-D = 09	BN
35	F	24	CPO-D = 26	ANP
36	F	31	CPO-D = 15	ANP

APÊNDICE E – Informações complementares dos grupos

Quadro 3 – Dados referentes ao grupo ANBN

(conclusão)

ANBN				
Paciente	Gênero	Idade	Condições bucais	Transtorno
37	F	58	CPO-D= 27	ANP
38	M	23	CPO-D= 03	ANP
39	F	26	CPO-D=18	ANP
40	F	20	CPO-D=17	ANP
41	F	28	CPO-D=14	BN
42	F	25	CPO-D=9/ Fumante	ANR
43	F	28	CPO-D=3	BN
44	F	19	CPO-D= 14	ANR
45	F	34	CPO-D= 15	ANP
46	F	34	CPO-D= 14	BN
47	F	19	CPO-D= 10	ANR
48	F	22	CPO-D=09/ Aparelho Fixo	ANP
49	F	34	CPO-D=13/ Fumante	ANP
50	F	21	CPO-D= 02	ANP
51	F	22	CPO-D=12	ANP
52	F	27	CPO-D=16/ Aparelho Fixo	BN
53	F	30	CPO-D= 10	ANP
54	F	40	CPO-D=22	BN
55	F	22	CPO-D=15	BN
56	F	21	CPO-D= 03	BN
57	F	37	CPO-D=21/Fumante	BN
58	F	19	CPO-D=07	BN
59	F	30	CPO-D=13	BN

ANR= Anorexia Nervosa subtipo Restritivo

ANP= Anorexia Nervosa subtipo Purgativo

BN= Bulimia Nervosa

F= gênero feminino M= gênero masculino

CPO-D= Índice de dentes cariados perdidos e obturados

PPR= Prótese Parcial Removível

APÊNDICE E – Informações complementares dos grupos

Quadro 4 – Idade, gênero e condições bucais dos indivíduos controle

(continua)

CONTROLE			
Paciente	Gênero	Idade	Condições bucais
01	F	23	CPO-D=12
02	F	19	CPO-D=09
03	F	23	CPO-D=09
04	F	26	CPO-D=12
05	F	30	CPO-D=10
06	F	30	CPO-D=06
07	F	20	CPO-D=1
08C	M	22	CPO-D=10
09	F	19	CPO-D=7
10	F	32	CPO-D=15
11	F	20	CPO-D=06
12	F	24	CPO-D=11
13	F	18	CPO-D=13
14	F	23	CPO-D=05
15	F	18	CPO-D=11
16	F	21	CPO-D=07
17	F	27	CPO-D=15
18	F	18	CPO-D=02
19	F	20	CPO-D=07
20	F	27	CPO-D= 13
21	F	41	CPO-D= 23
22	F	24	CPO-D=11
23	F	35	CPO-D=15/ Fumante
24	F	38	CPO-D=23
25	F	32	CPO-D=18
26	F	26	CPO-D=13/Aparelho fixo
27	F	23	CPO-D=13/Aparelho fixo
28	F	30	CPO-D=13
29	F	25	CPO-D=24
30	F	39	CPO-D=20
31	F	26	CPO-D=03
32	F	34	CPO-D=14
33	F	36	CPO-D=24
34	F	44	CPO-D=21
35	F	34	CPO-D=15
36	F	21	CPO-D=14
37	F	33	CPO-D=13
38	F	21	CPO-D=05/Fumante
39	M	21	CPO-D=03
40	F	27	CPO-D=28/PPR

APÊNDICE E – Informações complementares dos grupos

Quadro 4 – Idade, gênero e condições bucais dos indivíduos controle

(conclusão)

CONTROLE			
Paciente	Gênero	Idade	Condições bucais
41	F	20	CPO-D=05/Fumante
42	F	57	CPO-D=27
43	F	19	CPO-D=09/Aparelho fixo
44	F	18	CPO-D=14
45	F	19	CPO-D=10
46	M	28	CPO-D=09/Fumante
47	F	19	CPO-D=14
48	F	18	CPO-D=10
49	F	28	CPO-D=09
50	F	21	CPO-D=18
51	F	30	CPO-D=18/Fumante
52	F	34	CPO-D=21/Fumante
53	F	30	CPO-D=13
54	F	39	CPO-D=20/Fumante
55	F	32	CPO-D=26/Fumante
56	F	22	CPO-D=15/Fumante
57	F	27	CPO-D=11/Fumante
58	F	30	CPO-D=11
59	F	28	CPO-D=16/Fumante

C= grupo controle

F= gênero feminino M= gênero masculino

CPO-D= Índice de dentes cariados perdidos e obturados

PPR= Prótese Parcial Removível

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 15: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo ANBN

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	UFC/ml			EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total
				Enterococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.			
01 ANR	1275	72500	0	88750	13125	350	18500000		
02 ANR	18125	437,5	0	0	18750	502,5	4625000		
03 ANP	0	837,5	4925	0	22500	50	1437500		
04 ANP	575	1850	362,5	137,5	1380000	2062,5	33125000		
05 ANR	25	762,5	462,5	0	16250	62,5	1250000		
06 ANP	10700	3512,5	175	175	1080000	370000	14000000		
07 ANP	3262,5	56625,5	0	0	1337,5	62,5	29125000		
08 BN	37,5	137,5	0	12,5	2112,5	512,5	5500000		
09 AN	6137,5	6712,5	0	0	70000	91250	21500000		
10 BN	3937,5	2337,5	1900	12,5	13750	20600	14250000		
11 AN	2312,5	2450	112,5	0	16250	14200	14250000		
12 ANR	2125	3937,5	2275	0	41250	5000	26250000		
13 ANP	13600	200	0	0	8750	175	50500000		
14 BN	6800	1750	0	12,5	125000	1737,5	13625000		
15 ANP	0	1937,5	0	0	37500	1025	6000000		
16 BN	8750	3762,5	97,5	12,5	31250	31250	57500000		
17 BN	2300	1862,5	612,5	12,5	8750	1250	1250000		

(continua)

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 15: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo ANBN

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	UFC/ml			EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total
				Staphylococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.			
18 BN	0	10225	12,5	0	19125	2112,5	8875000		
19 BN	6287,5	1250	25	0	146250	305000	13250000		
20 BN	125	100	4012,5	0	23750	11250	7250000		
21 BN	14400	10850	7875	412,5	85000	128750	8000000		
22 ANP	14400	1437,5	10487,5	0	6250	575	31750000		
23 ANR	0	1250	75	0	22500	1175	9375000		
24 BN	150	1250	4287,5	862,5	236250	357500	4750000		
25 BN	487,5	700	687,5	0	38750	40000	695000		
26 ANP	2075	437,5	3525	0	2500	40500	34000000		
27 ANR	0	12,5	0	0	13750	1000	162500		
28 BN	2075	6962,5	525	0	29,5	37500	8625000		
29 AN	3512,5	1100000	2062,5	0	156250	550000	21750000		
30 BN	575	112,5	212,5	0	525	6200	2875000		
31 ANR	23750	4375	20000	1175	935000	920000	93750000		
32 BN	2462,5	2825	2700	0	26250	75000	3125000		
33 BN	0	0	0	0	25000	362,5	470000		
34 BN	4025	687,5	3375	0	136250	81250	24000000		
35 AN	1225	62,5	1637,5	0	85000	47500	4375000		

(continuação)

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 15: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo ANBN

Paciente	Candida spp.	UFC/ml					EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total
		Staphylococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.					
36 ANP	62,5	0	512,5	12,5	1162,5	21250	462,5		
37 ANP	112,5	500	387,5	1337,5	33750	11250	4625000		
38 ANP	0	1187,5	250	112,5	8750	912,5	4000000		
39 ANP	1687,5	1750	1262,5	0	156250	127500	9250000		
40 ANP	0	1362,5	1962,5	16,5	17500	26250	875000		
41 BN	0	900	0	0	2500	1650	21000000		
42 ANR	50	250	0	0	6250	0	250000		
43 BN	0	2125	725	0	2500	7100	375000		
44 ANR	0	1637,5	0	0	87,52	0	25750000		
45 ANP	5425	9150	762,5	762,5	245000	410000	61250000		
46 BN	58750	192500	600	2337,5	1290000	300000	18000000		
47 ANP	0	362,5	2650	0	3750	1887,5	126250000		
48 ANP	987,5	800	675	0	81250	312,5	11250000		
49 ANP	2200	1325	0	12,5	40000	38750	15375000		
50 ANP	275	3625	0	0	17500	655000	4750000		
51 BN	0	600	0	0	8750	87,5	16000000		
52 BN	837,5	575	137,5	0	232500	2625	7250000		
53 ANP	1787,5	4000	25	0	3750	55000	18000000		

(continuação)

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 15 Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo ANBN

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	UFC/ml			EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total	(conclusão)
			Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.	Enterococcus spp.				
54 BN	0	350	0	0	0	12500	520000	15375000	
55 BN	150	4650	62,5	0	0	32500	325	38000000	
56 BN	2125	3050	650	0	0	8750	8750	85000000	
57 BN	162,5	150	575	0	0	118750	142500	92500000	
58 BN	1687,5	2200	4300	325	325	62,5	4550	43750000	
59 BN	0	25	0	0	0	62,5	9450	11125000	

UFC/ml=unidades formadoras de colônias por mililitro

ANP= Anorexia Nervosa Purgativa

ANR= Anorexia Nervosa Restritiva

BN= Bulimia Nervosa

spp.= espécies

EGM= Streptococcus do grupo mutans

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 16: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo controle

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.	EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total
1	1637,5	21250	1650	0	15000	0	5625000
2	0	1250	11250	0	35000	0	10000000
3	0	662,5	225	0	5000	0	9750000
4	0	925	11250	0	38750	0	5625000
5	0	112,5	600	200	118750	9300	465000
6	0	650	1887,5	0	11250	0	6125000
7	1787,5	425	50000	0	37500	0	123000000
8	0	0	0	0	28750	0	9875000
9	0	137,5	287,5	12,5	650	2950	783750
10	350	337,5	11200	50	37500	4800	74000000
11	0	462,5	43750	0	22500	0	9250000
12	162,5	450	950	0	1250	937,5	7250000
13	0	1212,5	0	0	16250	100	10375000
14	0	0	0	0	26250	0	625000
15	12,5	0	125	0	0	25	2250000
16	0	400	0	0	0	0	2625000
17	112,5	1675	1350	0	11250	537,5	11750000
18	0	0	0	0	7500	25	4500000

(continua)

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 16: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo controle

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	UFC/ml			EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total
			Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.				
19	7225	6125	0	0	26250	60000	11625000	
20	0	237,5	775	0	50	0	21875000	
21	800	750	6862,25	0	812,5	300000	52500000	
22	0	0	0	0	0	0	18000000	
23	112,5	37,5	0	0	0	0	3625000	
24	512,5	3300	0	0	37,5	5750	16000000	
25	1412,5	1925	0	0	3750	235000	16250000	
26	25	787,5	12,5	0	2225	3900	9375000	
27	0	237,5	0	0	62,5	3900	750000	
28	100	837,5	100	0	62,5	950	3000000	
29	0	62,5	0	0	650	900	32000000	
30	0	387,5	375	0	625	377500	13250000	
31	137,5	3212,5	1137,5	0	1250	637,5	24125000	
32	0	12,5	0	0	0	62,5	15125000	
33	575	125	25	0	6250	50000	9750000	
34	0	150	1562,5	0	1250	0	3250000	
35	0	1037,5	25	0	1012,5	0	27250000	
36	675	4150	0	0	12,5	0	8125000	

(continuação)

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 16: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo controle

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	UFC/ml		EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total
				Enterococcus spp.	Enterococcus spp.			
37	2012,5	675	1650	150	150	25	17500	17500000
38	0	562,5	0	0	0	162,5	21250	7750000
39	125	125	0	0	0	400	0	42125000
40	25	637,5	1287,5	0	0	937,5	2112,5	13500000
41	0	25	25	0	0	937,5	0	12125000
42	137,5	6775	50	0	0	200	4525	12750000
43	2712,5	4237,5	8025	0	0	137,5	10400	4862,5
44	0	1350	3162,5	0	0	75	5100	29625000
45	12,5	437,5	1762,5	0	0	150	4612,5	387500
46	925	100	1400	0	0	0	0	14000000
47	0	237,5	0	0	0	125	0	3250000
48	12,5	3562,5	75	0	0	1950	0	12375000
49	0	12,5	0	0	0	0	800	10750000
50	500	275	0	0	0	11250	0	18875000
51	525	1612,5	12,5	912,5	390000	0	7900	25875000
52	50	412,5	537,5	0	0	37,5	337,5	3000000
53	0	287,5	0	0	0	112,5	13450	7375000
54	150	62,5	2137,5	0	0	87,5	2212,5	425000

(continuação)

APÊNDICE F – Os dados referentes aos valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos nos grupos avaliados.

Tabela 16: Valores de UFC/ml para cada gênero e da contagem total de microrganismos para o grupo controle

Paciente	Candida spp.	Staphylococcus spp.	UFC/ml				EGM	Lactobacillus spp.	Contagem Total	(conclusão)
			Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.	Enterobactérias /Pseudomonas	Enterococcus spp.				
55	0	412,5	0	0	0	8750	2237,5	3625000		
56	4212,5	300	12,5	0	0	120000	92500	20875000		
57	0	7337,5	0	0	0	787,5	0	27750000		
58	12,5	137,5	0	0	0	16250	0	24250000		
59	0	2037,5	0	0	0	8750	137500	42875000		

UFC/ml=unidades formadoras de colônias por mililitro

spp.= espécies

EGM= Estreptococos do grupo *mutans*

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa – UNESP São José dos Campos

 **UNESP** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dirceas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / suecy@fosje.unesp.br



CERTIFICADO

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 061/2006-PH/CEP, sobre “Avaliação da microbiota bucal de pacientes com Anorexia nervosa e Bulimia nervosa”, sob a responsabilidade de CRISTIANE YUMI KOGA ITO, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 19 de setembro de 2006.

Profa. Dra. Sueley Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 30.05.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0181/07, intitulado: **AVAIACÃO DA MICROBIOTA DE PACIENTES COM ANOREXIA NERVOSA E BULIMIA NERVOSA**, apresentado pelo Departamento de Psiquiatria, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dra. Eliane de Fátima Gomes Barbosa Prado

Pesquisador Executante: Graziella Nuemberg Back Brito

CAPPesq, 30 de maio de 2007

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

recebido: 07/06/07, às 12h22
Departamento de Psiquiatria de FMUSP

ANEXO C – Colaboração

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA - UNIVAP
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO - IP & D
Laboratório de Genética Molecular e Genomas
Av. Shishima Hifumi, 2911 - Urbanova
12244-000 São José dos Campos - SP - BRASIL
Tele/fax (012) 3947-1119
E-mail: fgdnobre@univap.br

São José dos Campos, 14 de novembro de 2006

Exma. Sra.
Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito
Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
S J Campos - SP

Prezada Dra. Cristiane:

Venho registrar meu interesse em participar como colaborador do projeto "Avaliação da microbiota bucal em pacientes com anorexia nervosa e bulimia nervosa". Nossa participação, como foi discutido, será na parte molecular do projeto que envolve amplificação do gene 16S para rRNA, clonagem, sequenciamento e análise. O projeto me parece original ao abordar um problema da microbiota oral ainda inexplorado.

Cordialmente



Dr. Francisco G. da Nobrega

Back-Brito, GN. Evaluation of oral microbiota of patients with Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

Eating disorders such as nervous Anorexia and Bulimia Nervosa have several clinical and oral alterations related to the nutritional state involvement and the inadequate compensatory practices for weight control. The aim of this study was to evaluate the microbial diversity in the oral cavity of patients with Anorexia Nervosa and Bulimia nervosa by cultivation techniques and cultivation-independent molecular methods. The study included 32 patients and 27 bulimic anorexics, matched with 59 control subjects. Oral rinse samples were cultured to assess the prevalence of Candida species, staphylococci, enterococci, streptococci mutans (EGM), lactobacilli, Enterobacteriaceae / Pseudomonas. Candida species, staphylococci, enterococci, Enterobacteriaceae / Pseudomonas were identified by API systems. Supragingival biofilm samples were collected and used only in molecular procedures. Counts of microorganisms in the groups were compared by ANOVA / Mann-Whitney (5%). There was a statistically significant ($p < 0.05$) for the counting of yeasts, staphylococci, enterococci, and lactobacilli EGM between TA and control groups, but there were no significant differences in the prevalence of Enterobacteriaceae / Pseudomonas ($p = 0.312$). Few differences between the groups were observed in the species diversity of organisms studied by the method of cultivation. Molecular analysis was performed by ribotyping by sequencing the 16S rRNA bacterial and D1/D2 regions of 28S rRNA. About 3000 clones of the TA group and 1500 clones of control were evaluated. Sixty-two species or filotypes of bacteria were detected, with 22 identifications were found only in the study group, only 6 in the control group and 34 in both groups. Microorganisms related to caries and periodontal diseases were found in both groups. For fungi, 13 species/filotypes were found, eight were detected only in the study group and one only in the control group. The methodology cultivation-dependent indicated quantitative difference of the genera studied, except for Enterobacteriaceae / Pseudomonas. The differences in bacterial composition of the microbiota of oral ED patients and controls were better represented by the cultivate-independent method.

Keywords: Anorexia Nervosa. Bulimia Nervosa. Oral cavity. Bacterial. Yeast. PCR. Molecular cloning.