

**CRISTIANE YUMI KOGA ITO**

***Candida dubliniensis:***

**PREVALÊNCIA NA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES  
DIABÉTICOS, COM CÂNCER DE MAMA E HANSENIANOS E  
PATOGENICIDADE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, Faculdade de Odontologia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de LIVRE DOCENTE em Microbiologia e Imunologia

**CRISTIANE YUMI KOGA ITO**

***Candida dubliniensis:***

PREVALÊNCIA NA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES  
DIABÉTICOS, COM CÂNCER DE MAMA E HANSENIANOS E  
PATOGENICIDADE EXPERIMENTAL

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, Faculdade de Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de LIVRE DOCENTE em Microbiologia e Imunologia

**São José dos Campos**

**2008**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Koga-Ito, Cristiane Yumi

*Candida dubliniensis*: prevalência em pacientes diabéticos, com câncer de mama e hansenianos e patogenicidade experimental /Cristiane Yumi Koga-Ito; São José dos Campos, 2008. 148p.;IL

Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

1. Microbiologia – 2. *Candida dubliniensis* – 3. Boca.

### 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, 13/02/2008.

Assinatura:

E- mail: cristiane@fosjc.unesp.br

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais, BENTO (in memorium) E TSUYAKO, pela minha vida, por serem sempre meu porto seguro, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida, por me ensinar que viver no caminho da ética e retidão sempre vale a pena, meu mais profundo sentimento de gratidão e admiração.*

*“Há homens que lutam um dia e são bons,  
Há outros que lutam um ano e são melhores,  
Há aqueles que lutam por muitos anos e são muito bons,  
Há porém, os que lutam toda a vida:  
Esses são Imprescindíveis...” (Bertold Brecht)*

*Ao ANTONIO CARLOS, HENRIQUE e GUSTAVO, razão da minha vida, minha motivação para tentar ser cada dia melhor como ser humano, por tornar minha vida tão cheia de luz e alegria, pelo incentivo de todos os dias e por fazer tudo valer a pena.*

*À minha família, YURIKA, SAYURI, FERNANDO, KOOJI, HIKARI, JÚLIA, ANTONIO E LYNA (in memorium) pelo apoio sempre, pela alegria de saber que tenho sempre com quem contar em todas as horas.*

*Também dedico este trabalho...*

*Aos meus queridos alunos de Pós-graduação Francine Cristina Silva Rosa, Graziella Nuernberg Back Brito, Edna Aparecida Ferraz de Araújo Navas, Edson Yukio Komiyama e Bruno Mello de Matos...*

*... e alunos de aperfeiçoamento, Ana Paula, Ana Olímpia e Daniel...*

*Aos que chamamos carinhosamente de “nossas crianças”, os alunos de Iniciação científica que conosco já trabalharam e os que ainda estão em nossa companhia...*

*Aos alunos de graduação...*

*...pela motivação essencial que vocês representam a cada dia na minha vida profissional e pessoal,  
que me permite refletir, aprender, crescer, “renascer”...*

*“Aprendi muito com meus mestres, mais com meus companheiros, mais ainda com meus  
alunos”  
(Talmude)*

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

### *Aos Mestres...*

*Profa. Adj. Neide Querido Almeida, professora aposentada da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela oportunidade de iniciar as atividades científicas.*

*Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos pelos ensinamentos, pela orientação no Mestrado e Doutorado, pelas oportunidades, por me mostrar os caminhos e facetas da vida acadêmica em todos estes anos de intenso aprendizado.*

*Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, pelos ensinamentos durante a Iniciação Científica.*

*Prof. Tit. Valerio Vidotto, da área de Micologia do Ospedale Amedeo di Savoia, Universidade de Turim, pelo carinho e ensinamentos recebidos durante o pós-doutorado e os e-mails diários de incentivo durante todos estes anos.*

*Profa. Tit. Maria Aparecida de Resende, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade recebida no desenvolvimento do pós-doutoramento.*

*“Tu te tornas responsável por tudo aquilo que cativas...”  
(Saint-Exupéry)*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na pessoa do Magnífico Senhor Reitor Marcos Macari.*

*À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, na pessoa do Diretor Prof. José Roberto Rodrigues e do Vice-diretor Carlos Augusto Pavanelli.*

*À Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, chefe do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal.*

*À Profa. Adj. Carmelinda Schmidt Unterkircher, professora aposentada da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos pelas importantes contribuições recebidas durante todos os anos de convívio.*

*Ao Prof. Tit. Oslei Paes de Almeida, professor da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, meu agradecimento por todo o apoio e incentivo recebidos durante os cursos de Mestrado e Doutorado.*

*Às Profa. Adj. Yasmin Rodarte de Carvalho e Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha, professoras do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela acolhida carinhosa e amizade desde os primeiros momentos neste Departamento.*

*Ao ex-diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, Prof. Adj. Paulo Villêla Santos Júnior pelo apoio e incentivo recebidos durante a sua gestão.*

*Às colegas da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Profas. Dras. Juliana Campos Junqueira e Luciane Dias de Oliveira, e alunos de pós-graduação Marta, Flávio, Thais, Rogério, Cristiane, Joyce, Polyana e Rosilene pela oportunidade e ensinamentos do convívio diário.*

*Às Profas. Dras. Janete Dias Almeida e Maria Nadir Gasparotto Mancini, professoras do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal pelo carinho e incentivo nestes anos de convívio.*

*À secretária da Disciplina de Microbiologia e Imunologia Sílvia Scarpel, pela sua importante participação na organização do memorial e nas tarefas relacionadas à coordenação do curso de pós-graduação.*

*Aos técnicos do laboratório de Microbiologia e Imunologia, Sérgio e Domingos, por trazer a cada dia alegria ao nosso laboratório e seu empenho no desenvolvimento das tarefas.*

*À secretária do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal Ivoneide, pelo carinho e ajuda em todos os momentos da nossa rotina diária e disponibilidade exemplar.*

*Aos demais colegas professores do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.*

*Ao Prof. Dr. Ivan Balducci, professor da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Odontologia Social e Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, pela amizade e otimismo de sempre, por toda a sua disponibilidade no auxílio da análise estatística e representação gráfica dos dados não só deste trabalho, mas de outros que realizamos juntos neste período.*

*Ao Prof. Tit. Francisco Gorgônio da Nóbrega, professor e pesquisador do laboratório de Biologia Molecular e Genoma da Universidade do Vale do Paraíba, pela disponibilidade em colaborar neste estudo, pelos ensinamentos, oportunidade e privilégio de trabalhar em colaboração nos projetos de biologia molecular.*

*Aos Prof. Tit. José Pontón, Guillermo Quindós da Universidade Del País Vasco e Prof. Tit. Valerio Vidotto da Universidade de Turim pela doação das cepas clínicas de *C. dubliniensis* incluídas neste estudo.*

*Às Profas. Dras. Márcia de Souza Carvalho Melhem, Sandra Regina Brasil Stoff Pukinskás (Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz –SP), Laura Ródero e Susana Córdoba (Instituto Málbran, Buenos Aires, Argentina), pela disponibilidade e ensinamentos recebidos na área de Micologia e antifúngicos.*

*Ao Prof. Tit. Derek J. Sullivan (Dublin Dental School and Hospital), que pelo intermédio do Prof. Tit. Francisco Gorgônio da Nóbrega nos enviou a cepa padrão *Candida dubliniensis* CD33 utilizada neste estudo.*

*À Mestre Ana Lourdes da Silva Machado, aluna de Iniciação Científica Thássia Castro de Vasconcellos e ao Mestrando Edson Yukio Komiyama, pela participação essencial na etapa de patogenicidade experimental desenvolvida neste estudo.*

*Ao Mestre Adolfo Mota e Doutoranda Graziella Nuernberg Back Brito pela importante participação na etapa de identificação molecular dos isolados de *C. dubliniensis*.*

*Às Alunas de Pós-graduação Edna Aparecida Ferraz de Araújo Navas e Francine Cristina Silva Rosa, Profa. Dra. Sílvia Maria Rodrigues Querido e aos Alunos de Iniciação Científica, Rosinei Maria Bremekamp, Fernanda Carmes Vallejo, Polyana Tiemi Takahashi e Aline Cássia Inocêncio pela participação nos trabalhos prévios de isolamento de pacientes diabéticos, sob tratamento quimioterápico e hansenianos.*

*Aos Srs. Lourival e Antonio, funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, por todo o essencial apoio no cuidado dos animais experimentais.*

*Aos professores Prof. Dr. Marcos Augusto do Rego (Odontopediatria/UNIVAP), Profa. Dra. Célia Regina Gonçalves e Silva (Microbiologia/UNITAU), Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos (Microbiologia/UNITAU), Profa. Dra. Mariella Pereira Leão (Microbiologia/UNITAU), Profa. Dra. Sônia Khouri (Microbiologia/UNIVAP), Prof. Ivan da Silva de Faria (Microbiologia/UNITAU), Profa. Dra. Elizabeth Brasil dos Santos (Microbiologia/UEPG), Profa. Dra. Patrícia Machado Pinto (Helmintologia/FIOCRUZ) e Mestre Lourimar Viana do Nascimento (Microbiologia/UNIVALE) pela amizade e colaboração contínua ao longo dos anos.*

*Ao Sr. Carlos Guedes, responsável pelo Escritório de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos que nos auxiliou de maneira essencial no acompanhamento de solicitações e relatórios da FAPESP, pela amizade e disponibilidade de sempre.*

*À Sra. Iara Carolina Kogiso e ao Sr. Oscar Kogiso, pela amizade, ajuda e apoio em todo o período de atividades nesta Faculdade.*

*Às Sras. Rosemary, Erena, Maria Aparecida, e Lílian, da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP pelo apoio, incentivo e disponibilidade de sempre.*

*Aos funcionários do Setor de Esterilização da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, Francilene, Divair, Rita e Rosângela, pelo convívio e amizade e possibilidade de aprender cada vez mais com novos desafios.*

*Aos funcionários da Biblioteca e do Setor Administrativo da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos pelo essencial apoio e disponibilidade em todos os momentos.*

*Às Sras. Helena Watanabe e Elizete Wenzel Moreira, funcionárias do Setor de Triagem da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, pela disponibilidade em ajudar a qualquer momento.*

*À Sra. Maria de Fátima Pires, por sua colaboração essencial na realização das tarefas diárias ao longo dos anos.*

*À amiga Profa. Dra. Patrícia Monteiro Ribeiro pela amizade, disponibilidade e palavras de incentivo.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio (Processo número 06/52916-5) recebido no desenvolvimento do projeto que incluiu os pacientes hansenianos e bolsa de Iniciação Científica relacionada a este projeto Processo número 06/50504-1-Aluna Aline Cássia Inocêncio).*

*À FUNDUNESP pelo auxílio (Processo número 00262/05-DFD) recebido no desenvolvimento do projeto que incluiu os pacientes sob quimioterapia e à FAPESP pela bolsa de Iniciação Científica relacionada a este projeto (Processo número 03/12910-0 – aluna Fernanda Carmes Vallejo).*

*À FAPESP pela bolsa de Iniciação Científica relacionada ao projeto que incluiu os pacientes diabéticos (processo número 04/01602-5 – aluna Rosinei Maria Bremenkamp).*

*Aos responsáveis e funcionários dos seguintes locais onde foram realizadas as coletas clínicas pela disponibilidade e atenção: Unidade Básica de Saúde (UBS) Vila Tatetuba, UBS da Vila Maria, Unidade de Especialidades de Saúde (UES), Clínica de Apoio a Pacientes Diabéticos, Hospital Policlín, ANAD (Associação Nacional de Assistência ao Diabético), Escola Estadual de 1º e 2º grau “João Cursino”, SESC - São José dos Campos, Programa UNATI - UNESP (Universidade da terceira idade), clínicas do Departamento de Prótese e Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos e Centro Cativa para terceira idade, Clínica Oncologia do Vale.*

*Aos voluntários diabéticos, com câncer de mama sob tratamento quimioterápico e hansenianos, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.*

*A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.*

KOGA-ITO, C.Y. ***Candida dubliniensis*: Prevalência na cavidade bucal de pacientes diabéticos, com câncer de mama e hansenianos e patogenicidade experimental.** [Tese de Livre-docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de *C. dubliniensis* dentre isolados bucais de pacientes com diabetes *mellitus* do tipo I (n=39) e II (n=36), hansenianos (n=38) e sob quimioterapia para o câncer de mama (n=30) e de respectivos indivíduos controle pareados quanto à idade, gênero e condições bucais. Um total de 479 isolados previamente identificados por testes fenotípicos (formação de tubo germinativo, produção de hifas/pseudohifas/clamidoconídeos, fermentação e assimilação de carboidratos) e identificadas como *C. albicans*/*C. dubliniensis* foram incluídos no estudo. A existência de *C. dubliniensis* dentre os isolados foi analisada usando protocolo validado de PCR *multiplex*. Foi também realizado estudo de patogenicidade experimental utilizando camundongos em modelo de infecção sistêmica, objetivando comparar a virulência e cinética de infecção de *C. dubliniensis* com outras espécies do gênero *Candida*. Um isolado (0.002%) de *C. dubliniensis* foi detectado entre os isolados do grupo controle. Esta espécie não foi encontrada dentre os isolados dos outros grupos de pacientes. *C. dubliniensis* foi menos virulenta para camundongos em relação a *C. albicans* e *C. tropicalis* e mais virulenta do que *C. krusei*. O estudo da cinética de infecção mostrou infecção persistente no rim e no fígado mesmo após 21 dias da inoculação de *C. dubliniensis*. Conclui-se que a detecção de *C. dubliniensis* dentre os isolados clínicos foi baixa e observada apenas no grupo controle. *C. dubliniensis* foi menos virulenta para camundongos que *C. albicans* e *C. tropicalis* e causou infecção prolongada no rim e no fígado.

Palavras-chave: *Candida dubliniensis*, quimioterapia, diabetes, câncer, patogenicidade.

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas tem aumentado dramaticamente nas últimas duas décadas e estas têm sido consideradas doenças de importância crescente<sup>54,63,183</sup>. O aumento alarmante da frequência destas infecções é relacionado principalmente ao uso de fármacos antimicrobianos de largo espectro, corticosteróides, agentes anti-tumorais, e aumento no número de pacientes imunocomprometidos<sup>63</sup>. Em pacientes com AIDS, receptores de transplantes medulares ou sob quimioterapia anti-neoplásica agressiva, espécies do gênero *Candida* são causas importantes de mortalidade e morbidade<sup>34</sup>.

Recentemente, observou-se um aumento da importância de espécies de *Candida* não-*albicans* como patógenos oportunistas, em particular *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*<sup>54,63,56,184</sup>. A causa para esta mudança epidemiológica ainda não está esclarecida, no entanto, acredita-se que a profilaxia antifúngica com azóis em pacientes com neutropenia induzida por quimioterapia, terapia prévia a transplantes de medula óssea e para a prevenção de candidose orofaríngea em pacientes HIV-positivos pode ter contribuído de maneira importante<sup>54,199</sup>.

Dentro deste contexto, *Candida dubliniensis* chama atenção. Esta foi inicialmente descrita por Sullivan et al.<sup>202</sup> na Irlanda, possui muitas características fenotípicas semelhantes a *C. albicans* e é mais frequentemente isolada de pacientes HIV-positivos. Relatos subseqüentes revelaram a identificação de *C. dubliniensis* em diversas partes do mundo<sup>94,132,201</sup>. Poucos estudos brasileiros relataram o isolamento desta nova espécie. Milán et al.<sup>139</sup> descreveram o primeiro isolamento de *C. dubliniensis*. Alves et al.<sup>11</sup> referiram o isolamento de 3 casos de candidose

causadas por esta espécie no sul do Brasil. Milán et al.<sup>140</sup> avaliaram 108 pacientes brasileiros com AIDS e candidose orofaríngea, dentre os quais apenas 3 apresentaram *C. dubliniensis*.

Considerando que *C. dubliniensis* mostrou níveis diminuídos de suscetibilidade aos agentes antifúngicos azólicos<sup>152,163</sup> e capacidade de desenvolver resistência ao fluconazol em curto período de tempo *in vitro*<sup>111,197</sup>, o estudo desta espécie ganha relevância.

Vários relatos da literatura indicam que *C. dubliniensis* é mais freqüentemente isolada de pacientes HIV-positivos, no entanto, relatos sobre sua prevalência em indivíduos com outras doenças sistêmicas são mais raros. Relatou-se que a ocorrência desta espécie em pacientes diabéticos insulino-dependentes em população mista tipo I e tipo II foi de 14,1% indivíduos positivos para *C. dubliniensis*<sup>226</sup>. Porcentagem inferior foi observada por Manfredi et al.<sup>121</sup> (3,6%), analisando pacientes insulino-dependentes do tipo I e do tipo II em grupos independentes. Belazi et al.<sup>29</sup> analisou pacientes com diabetes do tipo II e respectivos controles na Grécia e não detectaram *C. dubliniensis*.

A ocorrência de *C. dubliniensis* em pacientes sob quimioterapia para câncer em estágio avançado e de localizações diversas foi de 5% em dois estudos diferentes<sup>23,59</sup>. Estudos sobre a microbiota bucal de pacientes com hanseníase são escassos na literatura. Reichart et al.<sup>174</sup> relataram a presença aumentada de *C. krusei* na cavidade bucal de pacientes hansenianos, porém não detectaram *C. dubliniensis*.

*C. dubliniensis* é raramente identificada como causa de infecção sistêmica<sup>201</sup>, sugerindo que esta possa ser menos virulenta que *C. albicans*. Estudos *in vivo* com animais de experimentação relataram que animais inoculados com *C. dubliniensis* apresentaram taxa de sobrevivência mais elevada quando comparados àqueles inoculados com *C. albicans*<sup>82,201</sup>.

A mucosa bucal é a porta de entrada primária para a maioria dos patógenos oportunistas, incluindo espécies de *Candida*<sup>189</sup>. Assim, a prevenção de infecções superficiais bucais é considerada importante devido ao seu possível papel no desenvolvimento de infecções sistêmicas que podem estar associadas com mortalidade aumentada. Estudos são necessários para aumentar o conhecimento sobre os fatores de risco para candidose em populações específicas de pacientes que auxiliem no desenvolvimento de guias para profilaxia e tratamento das infecções fúngicas<sup>189,231</sup>.

Com a crescente incidência clínica das infecções causadas pelas leveduras do gênero *Candida*, particularmente por espécies não-*albicans*, a compreensão de sua epidemiologia e patogenicidade é de grande valia e importância. Tendo em vista a identificação mais recente de *C. dubliniensis* e sua relatada resistência aumentada a alguns antifúngicos, acredita-se ser imprescindível o estudo aprofundado desta espécie.

Assim, o presente estudo foi delineado no sentido de avaliar a prevalência de *C. dubliniensis* em populações de pacientes HIV-negativos portadores de doenças sistêmicas, avaliar a suscetibilidade aos antifúngicos e produção de exoenzimas dos isolados de *C. dubliniensis* obtidos e a patogenicidade *in vivo* desta espécie.

### 3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

- a) comparar a presença de *C. dubliniensis* na cavidade bucal de pacientes diabéticos do tipo I e II, pacientes sob quimioterapia para o câncer de mama e poliquimioterapia para a hanseníase com respectivos grupos controle pareados;
- b) avaliar a produção de exoenzimas e suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de *C. dubliniensis* obtidos;
- c) estudar a patogenicidade *in vivo* utilizando modelo murino de infecção sistêmica de *C. dubliniensis* em relação a espécies *Candida* não-*albicans*, utilizando análise de sobrevivência;
- d) estudar a cinética de infecção de *C. dubliniensis* em relação a espécies não-*albicans* em modelo murino de infecção sistêmica.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP sob os protocolos nº 056/2001-PH/CEP (Patogenicidade experimental), 081/2003 (pacientes sob quimioterapia) e 094/2003 (pacientes diabéticos) e 021/2005 (pacientes hansenianos) (Anexos A, B, C, D e E).

### **4.2 Grupos de estudo**

A etapa de isolamento das amostras de leveduras do gênero *Candida* foi realizada previamente a partir de pacientes diabéticos do tipo I e II, sob quimioterapia para tratamento do câncer de mama e sob poliquimioterapia (PQT) para tratamento da hanseníase, e os respectivos grupos controle pareados quanto ao gênero, idade e condições bucais (relacionados aos fatores predisponentes locais para a candidose bucal: utilização de próteses e aparelhos ortodônticos).

Para todos os grupos, a coleta de amostra clínica e identificação fenotípica dos isolados seguiu a metodologia descrita a seguir. A coleta de material da cavidade bucal foi realizada por meio de 10 ml de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%) tamponada com fosfato (PBS

0,1 M e pH 7,2) contida em um recipiente universal estéril descartável. Os indivíduos realizaram bochecho com a solução durante um minuto, devolvendo-a a seguir para o mesmo recipiente, os quais 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 coleta e processamento das amostras.

As amostras de enxágüe bucal foram centrifugadas por 10 minutos, a 8.000 g e o sobrenadante foi descartado. O depósito foi ressuspenso em 2,5 ml de PBS e misturado em agitador de tubos (Vortex) por 30 segundos, produzindo assim uma suspensão homogênea. A partir desta, foram obtidas diluições de  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  em solução fisiológica (NaCl 0,85%). A partir de cada amostra (suspensão de concentração final e diluições) foi semeado 0,1 ml em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (vixmicina, União Química Farmacêutica Nacional) na concentração de 0,1 mg/ml de meio de cultura. A alíquota excedente de enxágüe bucal foi esterilizada e descartada.

As placas foram incubadas a 37°C pelo período de 48 horas. Quando não houve crescimento, estas foram incubadas por mais 5 dias a temperatura ambiente. Após o crescimento, as colônias foram examinadas quanto às características morfológicas (tamanho, forma e superfície) e contadas para o cálculo de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/ml). A partir das colônias características foram obtidos esfregaços corados pelo método de Gram. Quando da observação na microscopia de células ovaladas, grandes, Gram-positivas, com ou sem brotamento, sugestivas de *Candida* spp., quatro colônias foram repicadas para tubos contendo ágar Sabouraud dextrose que foram incubadas a 37°C por 48 horas e a seguir mantidas a 4°C para posterior identificação.

Para a caracterização das amostras foram realizadas provas de formação de tubo germinativo em soro bovino, microcultivo em agar fubá/Tween 80, fermentação e assimilação de carboidratos, de acordo com Sandvén<sup>182</sup> e Williams & Lewis<sup>224</sup>. Os isolados de *C. albicans*/*C. dubliniensis* foram selecionados para a identificação molecular.

A seguir, está descrita a caracterização dos grupos de estudo incluídos no presente estudo. Os isolados foram previamente obtidos a partir da cavidade bucal de 162 indivíduos distribuídos nos seguintes grupos:

#### 4.2.1 Pacientes diabéticos

- a) Diabetes tipo I: foram incluídos neste grupo 39 pacientes de ambos os gêneros e faixa etária entre 09 a 27 anos. Para o grupo controle foram incluídos 39 indivíduos não diabéticos pareados quanto ao gênero, idade e condições bucais a cada paciente do grupo diabetes do tipo I;
- b) Diabetes tipo II: foram incluídos neste grupo 37 pacientes de ambos os gêneros e faixa etária de 37 a 78 anos. Para o grupo controle foram incluídos 37 indivíduos não diabéticos pareados quanto ao gênero, idade e condições bucais a cada paciente do grupo diabetes do tipo II.

Os pacientes diabéticos foram selecionados dentre os pacientes em tratamento nos seguintes centros: Unidade Básica de Saúde (UBS) Vila Tatetuba, UBS da Vila Maria, Unidade de Especialidades de Saúde (UES), Clínica de Apoio a Pacientes Diabéticos, Hospital Policlin, localizados na cidade de São José dos Campos-SP. Além disso, foram selecionados pacientes durante a 7ª Campanha Nacional gratuita em Diabetes - ANAD

(Associação Nacional de Assistência ao Diabético), realizada em São Paulo-SP em setembro de 2005.

Os indivíduos do grupo controle foram selecionados nos seguintes locais: Escola Estadual de 1º e 2º grau “João Cursino”, SESC - São José dos Campos, Programa UNATI - UNESP (Universidade da terceira idade) e clínicas do Departamento de Prótese e Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

Os critérios de exclusão adotados estão detalhados no item 4.2.4.

#### 4.2.2 Pacientes sob quimioterapia para o tratamento de câncer de mama

Foram incluídos no estudo 30 pacientes do sexo feminino do Instituto de Oncologia do Vale (São José dos Campos, SP) com idades entre 23 e 54 anos sob tratamento quimioterápico para tratamento do câncer de mama composto por ciclofosfamina, metotrexato e 5-fluorouracil (CMF) por no mínimo 60 dias. O grupo controle foi composto por 30 indivíduos não portadores de câncer de mama e que não estavam sob tratamento quimioterápico pareados aos pacientes do grupo teste quanto à idade, gênero e condições bucais, pacientes das clínicas da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Os critérios de exclusão adotados estão detalhados no item 4.2.4.

#### 4.2.3 Pacientes sob antibioticoterapia para o tratamento da hanseníase

Foram incluídos no presente estudo 38 indivíduos, com idade 10 a 89 anos, diagnosticados clinicamente como portadores de hanseníase multibacilar, confirmados pelo exame baciloscópico que estivessem sob poliquimioterapia (PQT) por no mínimo 45 dias, nos serviços ambulatoriais da U.E.S. (Unidade de Especialidades de Saúde) de São José dos Campos, Unidade de Referências e Especialidades (U.R.E.) de Jacareí, Policlínica Municipal de Taubaté e Centro de Saúde II - Dr. Odilon Miranda Souza de Caçapava, todos pertencentes ao Sistema Único de Saúde (SUS). Para o grupo controle, foram selecionados 38 indivíduos sistemicamente saudáveis com perfil semelhante (quanto à idade, sexo e condições bucais), dentre os idosos assistidos no Lar Frederico Ozanan, do Lar São Vicente de Paula, Jacareí e os pacientes das clínicas da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Os critérios de exclusão adotados estão detalhados no item 4.2.4.

#### 4.2.4 Critérios de exclusão

Foram adotados como critérios de exclusão comuns a todos os grupos de estudo: indivíduos fumantes, gestantes, portadores de outras doenças sistêmicas associadas e aqueles que estavam sob tratamento com fármacos que alteram o fluxo ou composição salivar (anti-colinérgicos, anti-histamínicos, anti-parkinsonianos, alcalóides de beladona e antidepressivos tricíclicos; e opióides; segundo Feio & Sapeta<sup>68</sup>). ou que haviam feito

tratamento com antibiótico (exceto para grupo hanseníase, PQT) ou antifúngico nos últimos 45 dias anteriores a coleta.

Para o grupo diabético, foi considerado critério de exclusão índices de HbA<sub>1c</sub> >9% (baixo grau de controle glicêmico; segundo Chávez et al.<sup>51</sup>) na última avaliação médica, sendo que estes dados foram obtidos a partir do prontuário do paciente.

Para o grupo de pacientes com câncer de mama, foram excluídas também pacientes sob quimioterapia por menos de 60 dias.

Para o grupo hanseníase, foram excluídos também pacientes diagnosticados clinicamente como portadores de hanseníase paucibacilar e portadores de hanseníase multibacilar com uso de poliquimioterapia por período inferior a 45 dias.

### **4.3 Isolados**

Foram incluídos neste estudo um total de 479 isolados de *Candida albicans*/*C. dubliniensis* distribuídos nos grupos de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Número de isolados de *Candida albicans*/*C. dubliniensis* incluídos no estudo de acordo com a distribuição nos grupos

Grupos	Número de isolados
Diabetes <i>mellitus</i> tipo I	96
Controle diabetes <i>mellitus</i> tipo I	41
Diabetes <i>mellitus</i> tipo II	61
Controle diabetes <i>mellitus</i> tipo II	71
Câncer de mama	81
Controle câncer de mama	68
Hanseníase	44
Controle hanseníase	17
Total de isolados	479

#### 4.4 Identificação genotípica de *C. dubliniensis*

Para a identificação genotípica, as amostras fenotipicamente identificadas como *C. albicans*/*C. dubliniensis* foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR), de acordo com a metodologia proposta por Donnelly et al.<sup>61</sup> e Mähneß et al.<sup>120</sup>.

Os isolados foram inicialmente semeados em ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24h a 37°C. A seguir, uma pequena porção de cada crescimento foi coletada, com o auxílio de ponteira esterilizada (universal amarela com capacidade de 20-200 µl, marca Axygen), e transferida a um tubo plástico (*Eppendorf*) contendo 75 µl de solução de zimoliase (Sigma) 0,5 mg/ml em solução de sorbitol 1M. Os tubos foram

centrifugados a 8.000 g./4°C (Eppendorf 5804R, Eppendorf) por 1 minuto. 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 novamente centrifugadas a 8.000 g./4°C por 15 minutos, e armazenadas em congelador a 0°C.

Para a PCR foram utilizados dois pares de iniciadores, sendo o primeiro par os universais Uni-f: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAA-3' e o Uni-r: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'; e o segundo par de *primers* específicos para *C. dubliniensis*, DUBF Act-f: 5'GTATTTGTCGTTCCCCTTTC-3' e DUBR Act-r: 5'-GTGTTGTGTGCACTAACGTC-3'. A amplificação foi realizada em termociclador automático (PTC-100, MJ Research Inc.) em 10 µl de volume final, incluindo 1 µl da amostra de DNA extraído, 0,2 µl de cada iniciador (*primer*), 5,0 µl Master Mix (Promega) e 3,2 µl de água MiliQ esterilizada. Foram utilizados *PCR strip tubes* (Axygen). As condições de amplificação foram: 95°C por 3 minutos, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Uma alíquota de 3 µl da amostra amplificada foi ressuspendida em igual volume de tampão de amostra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol e 15% Ficoll) e analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE (0,89 M Tris-Base, 0,89 M ácido bórico, 20 mM EDTA, pH 8,0) acrescido de 3 µl de brometo de etídeo (10 mg/ml), sendo a migração feita a 110 V, por período de aproximadamente 30 minutos (Subcell System, Bio Rad). Como padrão de peso molecular foi utilizado o Ladder 100 pb (Gibco, BRL). Em todas as reações foram incluídas as amostras de *C. albicans* (ATCC 18804) e *C. dubliniensis* (CD33) como controle da reação. O gel foi visualizado em transiluminador ultra-violeta (Foto/UV 26, Fotodyne Inc.) e fotografado para documentação (DC290 Zoom 2.1 Mpixel, lente 49 mm).

#### 4.5 Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos

As amostras foram testadas quanto à sensibilidade *in vitro* às drogas antifúngicas de acordo com o método de microdiluição proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards /Clinical Laboratory Standards Institute* (NCCLS/CLSI<sup>147</sup>). Para obtenção do inóculo as amostras de *Candida* spp. foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas durante 48 h a 37°C. Após este período, foram selecionadas cinco colônias com diâmetro superior a 5 mm e suspensas em solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) obtendo-se uma concentração inicial de  $1-5 \times 10^6$  células/ml, por comparação da turvação com escala padronizada. Posteriormente, a suspensão foi diluída em 1:2000 em meio sintético RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) para se obter uma concentração final de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  células/ml.

Os antifúngicos anfotericina B (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), fluconazol (Vivência farmácia de manipulação, Pindamonhangaba, SP), cetoconazol (Vivência farmácia de manipulação, Pindamonhangaba, SP) e 5-fluorocitosina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA), foram usados para os testes de susceptibilidade. As drogas anfotericina B e cetoconazol foram solubilizadas em dimetil sulfóxido (DMSO), enquanto fluconazol e 5-flucitosina foram solubilizadas em água destilada esterilizada. Os antifúngicos foram preparados nas seguintes concentrações: 320 µg/ml para anfotericina B, 1000 µg/ml para 5-flucitosina, 1250 µg/mL para fluconazol, 640 µg/ml para cetoconazol. As soluções foram diluídas em meio sintético RPMI de forma a se obter concentrações finais que corresponderam as seguintes faixas de intervalo, referidas na literatura como padrão de susceptibilidade de *Candida* spp.: 4 a 0,02 µg/ml para

anfotericina B, 64 a 0,02 µg/ml para cetoconazol e 5-flucitosina e 128 a 0,02 µg/ml para fluconazol (Sutton et al.<sup>203</sup>).

Para a realização da técnica de microdiluição foram utilizadas placas de acrílico com 96 orifícios de fundo chato e com tampa. Em cada orifício foram dispensados 100 µL da concentração do antifúngico e 100 µl do inóculo da amostra-teste. As placas foram incubadas a 37°C e as leituras foram realizadas após 24 e 48 h. As placas com anfotericina B foram cobertas com papel alumínio para proteção contra a luz. Foram incluídos controle de crescimento de todas as cepas e controle de esterilidade de cada diluição testada.

Após o período de incubação, os títulos foram determinados visualmente pela comparação com o crescimento do controle. Para a anfotericina B, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida onde se observou 100% de inibição de crescimento fúngico. Para o fluconazol, cetoconazol e 5-fluorocitosina, a CIM foi definida onde houve a mais baixa concentração que resultou em 80% de inibição do crescimento fúngico.

*Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi usado como controle de qualidade para todos os experimentos. Os pontos de corte considerados para os fármacos testados para a classificação dos isolados como susceptíveis ou resistentes estão apresentados na Tabela 2. Para anfotericina B (< 1 = S, ≥ 2 = R) e cetoconazol (< 8 = S, ≥ 16 = R) foram adotados os parâmetros propostos por Sutton et al.<sup>203</sup>.

Tabela 2 - Pontos de corte para interpretar os testes de suscetibilidade em leveduras. Dados em µg/ml. (Segundo NCCLS/CLSI<sup>147</sup>)

antifúngico	sensível	S-DD	Intermediária	Resistente
fluconazol	≥8	16-32	-	≥64
itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	-	≥1
5-fluorocitosina	≤4	-	8-16	≥32

## 4.6 Produção de exoenzimas

### 4.6.1 Produção de fosfolipase

A determinação da produção de fosfolipase foi realizada de acordo com Polak<sup>167</sup>, utilizando-se o meio de cultura composto por ágar malte (Difco) contendo 1 M de cloreto de sódio, 0,005 M de cloreto de cálcio e acrescido de emulsão de gema de ovo a 2%. A cepa testada foi inoculada por picada e as placas incubadas a 37°C por 5 dias. Os testes foram realizados em triplicata. Após este período foi realizada a mensuração dos diâmetros dos halos e colônias.

A atividade fosfolipásica foi expressa como valores de Pz, ou seja, a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro desta somada ao halo de precipitação, de acordo com Price & Cawson<sup>169</sup> e Price et al.<sup>170</sup>. O resultado final foi o valor de Pz médio obtido a partir de 3 provas realizadas.

#### 4.6.2. Produção de proteinase

A produção de proteinase foi realizada de acordo com Aoki et al.<sup>17</sup> e Rüchel et al.<sup>176</sup>, utilizando-se meio de cultura ágar malte (Difco) adicionado de soro albumina bovina (BSA Fraction V, Sigma). Além disso, foi preparado 120 ml de uma solução contendo 0,08 g sulfato de magnésio (Fluka), 1 g fosfato de potássio (Fluka), 0,4 g extrato de malte (Difco), 8 g glicose (Fluka), 2 g cloreto de sódio (pH 3,5). Cem mililitros desta solução foram adicionados a 280 ml de ágar malte e o meio de cultura foi autoclavado a 120°C por 15 minutos.

Um grama de soro albumina bovina (BSA, Sigma) dissolvido em 20 ml da solução descrita anteriormente e acrescido de 2,5 ml de Protovit<sup>®</sup> (Roche) foi esterilizado por filtração. Esta solução foi adicionada ao meio de cultura na temperatura de cerca de 50°C.

Cada amostra em crescimento de 24h foi inoculada por picada na superfície do meio de cultura e as placas incubadas a 37°C por 5 dias. Após este período de incubação foram realizadas as leituras. Cada amostra foi testada 3 vezes e a atividade proteinásica também foi expressa como valores de Pz como descrito anteriormente.

### 4.7 Patogenicidade experimental

A avaliação da patogenicidade experimental foi realizada segundo Almeida<sup>7</sup>.

#### 4.7.1 Comparação da virulência *in vivo* de *C. dubliniensis* com outras espécies do gênero *Candida*

Nesta etapa do estudo foram incluídas no estudo as amostras de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC 6258).

Foram utilizados 20 camundongos Swiss (10 machos e 10 fêmeas), com 35 dias de idade (25-30 g) para cada espécie de *Candida* a ser testada. Os animais foram criados no biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. O inóculo foi baseado em Kwon-Chung et al.<sup>117</sup>, preparado a partir de amostras semeadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) e incubadas a 37°C por 48h. A seguir, o crescimento foi ressuspensão em 10 ml de solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) seguindo-se centrifugação por 5 minutos a 8.000 g a 4°C. Foram realizadas mais três lavagens com solução fisiológica esterilizada nas mesmas condições. O sedimento foi então ressuspensão em solução fisiológica esterilizada e padronizado por espectrofotometria (Shinadzu modelo UV – 1203, Kyoto – Japão) de maneira a obter uma suspensão contendo  $1 \times 10^8$  células por mililitro (530 nm,  $\lambda=0,284$ ).

Os animais foram inicialmente anestesiados com solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompum, Bayer) associada a ketamina base (Dopalen, Agribrands do Brasil Ltda), na proporção de 1:0,5 ml/100 g de peso do animal. Após anestesia, os camundongos foram inoculados por via intravenosa com  $2,0 \times 10^6$  células por animal da suspensão padronizada. Os animais foram mantidos em condições

habituais de biotério com ração comercial e água e observados diariamente por até 35 dias quanto ao comportamento e morte.

#### 4.7.2 Comparação da virulência *in vivo* de isolados clínicos de *C. dubliniensis* e *Candida albicans*

Foram incluídos nesta etapa do estudo os seguintes isolados clínicos: *C. dubliniensis* 97519, 97464, 97040 e 97487; *C. albicans* PN 74, PN 69, PN 60 e PN 33. As amostras de *C. dubliniensis* foram doadas pelos Drs. José Pontón e Guillermo Quindós (Universidade Del País Vasco, Espanha), foram isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV positivos e previamente identificados geneticamente (Mosca et al.<sup>145</sup>). As amostras de *C. albicans* foram previamente isoladas da cavidade bucal de indivíduos controle, identificados geneticamente e pertencentes à Micoteca da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. Para cada isolado a ser testado, foram utilizados lotes de 10 camundongos Swiss, machos com 35 dias de idade (25-30g) para cada espécie de *Candida* a ser testada.

Os procedimentos de anestesia, inoculação, manutenção e observação foram os mesmos descritos no item 4.7.1.

#### 4.7.3 Comparação da cinética de infecção de *C. dubliniensis* com outras espécies de *Candida*

Esta etapa do estudo foi realizada segundo metodologia descrita por Shimizu<sup>188</sup> e Almeida<sup>7</sup>. Foram utilizadas as amostras de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. dubliniensis* (NCPF 3108), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. krusei* (ATCC 6258), sendo o inóculo e os procedimentos de anestesia os mesmos descritos anteriormente.

Cada amostra foi inoculada em grupos de 25 camundongos Swiss, com 35 dias de idade (25-30 g). Após um período de 6h, 3, 7, 14 e 21 dias da inoculação, grupos de 5 animais foram sacrificados. Sob condições assépticas, foram removidos de cada animal os seguintes órgãos: fígado, baço, rins, pulmões e cérebro. Após pesagem, cada órgão foi macerado manualmente em cálice e pistilo esterilizados e homogeneizados em 1,5 ml de solução fisiológica esterilizada. A partir desta suspensão, foram feitas diluições decimais até  $10^{-5}$  e 0,1 ml de cada diluição foram semeados, em duplicada, em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco), sendo as mesmas incubadas a 37°C por 48h. Após este período, foram realizadas contagens das colônias, sendo calculada a média do número de colônias das duas placas. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de órgão foi transformado em logaritmo de base 10 (log UFC).

#### 4.8 Análise dos resultados

A comparação da estimativa de sobrevivência dos animais foi realizada utilizando o método estatístico da análise de

sobrevivência de Kaplan-Meier (teste log-rank, 5%), onde se aplicou como hipótese nula “a distribuição dos tempos de sobrevivência são idênticas nos dois grupos”.

A comparação da estimativa de sobrevivência dos animais após inoculação com *C. albicans* (ATCC 18804, PN74, PN 69, PN60 e PN 33) ou *C. dubliniensis* (NCPF 3108, 97519, 97040, 97487, 97464), foi realizada utilizando o método estatístico de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier de duas formas: a primeira analisou os resultados com as amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* duas a duas, gerando valores de p e L e a segunda considerou todos os resultados obtidos com as amostras das espécies em teste em conjunto.

Nas comparações, convencionou-se sempre considerar como primeiro grupo amostras de *C. albicans* e segundo grupo amostras de *C. dubliniensis*. Quando o valor de L foi negativo, o segundo grupo apresentou maior tempo de sobrevivência em relação ao primeiro.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Prevalência de *C. dubliniensis* nos grupos de estudo

Dentre os 479 isolados analisados, foi confirmada genotipicamente a presença de uma amostra de *C. dubliniensis* proveniente da cavidade bucal de um indivíduo controle do grupo quimioterapia.

A Figura 1 mostra o gel representativo de isolados identificados genotipicamente como *C. albicans*, assim como a amostra clínica de *C. dubliniensis* detectada. Os fragmentos universais apresentaram aproximadamente 610 pares de base (pb), sendo, portanto visualizadas as bandas em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O par de *primers* específicos para *C. dubliniensis* resultaram em fragmentos de 288 pb, resultando em uma segunda banda visível exclusivamente para esta espécie.

Os demais géis onde foram observados somente padrões característicos de *C. albicans* para todas as demais amostras testadas estão apresentados em materiais complementares.

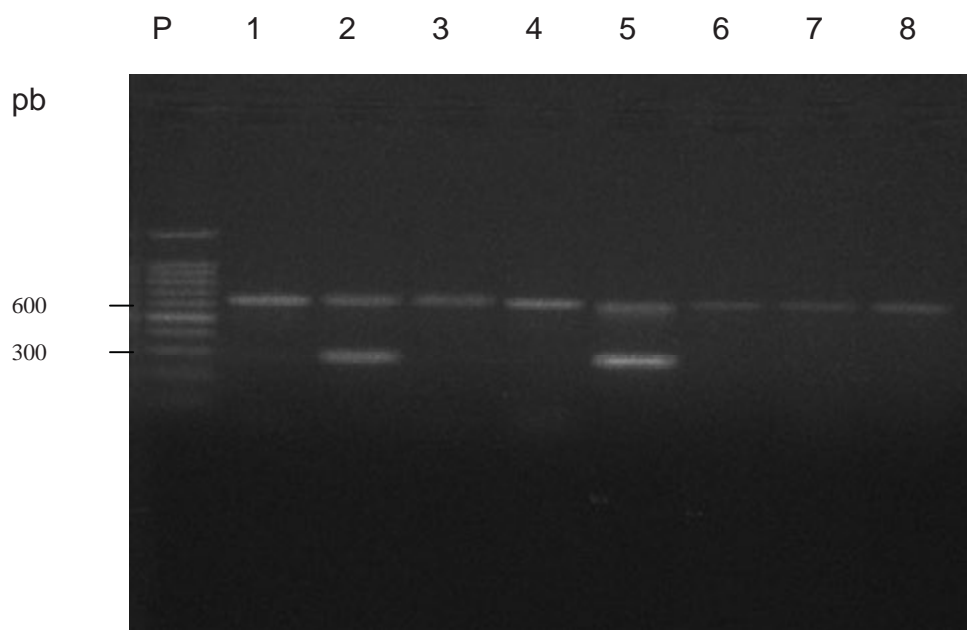


Figura 1 – Eletroforese de gel de agarose de produtos de DNA amplificados por PCR usando primers *C. dubliniensis* específicos DUBF/DUBR e os primers universais para fungos Uni-f/Uni-r. Os perfis apresentados correspondem a: *C. albicans* ATCC 18804 (canaleta 1); *C. dubliniensis* CD 33 (canaleta 2); isolado clínico diabetes *mellitus* 142 (canaleta 3); isolado clínico diabetes *mellitus* 220 (canaleta 4); isolado clínico controle quimioterapia GCQ 29C (canaleta 5); isolado clínico quimioterapia Q 11B (canaleta 6); isolado clínico controle quimioterapia GCQ 19B (canaleta 7) e isolado clínico quimioterapia 28d (canaleta 8); P- padrão de peso molecular (Ladder 100pb, Gibco).

## 5.2 Avaliação da sensibilidade aos antifúngicos em *C. dubliniensis*

As amostras de *C. dubliniensis* CD33 e NCFP 3108 foram utilizadas como cepas de referência. Observou-se que tanto estas quanto *C. dubliniensis* GCQ 29C foram sensíveis a todos os antifúngicos testados (Tabela 2).

A amostra controle de qualidade *Candida parapsilosis* ATCC 22019 apresentou resultados dentro dos limites recomendados pelo NCCSL/CLSI para fluconazol = 0,25 µg/ml; 5-fluorocitosina = 0,25 µg/ml; cetoconazol = 0,12 µg/ml e anfotericina B= 1,0 µg/ml.

Tabela 2 – Valores de concentração inibitória mínima (MIC), em µg/ml, obtidos para os isolados de *C. dubliniensis* testados

Antifúngicos	Isolados		
	GCQ 29	CD33	NCPF 3108
fluconazol	0,5	1,0	0,25
5-fluorocitosina	0,25	0,125	0,06
cetoconazol	0,125	2,0	0,5
anfotericina B	1,0	0,5	0,5

## 5.3 Produção de exoenzimas por *C. dubliniensis*

Foram incluídas como controle as amostras 16A (não produtora de fosfolipase e proteinase) e 25D (fortemente produtora de fosfolipase e proteinase), pertencentes à coleção de amostras do laboratório de

Microbiologia da FOSJC/UNESP. Foram testado o isolado *C. dubliniensis* GCQ 29C e as amostras de referência *C. dubliniensis* CD33 e NCPF 3108.

Foram observados os resultados apresentados na Tabela 3. A amostra *C. dubliniensis* GCQ 29C, assim como as amostras de referência CD 33 e NCPF 3108 não produziram fosfolipase e proteinase.

Tabela 3 – Valores médios de Pz observados nos testes de produção de fosfolipase e proteinase

Amostras	Enzimas (Pz )	
	Fosfolipase	proteinase
<i>C. dubliniensis</i> GCQ 29C	1,0	1,0
<i>C. dubliniensis</i> CD 33	1,0	1,0
<i>C. dubliniensis</i> NCPF 3108	1,0	1,0
<i>C. albicans</i> 16A*	1,0	1,0
<i>C. albicans</i> 25D**	0,18	0,38

\*Amostra controle não produtora de enzimas; \*\* amostra controle fortemente produtora de fosfolipase e proteinase

## 5.4 Patogenicidade experimental

### 5.4.1. Comparação da virulência *in vivo* de *C. dubliniensis* com outras espécies do gênero *Candida*

Nenhum dos camundongos machos inoculados com a amostra *C. dubliniensis* NCPF 3108 morreu após 35 dias de observação. Dentre os

animais fêmeas foi registrada apenas 1 morte após 24 horas da inoculação. Nenhum dos animais apresentou alterações de postura ou de comportamento.

Um total de 6 camundongos machos morreram após inoculação com amostra de *C. albicans* ATCC 18804. A maior parte das mortes ocorreu entre o 12º e o 15º dias após a inoculação (n=5), a outra ocorrência foi observada após 24 horas da inoculação. Após 21 dias da inoculação, um animal apresentou a cabeça inclinada para o lado esquerdo e outro apresentou-se excitado, movimentando-se rapidamente. Dentre as fêmeas, um total de 3 animais morreram durante o período de observação (12º dia, 16º dia e 20º dia após a inoculação). A partir do 14º dia, 3 animais apresentaram a cabeça inclinada para a esquerda e movimentação em círculos aumentada com relação aos demais, sendo que mantiveram estas observações até o final do período de observação.

Dentre os camundongos machos inoculados com *C. tropicalis*, um morreu após 24 dias após a inoculação. Após 12 dias da inoculação, 1 animal apresentou a cabeça inclinada para a direita e dois com inclinação para a esquerda. Dentre as fêmeas, 2 animais morreram após 24 dias da inoculação. Três animais apresentaram a cabeça inclinada para a direita após 12 dias da inoculação.

Nenhum dos camundongos machos e fêmeas morreram após inoculação com *C. krusei*. Nenhuma alteração postural ou comportamental foi registrada.

O número de animais mortos após inóculo das diferentes espécies testadas durante o período experimental está apresentado na Figura 2.

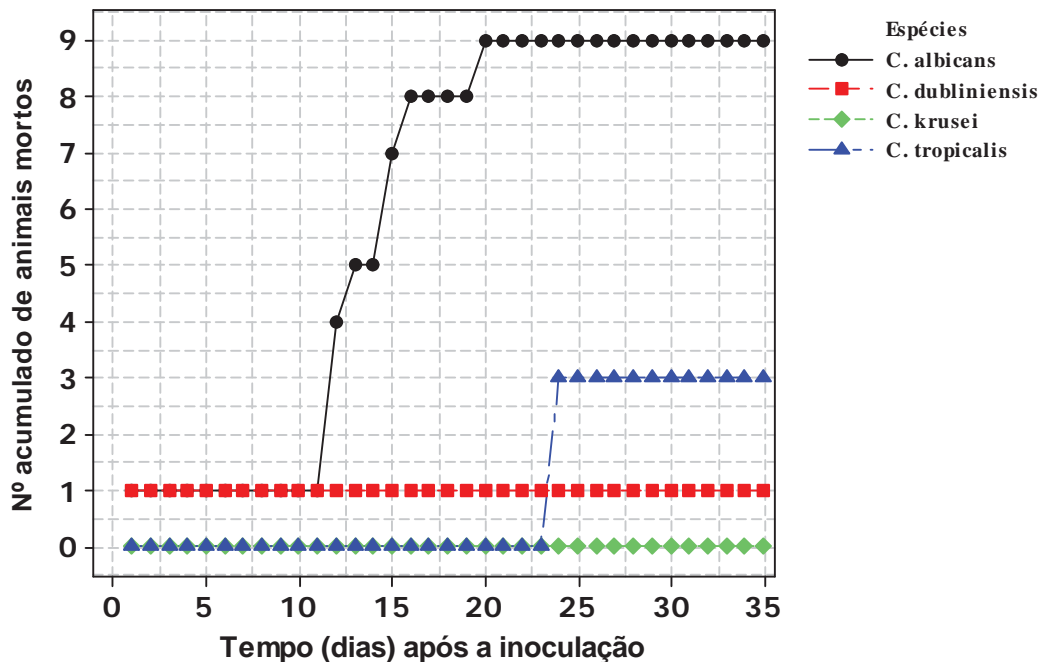


FIGURA 2 - Número acumulado de animais mortos, após inoculação de *Candida dubliniensis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, em função do tempo após a inoculação de 20 animais.

#### 5.4.2 Comparação da virulência *in vivo* de isolados clínicos de *C. dubliniensis* e *C. albicans*

Os resultados obtidos no estudo da patogenicidade experimental de isolados clínicos de *C. dubliniensis* e *C. albicans* estão apresentados na Figura 3 e 4.

Nenhum dos animais inoculados com as amostras de *C. dubliniensis* 97519 e 97487 morreu nos 35 dias de observação. Dois animais morreram 6 dias e 29 dias após a inoculação com *C. dubliniensis* 97464.

Dezoito dias após a inoculação com *C. dubliniensis* 97040, 1 animal morreu. Nenhuma alteração postural ou comportamental foi registrada nestes grupos.

Um total de 7 animais morreram após inoculação de *C. albicans* PN 74 (n=1 em 2º, 4º, 12º dias e n=4, no 8º dia) . Após 7 dias da inoculação, 2 animais apresentaram a cabeça inclinada para a direita, sendo que um deles continuou com esta característica até o final do período de observação. Quatro animais morreram após inoculação de *C. albicans* PN 69 (n=2, 8º e 21º dias; n=1, 24º dia).

Após inoculação de *C. albicans* PN 60, um total de 8 animais morreram (n=1, 6º, 8º, 11º e 14º dias; n=2, 15º e 20º dias). Sete animais morreram após inoculação com *C. albicans* PN 33 (n=1, 9º, 12º e 15º dias; n=2, 19º e 33º dias).

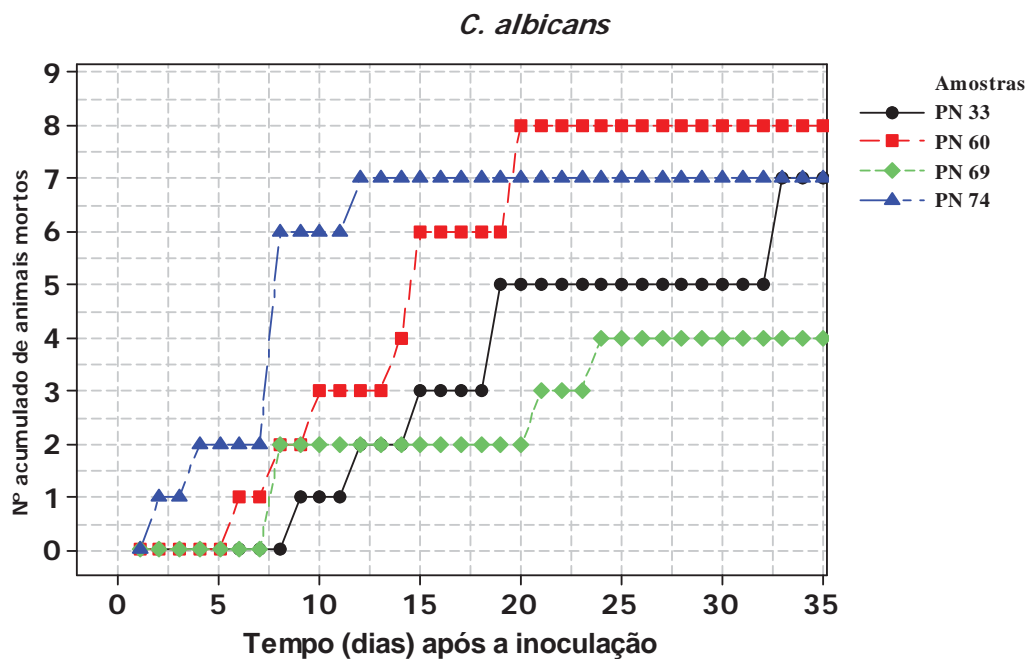


FIGURA 3 - Número acumulado de animais mortos, após inoculação de quatro isolados clínicos de *Candida albicans* (PN 74, PN 69, PN 60 e PN 33), em função do tempo após a inoculação de 10 animais e período de observação de 35 dias.

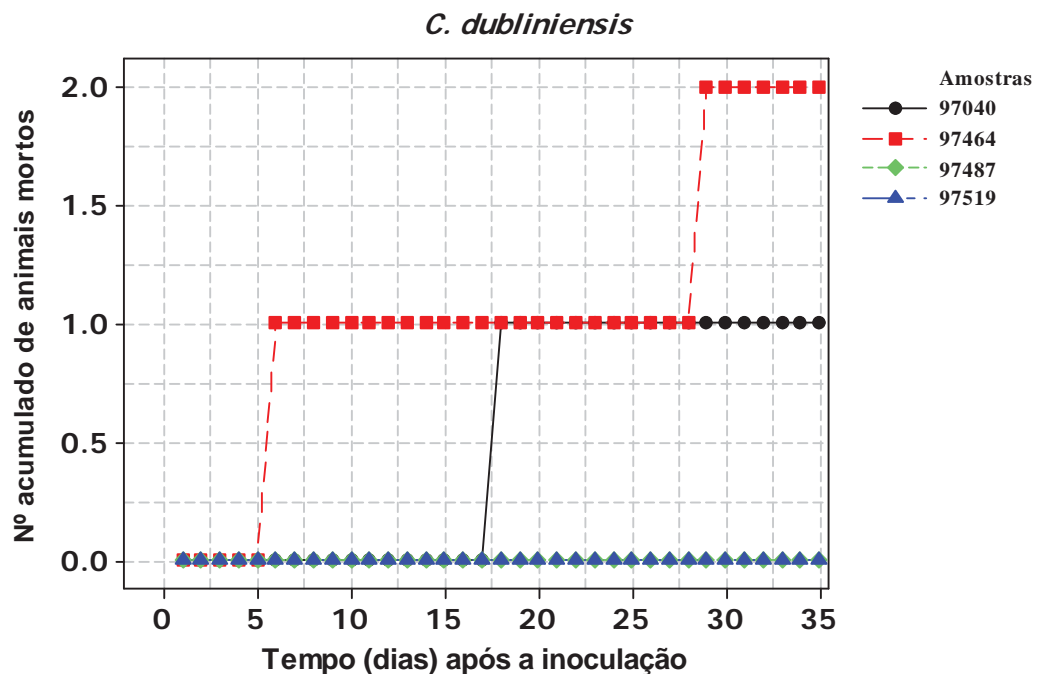


FIGURA 4 - Número acumulado de animais mortos, após inoculação de quatro isolados clínicos de *Candida dubliniensis* (97519, 97464, 97040 e 97487), em função do tempo após a inoculação de 10 animais e período de observação de 35 dias.

Para fins comparativos, na análise estatística os resultados obtidos para as amostras padrão (ATCC 18804 e NCPF 1308) foram considerados juntamente com os resultados obtidos para as amostras clínicas. A comparação da estimativa de sobrevivência dos animais após inoculação com *C. albicans* (ATCC 18804, PN74, PN 69, PN60 e PN 33) ou *C. dubliniensis* (NCPF 3108, 97519, 97040, 97487, 97464), utilizando o método estatístico de análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, foi realizada de duas formas: a primeira analisou os resultados com as amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* duas a duas, gerando valores de p e L,

apresentados na Tabela 2; a segunda considerou todos os resultados obtidos com as amostras em conjunto.

Os resultados obtidos para as análises entre as amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* duas a duas estão apresentados na Tabela 2. Observou-se que quase todas as comparações indicaram que animais inoculados com *C. dubliniensis* tiveram tempo de sobrevivência estatisticamente superior ao observado quando do inóculo de *C. albicans*, exceção feita às comparações *C. dubliniensis* 97464 x *C. albicans* PN 74, *C. dubliniensis* 97464 x *C. albicans* PN 60 e *C. dubliniensis* 97040 x *C. albicans* PN 60.

A segunda análise, tomando os dados em conjunto, demonstrou haver diferença estatisticamente significativa (p-valor = 0,0001) (Figura 5). Sendo que animais inoculados com *C. dubliniensis* tiveram tempo de sobrevivência significativamente mais longo quando comparado com *C. albicans*.

Tabela 4 – Valores de p e L obtidos para a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier (teste *log-rank*) obtidos para a comparação entre as amostras de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* analisadas duas a duas

<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>				
	ATCC 18804	PN 74	PN 69	PN 60	PN 33
NCPF 3108	L = -5,95 p = 0,0001	L = -2,805 p = 0,0055	L = -3,592 p = 0,0003	L = -2,307 p = 0,0210	L = -4,014 p = 0,0000
97519	L = -2,534 p = 0,0024	L = -2,945 p = 0,0001	L = -2,791 p = 0,0015	L = 2,453 p = 0,0054	L = -3,086 p = 0,0004
97464	L = -2,593 p = 0,0035	<b>L = - 1,539</b> <b>p = 0,123</b>	L = -2,20 p = 0,0277	<b>L = -0,942</b> <b>p = 0,346</b>	L = -2,601 p = 0,0093
97040	L = -3,607 p = 0,0003	L = -1,961 p = 0,0499	L = -2,777 p = 0,0054	<b>L = -1,493</b> <b>p = 0,1352</b>	L = -3,085 p = 0,0024
97487	L = -2,6999 p = 0,0014	L = -3,093 p = 0,0001	L = - 2,707 p = 0,0065	L = -2,707 p = 0,0122	L = -2,597 p = 0,0321

\*Valores negativos de L indicam que o segundo grupo (*C. dubliniensis*) apresentou tempo mais longo de sobrevivência; os valores marcados em negrito não foram estatisticamente significativos ( $p \geq 0,05$ ).

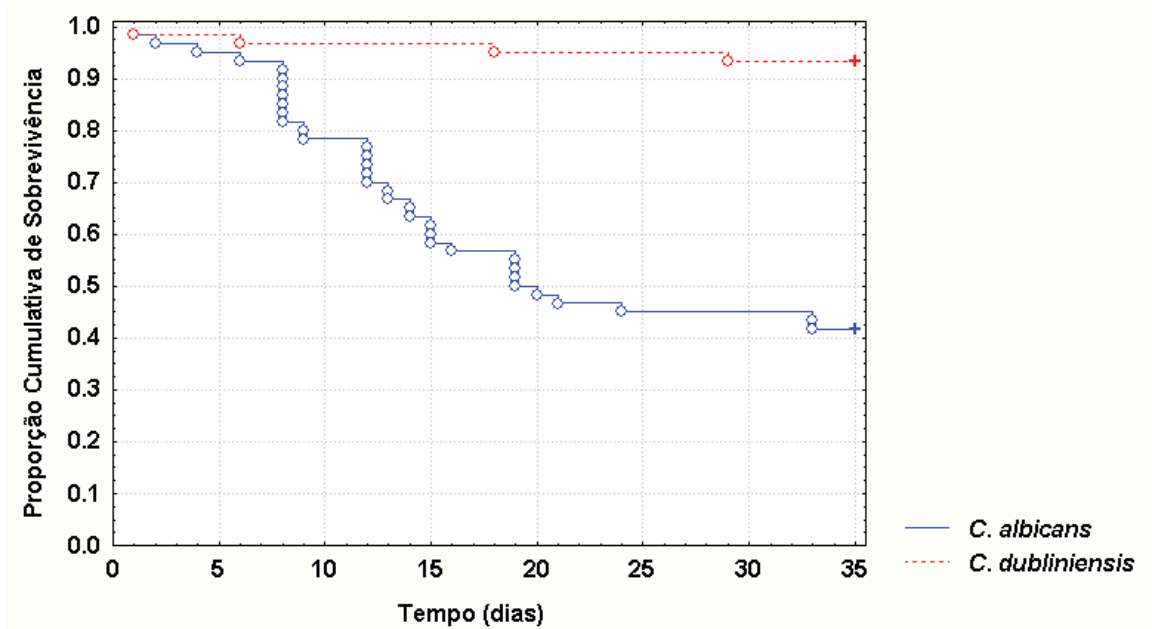


FIGURA 5 - *Candida albicans* (ATCC 18804 e amostras clínicas PN74, PN 69, PN60 e PN 33) versus *Candida dubliniensis* (NCPF 3108, 97519, 97040, 97487, 97464). Comparação da estimativa de sobrevivência dos animais, utilizando o método estatístico da análise de sobrevivência de Kaplan-Meier ( $p$ -valor = 0,0001).

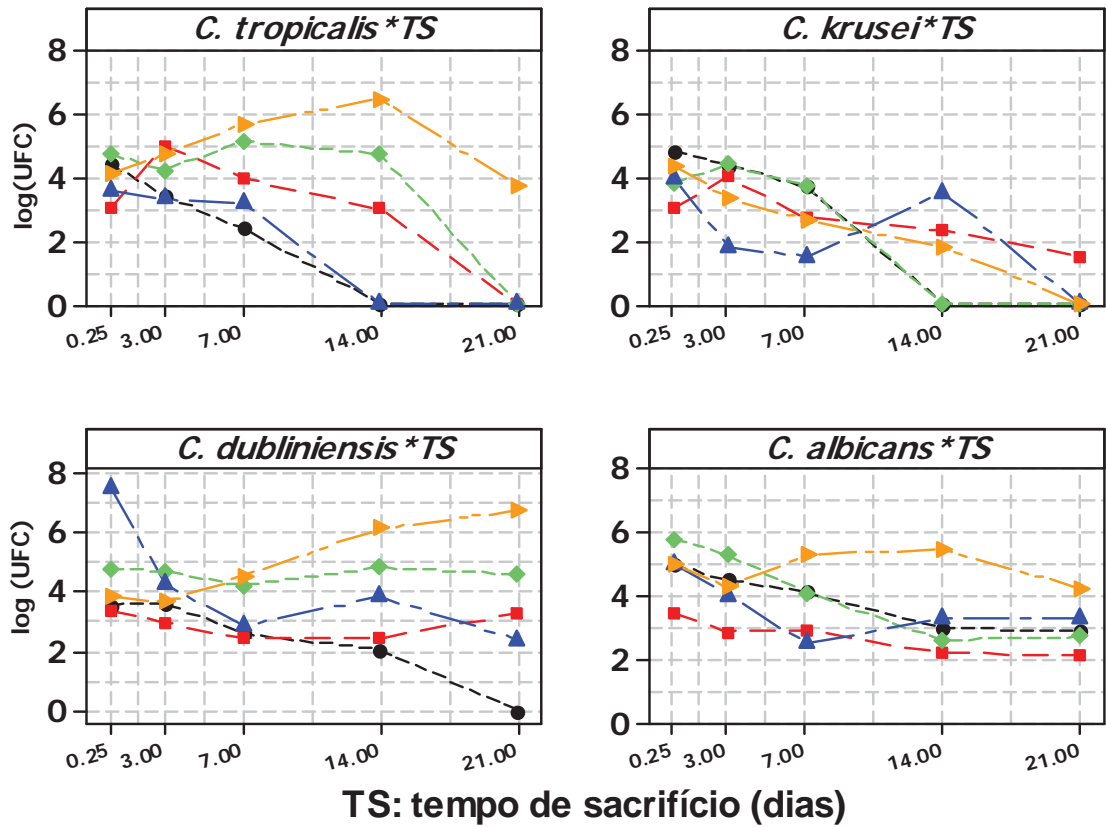
### 5.5 Comparação da cinética de infecção de *C. dubliniensis* com outras espécies de *Candida*

Os resultados obtidos para a avaliação da cinética de infecção de *C. dubliniensis* em relação a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, expressos em valores de UFC/g de órgão, estão apresentados na Figura 6. Os resultados individuais estão apresentados no Apêndice A.

- a) *C. dubliniensis* NCPF 3108: O número de UFC de *C. dubliniensis* isolados do baço foi o mais baixo quando comparado às demais espécies, chegando à eliminação total após 21 dias. No fígado, os valores iniciais foram similares aos de *C. tropicalis* e *C. krusei* e inferiores aos de *C. albicans*, observando-se diminuição lenta do número de UFC/g sem chegar à eliminação total após 21 dias. No cérebro, o número de UFC também sofreu diminuição nos primeiros 14 dias, porém sofreu aumento no 21º dia. Para o pulmão, contagens muito elevadas foram observadas após 6 horas, porém estes valores diminuíram drasticamente durante o período experimental. Padrão de isolamento completamente diferente foi observado em relação ao rim, onde observou-se a contagem mais baixa de *C. dubliniensis* em relação às demais espécies após 6 horas e aumento marcante no número de células isoladas até o 21º dia (7020 UFC, 6 horas; 5.855.010 UFC, 21 dias).
- b) *C. albicans* ATCC 18804: Observou-se que o número de células de *C. albicans* isoladas a partir do baço após 6 horas foi muito elevado (102.450 UFC/g) em relação aos demais grupos (*C. tropicalis* – 24.720, *C. krusei* – 61.260; *C. dubliniensis* = 3.780). No entanto, verificou-se que com o passar do tempo, houve tendência de diminuição acentuada neste número chegando a 825 UFC após 21 dias. A mesma tendência de isolamento muito alto e forte queda posterior nas contagens de *C. albicans* foi observada para o fígado, cérebro e pulmão. As observações feitas a partir do rim nos animais inoculados com cepa desta espécie mostraram isolamento alto após 6 horas (111.300 UFC/g) que diminuiu no 3º dia e chegou a um pico elevado (209.365,5 UFC/g) no 7º dia. Após

este período, as contagens se reduziram drasticamente, porém não chegaram à eliminação total.

- c) *C. krusei* (ATCC 6258): Um padrão comum de diminuição das contagens de células de *C. krusei* foi observado quando do isolamento a partir do baço, fígado, rim e pulmão, culminando na eliminação total do microrganismo após 21 dias. Para o cérebro, também foi observado aumento do número de UFC após 3 dias e posterior diminuição até valores reduzidos no período de 21 dias.
  
- d) *C. tropicalis* (ATCC13803): As contagens de UFC a partir do baço e pulmão foram baixas e chegaram a zero no período de 21 dias. No fígado, esta redução também foi observada entre o período de 6 horas e 3 dias, com sucessivo aumento após 7 dias e novamente retomando a tendência de diminuição até a eliminação completa após 21 dias. No cérebro, estas contagens se elevaram após 3 dias mas também se reduziram drasticamente até a eliminação completa após 21 dias. No rim, este aumento foi observado no 14º dia, seguido de redução, porém sem chegar à eliminação total.



- órgão
- baço
  - cérebro
  - ◆-- fígado
  - ▲-- pulmão
  - ▶-- rim

FIGURA 6 – Número de unidades formadoras de colônia por grama do órgão (log UFC; baço, cérebro, fígado, pulmão e rim) obtido em cada tempo de sacrifício (6 horas = 0,25 dias, 3, 7, 14 e 21 dias) após a inoculação de *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. albicans*.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 *C. dubliniensis* e delineamento do estudo

O estudo de *C. dubliniensis* tem atraído muita atenção nos últimos anos<sup>151</sup>. Dados epidemiológicos advindos do avanço do estudo desta nova espécie, assim como a caracterização de seu padrão de suscetibilidade aos antifúngicos podem explicar este crescente interesse.

Desta forma, esta espécie que foi inicialmente considerada um patógeno oportunista em pacientes HIV positivos em 1995<sup>202</sup> tem sido isolada, nos últimos anos, a partir de vários sítios anatômicos e pacientes com diferentes condições clínicas. *C. dubliniensis* tem sido isolada a partir de pacientes imunocomprometidos<sup>80,94,156,185</sup> assim como de indivíduos imunocompetentes<sup>50,98,109</sup>. Da mesma forma, esta espécie tem sido isolada de pacientes com candidose bucal e também de pacientes sem evidências clínicas da doença<sup>40,54,96,109,134,205</sup>.

*C. dubliniensis* tem sido gradativamente relacionada a casos de doenças invasivas em pacientes com diferentes condições clínicas<sup>98</sup>. Com efeito, a ocorrência de candidemia por *C. dubliniensis* tem sido relatada em várias partes do mundo<sup>2,40,46,49,98,146</sup>, fazendo com que esta

espécie tenha parte importante no cenário das infecções fúngicas na atualidade. Estudos retrospectivos sobre a ocorrência desta espécie em hemoculturas foram realizados nos Estados Unidos. Sancak et al.<sup>181</sup> relataram que 2,6% dos isolados de hemoculturas previamente identificados como *C. albicans* eram na realidade *C. dubliniensis*. Porcentual inferior (0,9%) foi encontrado em estudo semelhante em hemoculturas dos anos de 1998 a 2000 por Hajjeh et al.<sup>89</sup> (2004). Jabra-Rizk et al.<sup>98</sup> Relataram que 7% dos casos de hemoculturas positivas analisados em seu estudo eram relacionadas a *C. dubliniensis*, sendo que este porcentual foi superior a de outras espécies do gênero *Candida* (*C. tropicalis* 5,7%, *C. krusei* 2% e *C. lusitanae* 1%).

Analisando a literatura, alguns aspectos parecem estar bem estabelecidos quanto a *C. dubliniensis*. Em relação à sua ocorrência no mundo, vários relatos<sup>2,66,80,105,111,123,140,205,208,209</sup> indicam uma distribuição global. Por outro lado, muitos outros aspectos relacionados a *C. dubliniensis* parecem não estar completamente elucidados. Segundo Jabra-Rizk et al.<sup>94</sup>, muito ainda deve ser esclarecido sobre o estado de portador de *C. dubliniensis*. Um dado que chama atenção é que apesar desta espécie apresentar muitas similaridades fenotípicas com *C. albicans*, descritas por Sullivan et al.<sup>197,200,202</sup>, esta parece ser um constituinte mais raro da microbiota bucal<sup>163</sup>.

A maioria dos relatos na literatura versam sobre a ocorrência desta espécie em indivíduos HIV-positivos e com AIDS sendo que os relatos em pacientes com outras doenças sistêmicas são mais raros. Da mesma forma, observamos que os dados sobre os fatores de virulência e patogenicidade de *C. dubliniensis* também não são freqüentes. Considerando-se estas observações, o presente estudo foi delineado no sentido de avaliar a presença desta espécie em pacientes diabéticos do tipo I e II, pacientes sob quimioterapia para o tratamento do câncer de mama e poliquimioterapia para o tratamento da hanseníase. Também objetivamos avaliar a produção de exoenzimas e suscetibilidade aos antifúngicos dos isolados de *C. dubliniensis* obtidos.

Estudos *in vivo* utilizando camundongos sugeriram que *C. dubliniensis* é menos virulenta que *C. albicans*<sup>82,201</sup>. Contudo, não se observa na literatura comparando a virulência para camundongos de *C. dubliniensis* com outras espécies do gênero *Candida*. Assim, o estudo buscou ainda avaliar a patogenicidade *in vivo* utilizando modelo com animais de experimentação de *C. dubliniensis* em relação a espécies *Candida* não-*albicans*, utilizando análise de sobrevivência e cinética de infecção.

## 6.2 Seleção dos grupos de estudo

Um efeito comum e clinicamente significativo de desordens médicas e seus tratamentos é a alteração da função e integridade da mucosa bucal e estruturas relacionadas, tais como glândulas salivares, papilas gustativas e periodonto<sup>189</sup>. Estas manifestações podem ser resultado de doenças que levam ao imunocomprometimento e resultam em diminuição da resposta do hospedeiro às infecções, ou sequelas do próprio tratamento como úlceras, produção diminuída de saliva e mudanças na microbiota bucal<sup>16,99</sup>.

As complicações causadas pelas doenças e seu tratamento podem induzir desconforto e dor, interferir na nutrição, administração de fármacos, aumento das internações e custos hospitalares e em alguns pacientes até mesmo septicemias com risco de morte<sup>231</sup>. Uma complicação comum é a candidose bucal que produz morbidade e em certas circunstâncias mortalidade aumentada<sup>67</sup>. Segundo Ship et al.<sup>189</sup>, a mucosa bucal é a porta de entrada primária para diversos patógenos oportunistas, incluindo espécies de *Candida*. O estabelecimento de fatores de risco para candidemia tem sido feito em pacientes não-imunocomprometidos e também em criticamente doentes, sendo que a colonização, exposição anterior ou concomitante a antibióticos,

neutropenia, acesso vascular e outros procedimentos cirúrgicos e falência renal são citados como fatores de risco<sup>63</sup>.

Desta forma, a prevenção de infecções superficiais é considerada importante devido ao seu possível papel no desenvolvimento de infecções sistêmicas que podem estar associadas com mortalidade aumentada<sup>231</sup>. Segundo Ship et al.<sup>189</sup>, estudos são necessários para aumentar o conhecimento sobre os fatores de risco para candidose em populações específicas de pacientes que auxiliem no desenvolvimento de guias para profilaxia e tratamento das infecções fúngicas.

Dentro deste contexto, acreditamos ser de grande importância a investigação da epidemiologia de *C. dubliniensis* em populações específicas, principalmente considerando os relatos de níveis menores de suscetibilidade aos agentes antifúngicos azólicos<sup>152,163</sup> e capacidade de desenvolvimento de resistência ao fluconazol<sup>111,197</sup>.

Relatos da literatura sustentam a hipótese de que as infecções fúngicas bucais são associadas à maior mortalidade em pacientes com câncer, particularmente aqueles com doenças hematológicas<sup>23,189</sup>. Considerando que casos de candidemia por *C. dubliniensis* têm sido relatados em pacientes com neutropenia induzida por quimioterapia<sup>134</sup>, acreditamos que dados epidemiológicos sobre a presença de *C. dubliniensis* nestes pacientes sejam de grande interesse.

Na literatura existem dois estudos que verificaram a presença de *C. dubliniensis* em pacientes com câncer, contudo as populações estudadas se caracterizavam por apresentar neoplasias em estágio avançado com localizações diversas. Davies et al.<sup>59</sup> estudaram 120 pacientes que recebiam tratamento paliativo para o câncer avançado, sendo que os diagnósticos incluíam câncer de mama, brônquios, próstata, intestino e língua. Por outro lado, Bagg et al.<sup>23</sup> estudaram população composta por pacientes com câncer de pulmão, traquéia e brônquios, mama, próstata, cólon, boca, pâncreas, esôfago, estômago, ovário e outros, também sob tratamento paliativo para o estágio avançado da doença. Em ambos os estudos, os autores observaram isolamento de *C. dubliniensis* a partir de isolados bucais. Analisando estes dados, acreditamos que o estudo focado para uma população com neoplasia em local comum, com tratamento quimioterápico padronizado poderia trazer dados importantes em relação à epidemiologia de *C. dubliniensis*. Assim, somando-se o fato de que as estatísticas mostram que o câncer de mama é o mais prevalente dentre as mulheres brasileiras<sup>43</sup>, selecionamos como grupo de estudo mulheres com câncer de mama sob tratamento composto por ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil.

Estudo retrospectivo em adultos com diabetes e candidemia relatou a emergência de *Candida* não-albicans como a causa mais

frequente e pode estar relacionada com a mortalidade em pacientes diabéticos<sup>189</sup>. Relata-se que pacientes diabéticos são mais suscetíveis a infecções e a ocorrência de candidose bucal é mais elevada quando comparada a indivíduos controle<sup>14,60,67</sup>.

Em estudos seqüenciais, Willis et al.<sup>225,226</sup> relataram o primeiro isolamento de *C. dubliniensis* a partir de amostras bucais de 414 pacientes diabéticos insulino-dependentes. Apesar de dados interessantes a respeito da presença da referida espécie na cavidade bucal de pacientes com candidose bucal, os autores não relataram o tipo de diabetes estudado nem a idade dos indivíduos incluídos no estudo, o que limitou a interpretação dos dados. Outro estudo<sup>121</sup> incluiu pacientes com diabetes do tipo I e II em seu estudo formando um único grupo e também observou isolamento de *C. dubliniensis* a partir de amostras bucais, contudo utilizou como grupo controle, relatos prévios da literatura de pacientes não-diabéticos. Belazi et al.<sup>29</sup> analisou 128 pacientes com diabetes do tipo II e respectivos controles na Grécia e não encontraram *C. dubliniensis*. Assim, acreditamos que um estudo incluindo populações distintas de diabéticos do tipo I e II, com controle glicêmico similar, com relação aos respectivos grupos controle pareados poderia gerar informações importantes sobre a prevalência de *C. dubliniensis*.

Um outro grupo de estudo que julgamos ser de interesse foi o de pacientes com hanseníase. Um único estudo sobre a microbiota fúngica bucal nestes pacientes relatou elevado número de isolados de *C. krusei*<sup>174</sup> e ausência de *C. dubliniensis*. No estudo de nosso grupo, o maior isolamento de *C. krusei* não foi observado<sup>149</sup>. A diferença de resultados pode estar relacionada às características das populações estudadas, já que o estudo anterior<sup>174</sup> relatou ter avaliado uma população advinda de uma comunidade fechada, com pouco contato com o exterior, com dieta e hábitos específicos.

A coleta de amostra bucal clínica foi realizada segundo preconizado por Samaranayake et al.<sup>180</sup>. Estes autores reportam que a técnica de coleta por *swab* é considerada menos confiável do que a de enxague bucal. Ship et al.<sup>189</sup> também preconizam a técnica do enxague bucal concentrado para o acompanhamento micológico da colonização por fungos. Segundo Williams e Lewis<sup>224</sup>, as técnicas de *imprint* e *swabs* têm sido indicadas na presença de lesões localizadas e a técnica de enxague bucal tem como vantagem a possibilidade de quantificação de vários microrganismos simultaneamente, porém não permite localizar o sítio exato da infecção dentro da cavidade bucal.

### 6.3 Método de diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*

A seleção do método de diferenciação genética entre *C. albicans* e *C. dubliniensis* constituiu-se numa das etapas iniciais do estudo. Sancak et al.<sup>181</sup> salientou a importância da correta diferenciação entre estas duas espécies para a compreensão do significado clínico e do papel epidemiologia da espécie mais recentemente descrita.

Vários estudos anteriores pesquisaram métodos fenotípicos para a diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis*<sup>8,94,107,164</sup>, porém, concluíram que nenhum destes isoladamente é capaz de distinguir satisfatoriamente as duas espécies<sup>120,151</sup>. Mähniß et al.<sup>120</sup> considera que o problema na diferenciação por métodos fenotípicos parece não ser a detecção de *C. dubliniensis* mas a habilidade de *C. albicans* se encaixar nas características que parecem ser típicas de *C. dubliniensis*.

No presente estudo, testamos o teste proposto por Pinjón et al.<sup>165</sup> de crescimento diferencial a 45°C como método presuntivo de diferenciação entre as espécies. Estes autores verificaram que nenhuma *C. dubliniensis* cresceu a esta temperatura e apenas 1 amostra de *C. albicans* não cresceu e indicaram-na como sendo um meio simples, confiável e barato para diferenciação. Para tanto, foram testadas 96 isolados *C. albicans*/*C. dubliniensis* (grupo diabetes tipo I), 41 do grupo controle diabetes tipo I, 61

do grupo diabetes tipo II e 71 controle diabetes tipo II. Após a realização dos testes, observou-se respectivamente em cada grupo 13, 3, 7 e 7 isolados sugestivos de *C. dubliniensis*. Comparando-se estes resultados com os obtidos na identificação genotípica onde nenhuma amostra de *C. dubliniensis* foi detectada, optou-se pela realização da PCR para todos os isolados *C. albicans/C. dubliniensis*. Estes resultados estão de acordo com relatos anteriores em que somente algumas amostras que não cresciam a esta temperatura eram de fato *C. dubliniensis*<sup>66,76,212,181</sup>. Os dados obtidos corroboram a observação de Capriles et al.<sup>45</sup> de que o método de crescimento a 45°C isolado não é suficientemente confiável para a diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

Milán et al.<sup>140</sup> também relataram que a identificação de *C. dubliniensis* pode ser determinada de modo inequívoco apenas utilizando-se métodos moleculares adequados. Apesar disso, existem na literatura estudos que relatam *C. dubliniensis* identificadas fenotipicamente sem confirmação genotípica. Us e Cengiz<sup>212</sup> acreditam que é necessária a combinação de pelo menos 5 métodos fenotípicos para o diagnóstico exato de *C. dubliniensis* e utilizaram formação de clamidoconídeos, crescimento a 42°C e 45°C, característica morfológica em CHROMagar e crescimento em Staib agar. Fotedar e Hedaithy<sup>75</sup> relataram identificação por métodos fenotípicos utilizando crescimento a 45°C, crescimento em ágar fubá e Staib agar,

característica morfológica em CHROM agar, sistema API 20C AUX e sorotipagem. Yücel e Kantarcioglu<sup>223</sup> utilizaram formação de tubo germinativo e clamidoconídeos em ágar girassol creatinina, fluorescência em ágar com azul de metileno 0,01%, crescimento a 37°C, 42°C e 45°C, testes de assimilação.

Dentre as técnicas moleculares descritas relata-se na literatura a eficácia de métodos como a PFGE<sup>197</sup>, RAPD<sup>198</sup> e utilização de sondas específicas. No entanto, a PCR tem sido citada como uma potencial alternativa, principalmente devido à rápida execução<sup>28,138,200</sup>.

O estabelecimento do protocolo de diferenciação molecular baseou-se nos estudos de Donnelly et al.<sup>61</sup> e Mähniß et al.<sup>120</sup>. Estes autores utilizaram par de iniciadores *C. dubliniensis* específicos e iniciadores universais para a execução da PCR. No que se refere à extração de DNA das amostras, Donnelly e Mahn preconizaram a fervura a 95°C por 10 minutos seguida por centrifugação a 20.000 g por 5 minutos a 4°C, sendo utilizado o sobrenadante para a amplificação. Em nosso estudo, testes preliminares mostraram que o método de extração por fervura proposto era eficaz para a utilização imediata das amostras, porém a utilização após período adicional (superior a 2 meses) era comprometida pela rápida degradação do material. Desta forma, optou-se por utilizar extração com

zimoliase em tampão 1M sorbitol, que nos forneceu um material mais estável.

#### **6.4 Prevalência de *C. dubliniensis***

Os resultados deste estudo avaliando outras condições sistêmicas (diabetes, câncer de mama e hanseníase) corroboram os relatos anteriores de baixa prevalência desta espécie em nosso país, já que *C. dubliniensis* não foi detectada dentre os isolados analisados.

Estudos realizados no Brasil mostram que a prevalência dos isolados de *C. dubliniensis* parece ser mais baixa nesta região em relação a países da Europa e Estados Unidos. Milán et al.<sup>140</sup> avaliou 108 pacientes brasileiros com AIDS e verificou que 3 destes (2,7%) eram portadores de *C. dubliniensis* no momento da coleta. Da mesma forma, outros autores observaram porcentagem baixa (1,15%)<sup>11</sup> ou nula<sup>56</sup> desta espécie dentre isolados bucais de pacientes HIV positivos com candidose bucal (1,15%). Chavasco et al.<sup>50</sup> isolaram *C. dubliniensis* da cavidade bucal de 5,4% de indivíduos HIV-negativos e positivos com candidose bucal eritematosa estudados. Amostras subgengivais de pacientes pediátricos HIV-positivos foram analisadas e 5,7% dos indivíduos foram positivos para esta espécie.

Países como África do Sul (1,5%)<sup>32</sup> e Índia (0,7%)<sup>88</sup> também apresentam baixas ocorrências de *C. dubliniensis*, com resultados comparáveis aos observados em nosso país. Por outro lado, estudos realizados na Argentina relataram uma ocorrência elevada (12,96%) de *C. dubliniensis* entre os isolados da região orofaríngea de pacientes HIV positivos<sup>31</sup>.

De fato, a prevalência de *C. dubliniensis* na população tem sido muito discutida nos últimos anos na literatura mundial e apresenta resultados muito variáveis. Altas porcentagens de pacientes HIV-positivos positivos para *C. dubliniensis* na cavidade bucal têm sido descritas nos Estados Unidos (35%)<sup>95</sup> and Irlanda (31,7%)<sup>200</sup>. Outros estudos em pacientes HIV-positivos relataram prevalência mais baixa como na África do Sul (26,3%) (Blignaut 2007), Estados Unidos 25%<sup>133</sup>, 20%<sup>97</sup> e 17,5%<sup>111</sup> e Itália<sup>80</sup>.

Segundo Chavasco et al.<sup>50</sup>, estudos sobre a ocorrência desta espécie na população são extremamente importantes para um melhor entendimento sobre sua epidemiologia, particularmente na América do Sul, onde sua frequência não é ainda bem conhecida.

Segundo Faggi et al.<sup>66</sup> é difícil explicar a razão para a grande variabilidade entre os estudos, sendo possível que o tratamento com antifúngicos, especialmente o fluconazol utilizado por longos períodos para tratar e prevenir candidoses possa selecionar espécies menos

suscetíveis como *C. albicans*. Essa hipótese poderia explicar também a alta incidência de *C. dubliniensis* encontrada em alguns estudos em que os pacientes tinham recebido terapia antifúngica<sup>111,133,197</sup> e baixas em estudos com ausência de tratamento antifúngico prévio<sup>66,140</sup>. Também é possível que *C. dubliniensis* possa não ser frequente na população e que existam áreas geográficas com maior frequência de ocorrência. Também não podemos subestimar o fato de que as populações citadas nos vários estudos não podem ser comparadas facilmente (idade, diferentes estágios de infecção por HIV, presença ou não de candidose bucal, terapia antiretroviral ou profilaxia antifúngica com fluconazol, diferentes doenças) e os métodos e sítio anatômico da coleta e técnicas de identificações nem sempre são os mesmos.

Quanto ao local anatômico, os estudos sugerem que *C. dubliniensis* é um patógeno oportunista predominantemente associado com colonização e infecção da cavidade bucal e trato superior<sup>45,50,80,88,95,111</sup>. Mariano et al.<sup>123</sup> avaliando 548 isolados provenientes de pacientes HIV-positivos e negativos, observou *C. dubliniensis* somente a partir de amostras de orofaringe. *C. dubliniensis* já foi isolado também a partir de sítio periodontal de crianças infectadas pelo HIV<sup>168</sup>. Kim et al.<sup>109</sup>, estudando crianças de 6 semanas a 19 anos, relataram que em contraste com a literatura existente os pacientes não

estavam primariamente infectados na cavidade bucal, mas em vários sítios, particularmente o trato respiratório.

Dados do mesmo local geográfico apresentam grande variação dependendo da população estudada. Estudos realizados no sul da África demonstram raro isolamento desta espécie dentre pacientes HIV/AIDS adultos<sup>33</sup> e prevalência de 26,3% em crianças também HIV/AIDS<sup>32</sup>. Estudo sobre diferenças de prevalência relacionada à raça verificou presença de *C. dubliniensis* em 9% de pacientes brancos HIV-positivos e 1,5% dentre pacientes negros também HIV-positivos<sup>33</sup>. Os autores sugeriram que esta diferença pronunciada pode ser baseada na raça ou ser resultado de diferenças culturais que incluem hábito e dieta. Outros estudos investigaram a existência de diferenças genotípicas entre os isolados de *C. dubliniensis* em relação a diferenças étnicas ou raciais na população da qual os isolados eram provenientes. Mc Cullough et al.<sup>131</sup> estudando isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* em diferentes populações em Israel observaram que não houve diferença entre os grupos desta mesma localidade geográfica, contudo o grupo como um todo diferiu estatisticamente dos dados globais.

Um dado na literatura que nos chama atenção é que a ocorrência de *C. dubliniensis* em hemoculturas parece também ser inferior na América do Sul em relação aos Estados Unidos. Enquanto nos Estados

Unidos têm sido relatados percentuais entre 0,9%<sup>181</sup> e 7%<sup>89</sup>, um estudo chileno verificou um percentual de 0,02% de ocorrência desta espécie dentre os isolados de hemoculturas<sup>192</sup>. Este percentual é idêntico ao observado na Turquia (0,002%) por Tekeli et al.<sup>207</sup>.

A questão da co-colonização por *C. dubliniensis* e *C. albicans* e outras espécies de *Candida* tem sido discutida, apesar de nenhuma consequência clínica ter sido determinada<sup>121</sup>. Alguns autores<sup>225,226</sup> e Manfredi et al.<sup>121</sup> verificaram a co-colonização de *C. dubliniensis* com *C. albicans*. Willis et al.<sup>225</sup> relataram o isolamento de *C. dubliniensis* em associação com *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Em nosso estudo, o isolado de *C. dubliniensis* encontrado foi proveniente de isolamento em associação com *C. tropicalis*.

Um dado que chama atenção quanto aos resultados obtidos é que *C. dubliniensis* foi encontrada apenas dentre os isolados dos indivíduos controle, ainda que em um percentual de isolamento muito baixo (0,002%, 1/479 isolados). Estudo anterior desenvolvido pelo nosso grupo em pacientes HIV positivos e grupo controle pareado também observou pequeno percentual de isolamento bucal (4,4%) de *C. dubliniensis* apenas dentre os indivíduos do grupo controle<sup>21</sup>. Os relatos prévios para indivíduos controle na literatura são variáveis. Jabra Rizk<sup>95</sup> relatou que nenhuma das 30 crianças que denominou de “aparentemente” saudáveis apresentou esta espécie na cavidade bucal. Kim et al.<sup>109</sup> isolou *C. dubliniensis* a partir de 13 de um total

de 205 crianças HIV-negativas. Um percentual de 16,4% de 55 isolados de *Candida* de adultos brancos HIV-negativos foram identificados como *C. dubliniensis*<sup>33</sup>. Chavasco et al.<sup>50</sup> no Brasil identificaram uma amostra de *C. dubliniensis* dentre 24 isolados bucais de pacientes HIV-negativos com candidose eritematosa.

No presente estudo, dentre os isolados de pacientes diabéticos do tipo I e II, não foi detectada nenhuma amostra de *C. dubliniensis*. O primeiro isolamento desta espécie em pacientes diabéticos foi relatado por Willis et al.<sup>226</sup>, que observaram que 50% dos 414 pacientes estudados apresentavam *C. albicans* e *C. dubliniensis* simultaneamente na cavidade bucal. Contudo, os resultados deste estudo podem estar superestimados pois a identificação dos isolados foi realizado apenas por métodos fenotípicos (produção de clamidoconídeos em agar fubá e sistema de identificação ID32C Biomérieux).

Posteriormente, o mesmo grupo<sup>228</sup>, que estudando uma população de 318 pacientes diabéticos insulino-dependentes na Irlanda, verificou que 18,24% eram positivos para esta espécie na cavidade bucal. A grande diferença na prevalência na presente amostra em relação ao estudo irlandês<sup>228</sup> chama atenção. Considerando-se que existem relatos sobre a influência dos métodos de coleta no isolamento de leveduras do gênero *Candida*<sup>224</sup>, nos pareceu necessário comparar os métodos

utilizados nos dois estudos. Verificou-se que o método utilizado por Willis et al.<sup>228</sup> é exatamente o mesmo daquele utilizado em nosso estudo (técnica do enxágüe bucal concentrado utilizando PBS 0,1M, pH 7,2). Estes autores identificaram os isolados por métodos moleculares (RAPD, PFGE).

Os nossos resultados estão de acordo com Belazi et al.<sup>29</sup> que não relataram isolamento de *C. dubliniensis* a partir de amostras bucais de pacientes diabéticos do tipo II. Porcentagem baixa de isolamento desta espécie (3,6%) foi observada por Manfredi et al.<sup>121</sup>, que analisaram 137 pacientes diabéticos na Inglaterra, sendo que 56 eram do tipo I e 81 do tipo II.

Manfredi et al.<sup>121</sup> sugeriram que a presença de *C. dubliniensis* possa estar relacionada a fatores locais, tal como a presença de dentina ou esmalte dentário, já que observaram que todos os pacientes diabéticos positivos para *C. dubliniensis* eram dentados totais ou parciais. Na população analisada neste estudo, quase a totalidade dos pacientes eram dentados parciais, contudo nenhum destes apresentou a referida espécie. Por outro lado, considerando-se que no referido estudo apenas 5 pacientes dentados apresentaram *C. dubliniensis* numa população de 137 indivíduos, esta conclusão nos parece precoce.

Estudos futuros com uma amostra maior de pacientes diabéticos brasileiros nos parecem necessários, considerando-se que Willis et al.<sup>228</sup> sugerem que a habilidade de *C. dubliniensis* em tornar-se resistente ao fluconazol, pode ser um indicativo de que complicação maior no tratamento da candidose bucal em pacientes diabéticos.

Não foram observadas também amostras de *C. dubliniensis* dentre os isolados bucais provenientes de pacientes sob quimioterapia para o tratamento do câncer de mama. Estes resultados diferem de estudos anteriores, onde esta espécie foi encontrada em baixos percentuais. Contudo, a comparação entre os resultados obtidos neste estudo com os relatos anteriores é dificultada pela diferença nas condições clínicas e quimioterapia dos pacientes envolvidos. No presente estudo, foram incluídos apenas pacientes do sexo feminino com câncer de mama sob quimioterapia. As pacientes não haviam sido submetidas à terapia com antibióticos ou antifúngicos nos 3 meses que precederam a coleta e eram tratadas em ambiente ambulatorial e não-hospitalar. Bagg et al.<sup>23</sup> estudaram 207 pacientes recebendo tratamento paliativo para neoplasias malignas diversas em estágio avançado. De um total de 206 pacientes com dados registrados sobre antifungoterapia, 22% receberam antifúngicos no mês que precedeu a coleta. A prevalência de *C. dubliniensis* encontrada foi baixa (9/194). Percentual idêntico foi verificado

por Davies et al.<sup>59</sup> em pacientes com câncer avançado sob quimioterapia em Londres, sendo que 40% destas tinham câncer de mama. *C. dubliniensis* foi a terceira espécie mais frequentemente isolada, perfazendo 5% dos isolados.

Considerando-se que esta espécie já foi correlacionada com candidemia em pacientes sob quimioterapia, acreditamos que mais estudos nesta população possam gerar dados clínicos importantes. Estudos futuros de grupos com outros tipos de neoplasias, assim como sob quimioterapia com fármacos diferentes daqueles administrados para o câncer de mama são de extrema importância. Além disso, a terapia antifúngica empírica utilizando fluconazol é bastante utilizada em pacientes com câncer com febre prolongada e neutropenia<sup>222</sup>. Considerando-se os estudos que sugerem que *C. dubliniensis* tem capacidade de desenvolver resistência ao fluconazol em curto período de tempo<sup>111,197</sup>, acreditamos que estudos em pacientes com câncer submetidos à terapia antifúngica empírica também sejam interessantes.

Em relação aos pacientes hansenianos, nossos resultados estão de acordo com estudo anterior que não encontrou *C. dubliniensis* dentre um total de 35 isolados estudados<sup>174</sup>. Neste estudo, os autores utilizaram o sistema API LAB Plus (Bio Mérieux) para a identificação. Importante salientar também que o mesmo foi desenvolvido em um grupo

de indivíduos reclusos em uma comunidade fechada com contato mínimo com o mundo exterior. A realização de estudos futuros com uma população maior de pacientes hansenianos são de grande importância.

A menor frequência de isolamento de *C. dubliniensis* em relação a *C. albicans* permanece não elucidada. Stokes et al.<sup>196</sup> sugerem que a menor aderência de *C. dubliniensis* ao epitélio humano *in vitro* e sua pobre capacidade de colonizar o trato gastrointestinal podem estar relacionadas à sua menor possibilidade de ser um comensal de superfícies epiteliais e seu menor isolamento a partir da mucosa bucal de pacientes saudáveis. Outro aspecto interessante levantado por estes autores é que devido às suas características é possível que a cavidade bucal ou o trato gastrointestinal não seja o nicho ambiental ideal para esta espécie e que outros sítios anatômicos devem ser investigado quanto a sua presença.

### **6.5 Sensibilidade aos antifúngicos em *C. dubliniensis***

Considerando que a suscetibilidade aos antifúngicos é um dado importante para a seleção da conduta terapêutica (Alves et al., 2001), acreditamos ser de valia esta avaliação mesmo sendo nossa amostragem

restrita. Estudos anteriores também testaram pequeno número de amostras, tendo em vista o baixo isolamento a partir das populações de estudo<sup>23,88,123,129,166,160</sup>.

Em nosso estudo, a amostra de *C. dubliniensis* detectada foi sensível aos antifúngicos fluconazol, 5-fluorocitosina, cetoconazol e anfotericina B. Estes dados estão de acordo com a maioria dos estudos na literatura que relatam alta sensibilidade de *C. dubliniensis* frente ao fluconazol<sup>5,80,82,88,123,143,158,160,166,185,173,178,185,191</sup>, 5-fluorocitosina<sup>88,160,166,178,185,191</sup>, cetoconazol<sup>82,166,185,191</sup> e anfotericina B<sup>5,159,161,466,178,185,191</sup>.

Estudos anteriores relataram sensibilidade de *C. dubliniensis* ao itraconazol<sup>82,123,159,166,191,223</sup>. Por outro lado, alguns autores já relatam baixas porcentagens de isolados resistentes ao itraconazol (0-4,6%)<sup>75,111,161</sup>. Quindos et al.<sup>171</sup> relataram que 13.8% dos isolados testados eram resistentes frente a este fármaco. Odds et al.<sup>152</sup> relataram que valores médios de CIM para fluconazol, itraconazol e cetoconazol foram mais elevados para *C. dubliniensis* que em *C. albicans*. Quindós et al.<sup>171</sup> relataram que cerca de 25% dos isolados de *C. dubliniensis* testados eram resistentes ao cetoconazol. Isolados resistentes ao cetoconazol também foram observados por Yücel e Kantarcioglu<sup>223</sup>.

Apesar da maioria dos isolados clínicos de *C. dubliniensis* serem suscetíveis aos azóis, existem relatos de isolados resistentes ou sensíveis dependente da dose (SDD) ao fluconazol, provenientes da cavidade bucal de pacientes HIV-positivos com candidose orofaríngea recorrente e exposição prévia ao fármaco<sup>94,111,133,142,143,177</sup>. Em particular o estudo de Capriles et al.<sup>45</sup> chama atenção pelo elevado número de isolados resistentes (19%, MIC > 64 µg/ml).

Sebti et al.<sup>185</sup> verificaram isolados com sensibilidade reduzida ao fluconazol dentre amostras obtidas de pacientes com AIDS previamente expostos ao fármaco. Por outro lado, existe relato de isolado SDD (MIC 32 µg/ml) obtido a partir de paciente não tratado com fluconazol durante os 12 meses anteriores à coleta<sup>209</sup>.

A substituição de *C. albicans* por *C. dubliniensis* em pacientes HIV-positivos após tratamento com fluconazol também já foi relatada<sup>128,137</sup>. Redding et al.<sup>173</sup>, estudando pacientes sob radioterapia para câncer de cabeça e pescoço com candidose orofaríngea, verificou que após 1 semana de tratamento com fluconazol somente *C. dubliniensis* pôde ser isolada da cavidade bucal e que esta espécie levou duas vezes mais tempo para ser erradicada quando comparada com *C. albicans*. Estes estudos, somados à geração de fenótipo estável de resistência ao fluconazol *in vitro* a partir de isolados sensíveis<sup>143</sup>, fornecem evidências de que *C. dubliniensis* pode ter

maior propensão ao desenvolvimento de resistência aos azóis em relação a *C. albicans*<sup>128</sup>. Schorling et al.<sup>184</sup> relataram que o rápido desenvolvimento de resistência ao fluconazol por *C. dubliniensis* poderia explicar a mudança epidemiológica e recente emergência desta espécie como patógeno oportunista na cavidade bucal de pacientes HIV positivos. Por outro lado, Ruhnke et al.<sup>177</sup> verificaram a permanência de *C. albicans* e *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol por 18 meses e que após este período a infecção tornou-se não-responsiva ao tratamento mesmo com dose de 400 mg/dia. Estes autores sugerem que tanto *C. albicans* como *C. dubliniensis* podem desenvolver resistência a este fármaco após repetidas exposições.

Apesar de a maioria dos isolados serem sensíveis a 5-fluorocitosina como relatado anteriormente<sup>75</sup> analisando isolados de *C. dubliniensis* provenientes de pacientes HIV-negativos, observaram que 43% dos isolados resistentes a este fármaco utilizando as metodologias de NCCLS e E-test. Estes autores relatam que nenhum dos pacientes haviam recebido tratamento prévio com 5-fluorocitosina e sugerem resistência primária destes isolados.

Dentre os fármacos mais recentes, posaconazol<sup>159,192</sup> e voriconazol<sup>5,88,171</sup>, também têm sido relatados como efetivos frente a *C. dubliniensis*. Segundo Salgado Parreño et al.<sup>178</sup>, o voriconazol foi mais

efetivo do que os outros azóis. Pfaller et al.<sup>159</sup> testaram 88 isolados de *C. dubliniensis* e verificaram que todas eram sensíveis à caspofungina.

Com relação ao ponto de corte adotado para anfotericina B, apesar de ainda não haver um valor proposto pelo NCCLS, os autores sugerem que MIC  $\leq$  1,0  $\mu$ g/ml são compatíveis com níveis séricos de anfotericina B e relacionados com boa evolução clínica<sup>128</sup>. Alves et al.<sup>8</sup> relataram que anfotericina B foi o fármaco que exibiu maior atividade *in vitro* frente os isolados incluindo aquelas resistentes ao fluconazol. Quindós et al.<sup>171</sup> relataram que as novas formulações lipídicas e lipossomais de anfotericina B são alternativas ao fluconazol para infecções por *C. dubliniensis*.

O baixo número de isolados obtidos nos estudos é uma limitação para a geração de informações no que tange à sensibilidade aos antifúngicos nesta espécie. Acreditamos que estudos multicêntricos com maior número de amostras são necessários.

## 6.6 Produção de exoenzimas por *C. dubliniensis*

Com relação à produção de fosfolipase, os nossos resultados estão de acordo com observações anteriores já que a amostra de *C. dubliniensis* encontrada não produziu esta enzima. Fotedar e Al-Hedaithy<sup>74</sup> que relataram que nenhuma das 87 amostras de *C. dubliniensis* testadas produziu fosfolipase. Por outro lado, discordam com resultados de Vidotto et al.<sup>216</sup> que observaram que todas as 26 amostras testadas produziram fosfolipase.

A amostra de *C. dubliniensis* detectada em nosso estudo também não produziu proteinase. Os relatos na literatura em relação a este fator de virulência são inconclusivos, Vidotto et al.<sup>216</sup> relataram que a totalidade das 26 cepas testadas produziram esta enzima. Por outro lado, Fotedar e Al-Hedaithy<sup>74</sup> observaram que a maioria dos 87 isolados testados (68%) não produziram proteinase.

Os relatos com relação à produção de exoenzimas são ainda bastante escassos na literatura, e ainda não existe um consenso com relação à produção de exoenzimas por *C. dubliniensis*. Hannula et al.<sup>90</sup> sugeriram que a diferença entre os resultados encontrados na literatura pode ser devido ao pequeno número de isolados testados nos estudos e diferenças na procedência destas amostras. Concordamos com estes autores, principalmente considerando que a taxa de isolamento desta

espécie foi muito pequena na maioria dos estudos. Apesar do nosso estudo ter detectado apenas um isolado desta espécie, acreditamos que a verificação deste fator de virulência poderia trazer alguma contribuição para os poucos dados disponíveis na literatura.

### **6.7 Patogenicidade experimental**

O presente estudo sobre a patogenicidade experimental em modelo murino objetivando comparar a virulência de *C. dubliniensis* com outras espécies do gênero *Candida* revelou que *C. albicans* foi a espécie mais virulenta (mortalidade=9/20), seguida por *C. tropicalis* (mortalidade 3/20), *C. dubliniensis* (mortalidade 1/20) e *C. krusei* (mortalidade 0/20). Os resultados obtidos para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* estão de acordo com estudo anterior que visou classificar o grau de virulência para camundongos de diferentes espécies de *Candida*<sup>19</sup>. Contudo, relatos sobre a virulência comparativa de *C. dubliniensis* com espécies não-*albicans* não são encontrados na literatura.

O estabelecimento desta comparação, particularmente em relação a *C. tropicalis* é relevante, já que *C. tropicalis* vem sendo frequentemente citada na literatura como uma espécie não-*albicans*

emergente em quadros de candidemia em diferentes populações. Vigoroux et al.<sup>217</sup> relataram uma inesperada alta incidência de *C. tropicalis* relacionada a candidemia em pacientes com doenças hematológicas em um hospital francês. Relatos semelhantes atribuindo casos de candidemia em hospitais são encontrados em Taiwan<sup>115</sup>, Brasil<sup>55</sup> (Colombo et al., 2007), Bélgica<sup>118</sup> e Singapura<sup>48</sup>. Kremery e Barnes<sup>114</sup> relataram que *C. tropicalis* é frequentemente associada à mortalidade em pacientes com candidemia (40-70%). Outro aspecto relevante é que isolados de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol<sup>114</sup> e caspofungina<sup>156</sup> têm sido encontrados. Em nosso estudo, *C. dubliniensis* mostrou-se menos virulenta para camundongos em relação a *C. tropicalis*. Assim, a classificação em relação à virulência de acordo com este estudo seria: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*.

Dois estudos anteriores compararam a virulência de *C. albicans* e *C. dubliniensis* utilizando modelo de infecção sistêmica em camundongos e sugeriram que animais infectados por *C. dubliniensis* sobreviveram mais tempo do que aqueles infectados por *C. albicans*<sup>82,218</sup>. O primeiro estudo incluiu 4 cepas de *C. dubliniensis* e apenas 1 de *C. albicans* e acompanhou os animais (camundongos fêmeas) por 8 dias após inoculação. O outro estudo comparou a inoculação de 7 cepas de *C. dubliniensis* e 7 cepas de *C. albicans*, observando a mortalidade de camundongos machos até 28 dias e

verificou diferença mais marcante e estatisticamente significativa em relação ao estudo anterior.

Considerando os dois estudos encontrados na literatura, acreditou-se que um aprofundamento focando as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* que pudesse ser confrontado com os relatos anteriores seria importante. Desta forma, esta parte do estudo foi delineada no sentido de incluir um total de 20 animais em cada grupo de estudo, sendo 10 machos e 10 fêmeas, analisando a virulência de 4 isolados clínicos e 1 cepa padrão de cada espécie a ser testada. A inclusão de animais machos e fêmeas em igual número foi considerada para evitar interferências relacionadas ao gênero. O inóculo de cada espécie fúngica utilizado foi o mesmo adotado nos estudos anteriores ( $10^6$  células/animal), assim como o método de inoculação realizado. Nossos resultados foram similares aos observados por Vilela et al.<sup>218</sup>, sendo que os animais inoculados com *C. dubliniensis* tiveram tempo de sobrevivência significativamente mais longo quando comparado com *C. albicans*. Vale ressaltar que os resultados encontrados foram efetivamente diferentes nos dois grupos sendo que em média *C. albicans* foi 8,67 vezes mais virulenta para camundongos em relação a *C. dubliniensis*. Este valor é muito superior ao relatado anteriormente por Gilfillan et al.<sup>82</sup>. (1,5-2,0 vezes).

Outra observação interessante além da mortalidade é que no grupo de animais inoculados com *C. dubliniensis*, nenhum dos camundongos

apresentou alterações de postura ou de comportamento (movimentações circulares, cabeça inclinada para o lado). As mesmas observações foram registradas para o grupo inoculado com *C. krusei* espécie que não apresentou virulência neste modelo experimental. Nos grupos inoculados com *C. albicans* e *C. tropicalis*, alguns animais apresentaram a cabeça inclinada para o lado, o que sugere comprometimento do sistema nervoso central<sup>7</sup>. Alguns animais inoculados com *C. albicans* apresentaram-se muito agitados com movimentação em círculos, o que foi também relatado por Vilela et al.<sup>218</sup> os quais sugerem como sinal de envolvimento do sistema nervoso central.

Segundo Stokes et al.<sup>196</sup>, a menor virulência de *C. dubliniensis* parece ser multifatorial, no entanto, esta é pelo menos parcialmente relacionada à menor capacidade de aderir e invadir o tecido epitelial oral e gastrointestinal e associado à capacidade limitada de produzir hifas *in vivo*. Estas características fariam com que *C. dubliniensis* tivesse um *clearance* por fagócitos mais rápido em relação a *C. albicans*. Gilfillan et al.<sup>82</sup>, testando algumas condições de indução de hifas, verificaram que este fenômeno é mais lento em *C. dubliniensis* quando comparada a *C. albicans*. Outros estudos testaram meios de cultura com composições diferentes utilizando soro fetal bovino e também verificaram que a indução de hifas era menor em *C. dubliniensis*<sup>196,218</sup>. As razões para esta divergência ainda não estão

completamente elucidadas, contudo sugere-se que *C. dubliniensis* possa ter uma falha nos sistemas de detecção e sinalização ambiental envolvidos na indução de hifas<sup>196</sup>. Além disso, os genes hifa-específicos codificados nos genomas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* são significativamente diferentes com a ausência dos genes *SAP5*, *SAP6* e *HYR1* e divergência de genes como o *HWP1* no genoma de *C. dubliniensis*<sup>142</sup>.

Nos achados histopatológicos de estudos anteriores, esta característica fica evidente já que *C. dubliniensis* é encontrada quase sempre na forma leveduriforme nos órgãos infectados enquanto *C. albicans* mais frequentemente na forma micelial<sup>218</sup>.

Quanto à capacidade de disseminação, Vilela et al.<sup>218</sup> utilizando metodologia de infecção sistêmica observaram que pulmão, rim e cérebro foram acometidos. Por outro lado, modelo experimental de disseminação a partir do trato gastrointestinal em camundongos jovens (6-9 dias) mostrou observaram acometimento do fígado e do rim<sup>196</sup>. Estudo utilizando modelo com células epiteliais *in vitro* relatou que *C. dubliniensis* permaneceu leveduriforme, formando uma camada não-invasiva ao longo do tecido epitelial, enquanto que *C. albicans* produziu hifas abundantes e as células ficaram aderidas ao epitélio, penetrando o tecido em profundidade<sup>196</sup>.

Segundo Stokes et al.<sup>196</sup>, apesar do modelo de infecção sistêmica por inoculação ultrapassar a barreira normal para infecção

fornecida pelo trato gastrointestinal, este modelo experimental é importante pelo fato de que microrganismos que colonizam o trato gastrointestinal podem funcionar como reservatórios para infecção sistêmica, especialmente em pacientes com neutropenia.

Outro aspecto que acreditamos ser de relevância neste contexto seria estabelecer para *C. dubliniensis* a cinética de infecção, utilizando modelo murino, e comparar estes resultados com as outras espécies de *Candida* em estudo.

Observou-se que *C. dubliniensis* foi isolado em número muito elevado a partir do pulmão após 6 horas da inoculação, sendo que esta característica também foi observada para *C. albicans*. Esta tendência de acometimento rápido e persistente do pulmão é confirmado por achados histológicos de estudo anterior<sup>218</sup> onde foi observada alterações teciduais e células fúngicas ao exame histopatológico 5 dias após inóculo.

De acordo com nossos resultados, *C. dubliniensis* apresentou grande capacidade de disseminar-se para o rim quando comparado com outras espécies. Além disso, nos outros grupos observou-se diminuição no número de células fúngicas isoladas com o tempo enquanto que para *C. dubliniensis* este número sofreu elevação constante chegando ao seu pico no 21<sup>o</sup> dia, sem diminuição nas contagens de UFC/g rim. Estudos

histopatológicos anteriores mostraram também acometimento do rim<sup>196,218</sup> com presença de hemorragia<sup>218</sup>.

Houve isolamento de todas as espécies testadas a partir do baço dos animais e eliminação total para *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*, mas não para *C. albicans*. *C. dubliniensis* também foi detectada no fígado e cérebro dos animais, também com queda de UFC/ g órgão mais lenta em comparação com as demais espécies testadas. Um dado que chama atenção é que as contagens de UFC/ g cérebro tiveram aumento entre o 14º e 21º dia de avaliação. Análise histopatológica também revelou lesões cerebrais em animais inoculados com *C. dubliniensis*<sup>218</sup>.

Analisando os dados de cinética de infecção, observa-se que *C. tropicalis* e *C. krusei* apresentam as contagens em queda em relação ao tempo, sendo que ao 21º dia (com exceção do rim para *C. tropicalis*) as contagens de UFC/g órgão foram zeradas. Para *C. albicans* este gráfico mostra também redução das contagens visivelmente mais lenta do que para *C. tropicalis* e *C. krusei*, não chegando aos valores nulos no 21º dia de avaliação. Tendência particular é observada para *C. dubliniensis* onde existe *clearance* no baço, chegando a zero após 21 dias e queda acentuada das contagens para o pulmão, inicialmente apresentando contagens muito elevadas em relação aos demais grupos. No entanto, dados obtidos para o fígado e em particular para o rim chamam atenção. No rim, houve aumento

constante sem diminuição, chegando a contagens elevadas ao 21º dia, inclusive maiores do que as atingidas por *C. albicans* em todos os períodos de avaliação. Por outro lado, as contagens do fígado também não diminuíram como nos padrões das outras espécies estudadas. Desta forma, os resultados sugerem que *C. dubliniensis* tem uma capacidade maior de persistir na infecção sistêmica, em particular no rim e no fígado.

Assim, os nossos resultados associados aos relatos anteriores nos levam a pressupor que *C. dubliniensis* teria menor capacidade de colonização/infecção do tecido epitelial oral e gastrointestinal, taxa significativamente menor de disseminação a partir do trato gastrointestinal<sup>196</sup> em relação a *C. albicans*, contudo uma vez encontrando a circulação sangüinea teria uma capacidade aumentada de levar a infecção sistêmica persistente. Mais estudos, incluindo avaliações histopatológicas de infecções pelas diferentes espécies, e em particular do rim e do fígado após 21 ou mais dias após a inoculação de *C. dubliniensis* são necessários para estabelecer os reais danos teciduais e possíveis conseqüências destes achados.

## 8 REFERÊNCIAS\*

- 1 Acikgoz ZC, Sancak B, Gamberzade S, Misirlioglu M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses* 2004; 47:393-6.
- 2 Al Hedaithy SSA. The yeast species causing fungemia at a university hospital in Riyadh, Saudi Arabia, during a 10-year period. *Mycoses* 2002; 46:275-80.
- 3 Al Mosaid AA, Sullivan D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(10):4787-9.
- 4 Al Mosaid A, Sullivan D, Salkin IF, Shanley D, Coleman D. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(1): 323-7.
- 5 Al-Sweih N, Ahmad S, Khan ZU, Khan S, Chandy R. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ-tube positive *Candida* isolates in a maternity hospital in Kuwait. *Mycoses* 2005; 48:347-51.

---

\* Baseado em:

International Comitê of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

- 6 Aldred MJ, Addy M, Bagg J, Finlay I. Oral health in the terminally ill: a cross-sectional pilot survey. *Spec Care Dent.* 1991; 11(2): 59-62.
- 7 Almeida NQ. Influência da produção de hialuronidase, proteinase, condroitin-sulfatase e fosfolipase por algumas espécies de *Candida* sobre a patogenicidade para camundongos. [Tese de livre-docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 1991.
- 8 Alves SH, Da Matta DA, Azevedo AC, Loreto ES, Boff E, Santurio JM et al. *In vitro* activities of new and conventional antimycotics against fluconazole-susceptible and non-susceptible Brazilian *Candida* spp. isolates. *Mycoses* 2006; 49:220-5.
- 9 Alves SH, Horta JA, Milan EP, Vainstein MH, Colombo AL. Carbohydrate assimilation profiles of Brazilian *Candida dubliniensis* isolates based on ID 32C system. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2005;47(2): 109-11.
- 10 Alves SH, Loreto ES, Linares CE, Silveira CP, Scheid LA, Pereira DIB, Santurio JM. Comparison among tomato juice agar with other three media for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2006; 48(3): 199-21.
- 11 Alves SH, Milan EP, Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO, et al. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Microbiol Infect Dis.* 2001; 39:165-8.

- 12 Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio MJ, Colombo AL. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 43:85-6.
- 13 Alves SH, Oliveira LTO, Santurio JM. A importância de *Candida dubliniensis* no diagnóstico laboratorial das micoses oportunistas. *RBAS*. 2000; 32: 65-8.
- 14 Aly FZ, Blackwell CC, Mackenzie DAC, Weir DM, Clarke BF. Factors influencing oral carriage of yeasts among individuals with diabetes mellitus. *Epidemiol Infect*. 1992; 109:507-18.
- 15 Aly FZ, Blackwell CC. Mackenzie DAC. Weir DM. Identification of oral yeast species isolated from individuals with diabetes mellitus. *Mycoses* 1995; 38:107-10.
- 16 Amerongen AV, Veerman EC. Saliva - the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 2002; 8(1):12-22.
- 17 Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura Y, Masuhara T. Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriol*. 1990; 273(3):332-43.
- 18 Arendorf TM, Walker DM. *Candida albicans*: its association with dentures, plaque and oral mucosa. *J DASA*. 1980; 35:563-9.

- 19 Arendrup M, Horn T, Frimodt-Moller N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. *Infection* 2002; 30(5); 286-91.
- 20 Ariyawardana A, Panagoda GJ, Fernando HN, Ellepola ANB, Tilakaratne WM, Samaranayake LP. Oral submucous fibrosis and oral yeast carriage - a case control study in Sri Lankan patients. *Mycoses*. 2007; 50:116-20.
- 21 Back-Brito GN. Presença de *Candida*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e Enterobactérias na cavidade bucal de pacientes HIV positivos e indivíduos controle. [Dissertação]. São José dos Campos. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. Universidade Estadual Paulista, 2006.
- 22 Badoc C, Bertout S, Mallié M, Bastide. Genotypic identification of *Candida dubliniensis* isolated from HIV-patients by MLEE. *Med Mycol* 2001; 39:117-22.
- 23 Bagg J, Sweeney MP. High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Cancer* 2003; 17:477-81.
- 24 Ball K, Sweeney MP, Baxter WP, Bagg J. Fluconazole sensitivities of *Candida* species isolated from the mouths of terminally ill cancer patients. *Am J Hosp Palliat Care* 1998; 15: 315-9.
- 25 Barberino MG, Silva N, Rebouças C, Barreiro K, Alcântara AP, Netto EM et al. Evaluation of bloodstream infections by *Candida* in three

tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. *Braz J Infect Dis* 2006; 10(1):36-40.

- 26 Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol.* 1985; 131:1217-21.
- 27 Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJC, Lewis MAO. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(11): 4066-75.
- 28 Bautista-Muñoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C. Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 414-20.
- 29 Belazi M, Velegriaki A, Fleva A, Gidarakou J, Papanauum L, Baka D. et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. *Mycoses* 2005; 48(30): 192-6.
- 30 Bikandi J, San Millán R, Moragues MD, Cebas G, Clarke M, Coleman DC et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* by indirect immunofluorescence based on differential localization of antigens on *C. dubliniensis* blastospores and *Candida albicans* germ tubes. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2428-33.

- 31 Binolfi A, Biasoli MS, Luque AG, Tosello ME, Magaró HM. High prevalence of oral colonization by *Candida dubliniensis* in HIV-positive patients in Argentina. *Med Mycol.* 2005; 43: 431-7.
- 32 Blignaut E. Oral candidiasis and oral yeast carriage among institutionalized South African paediatric HIV/AIDS patients. *Mycopathologia* 2007; 163:67-73.
- 33 Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5):1838-42.
- 34 Bodey GP. Azole antifungal agents. *Clin Infect Dis* 1992, 14(Suppl 1): 161-9.
- 35 Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Durussel C, Addo M, Pagani J, Chave J et al. Cluster of oral atypical *Candida albicans* isolates in a group of human immunodeficiency virus-positive drug users. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1129-35.
- 36 Boktour M, Kontoyiannis DP, Hanna HA, Hachem R, Girgawy E, Bodey GP et al. Multiple-species candidemia in patients with cancer. *Cancer.* 2004; 101(8): 1860-65.
- 37 Borg-von Zepelin M, Wagner T. Fluorescence assay for the detection of adherent *Candida* yeasts to target cells in microtest plates. *Mycoses* 1995; 38: 339-47.

- 38 Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PHM. Use of amplified fragment length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis* J Clin Microbiol 2003; 41(4):1357-62.
- 39 Boucher H, Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. A novel group I intron in *Candida dubliniensis* is homologous to a *Candida albicans* intron. Gene 1996; 180:189-96.
- 40 Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Sofair AN, Huie S, Li R et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. Emerg Infect Dis. 2000; 6: 46.
- 41 Brasil, Ministério da Saúde. Estudo multicêntrico sobre a prevalência do diabete melito no Brasil. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2005/d10.htm>. Acesso em 18/02/2007, 17:11h.
- 42 Brasil, Ministério da saúde. Hanseníase –a situação da doença no Brasil. Disponível em [www.portalweb02.saude.gov.br](http://www.portalweb02.saude.gov.br). Acesso em 05/11/2005, 16:35h.
- 43 Brasil, Ministério da saúde. Taxa de incidência de neoplasias malignas. Disponível em [http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2005/d05\\_05uff.htm](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2005/d05_05uff.htm). Acesso em 18/02/07, 17:15h.

- 44 Brasil, Ministério da saúde. Taxa de mortalidade específica por neoplasias malignas. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2005/c10.def>, Acesso em 18/02/07, 17:14h.
- 45 Capriles CH, Mata-Essayag S, Pérez C, Colella MT, Roselló A, Olaizola C et al. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia* 2005; 160:227-34.
- 46 Carr MJ, Clarke S, O'Connell F, Sullivan DJ, Coleman DC, O'Connell B. First reported case of endocarditis caused by *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(6): 3023-6.
- 47 Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis.* 1997; 156: 777-83.
- 48 Chai YA, Wang Y, Khoo AL, Chan FY, Chow C, Kumarasinghe G, Singh K, Tambyah PA. Predominance of *Candida tropicalis* bloodstream infections in a Singapore teaching hospital. *Med Mycol.* 2007; 45(5):435-9.
- 49 Chan T. Fatal *Candida dubliniensis* septicemia in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 2005; 40: 1209-10.
- 50 Chavasco JK, Paula CR, Hirata MY, 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): 1-26.

- 51 Chávez RM, Borrell LN, Taylor GW, Ship JA. A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91(2):166-73.
- 52 Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL., Lafe K, Yarfitz SL et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(6): 2302-10.
- 53 Coleman DC, Sullivan DJ, Bennet DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: the emergence of a novel species: *Candida dubliniensis*. *AIDS* 1997; 11(5): 557-67.
- 54 Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol.* 1998; 36: 156-65.
- 55 Colombo AL, Guimarães T, Silva LR, de Almeida Monfardini LP, Cunha AK, Rady P, Alves T et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28(5):570-6.

- 56 Costa CR, Lemos JA, Passos XS, Araújo CR, Cohen AJ, Hasimoto LK et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of oral *Candida* isolates from HIV-infected patients in the antiretroviral therapy era. *Mycopathologia* 2006; 162: 45-50.
- 57 Darwazeh AMG, MacFarlane TW, Lamey P-J. The *in vitro* adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells (BEC) from diabetic and non-diabetic individuals after *in vivo* and *in vitro* application of nystatin. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26:233-6.
- 58 Darwazeh AMG, MacFarlane TW, McCuish A, Lamey P-J. Mixed salivary glucose levels and candidal carriage in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol Med.* 1991; 20:280-3.
- 59 Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D. Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17:79-84.
- 60 Dodds MWJ, Yeh C-K, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28:373-81.
- 61 Donnelly SM, 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.
- 62 Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jørgensen B, Wloch E. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25:411-5.

- 63 Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infect Dis.* 2003; 3:658-720.
- 64 Ellepola ANB, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 379-88.
- 65 Eraso E, Moragues MD, Villar-Vidal M, Sahand IH, González-Gómez N, Pontón J et al. Evaluation of the new chromogenic medium *Candida* ID 2 for isolation and identification of *Candida albicans* and other medically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9):3340-5.
- 66 Faggi E, Pini G, Campisi E, Martinell C, Difonzo E. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses* 2005; 48:211-5.
- 67 Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol.* 2000; 18(5):553-62.
- 68 Feio M, Sapeta P. Xerostomia em cuidados paliativos. *Acta Med Port.* 2005; 18:459-66.
- 69 Fernández JL, Rangel-Mayoral JF, Liso Rubio FJ. Revisión de la enfermedad de Hansen. *Farm Hosp* 2004; 28(2):123-9.

- 70 Fitzgerald DH, Coleman DC, O'Connell BC. Susceptibility of *Candida dubliniensis* to salivary histatin 3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(1): 70-6.
- 71 Fliess EL, Franceschini G, Ortiz MC. *In vitro* effect of *Mycobacterium leprae* suspensions on the polymorphonuclear neutrophils function of hanseniasis patients to *Candida albicans* and *Candida pseudotropicalis*. *Hansenol Int.* 1984; 9:3-9.
- 72 Fongsmut T, Deerochanawong C, Prachyabrued W. Intraoral *Candida* in Thai diabetes patients. *J Med Assoc Thai* 1998; 81(6): 449-52.
- 73 Fotedar R, Al Hedaithy SSA. *Candida dubliniensis* at a University Hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(5):1907-11.
- 74 Fotedar R, Al Hedaithy SSA. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* 2005; 48: 62-7.
- 75 Fotedar R, Al Hedaithy SSA. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ-tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. *Mycoses* 2004; 47: 150-5.

- 76 Gales AC, Pfaller MA, Houston AK, Joly S, Sullivan DJ, Coleman DC, Soll SR. Identification of *Candida dubliniensis* based on temperature and utilization of xylose and  $\alpha$ -metil-D-glucoside as determined with the API 20C AUX and Vitek YBS systems. J Clin Microbiol. 1999; 37(12): 3804-8.
- 77 Gee S, Joly S, Soll DR, Meis JFGM, Verweij PE, Polacheck I et al. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution *in vitro* and *in vivo*. J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 556-74.
- 78 Geerlings SE, Hoepelman AIM. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). FEMS Immunol Med Microbiol. 1999; 26: 259-65.
- 79 Ghannoum M, Abu Elteen KA. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. J Med Vet Mycol. 1986; 24: 407-13.
- 80 Giammanco GM, Pizzo G, Pecorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici ME. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17:89-94.
- 81 Gil-Lamaignere C, Muller FM. Differential effect of the combination of caspofungin against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida kefyr*. Antimicrob Agents 2004; 23(5): 520-3.

- 82 Gilfillan G, Sullivan D, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* 1998; 144: 829-38.
- 83 Goldenberg P, Franco LJ, Pagliaro H, Silva RS, Santos CA. Diabetes mellitus auto-referido no Município de São Paulo: prevalência e desigualdade. *Cad Saúde Publ.* 1996; 12(1): 37-45.
- 84 Goldenberg P, Schenkman S, Franco LJ. Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos. *Rev Bras Epidemiol.* 2003; 6(1): 18-28.
- 85 Gottfredsson M, Vredenburg JJ, Xu J, Schell WA, Perfect JR. Candidemia in women with breast carcinoma treated with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Cancer* 2003; 98(1): 24-30.
- 86 Graf B, Trost A, Eucker J, Göbel UB, Adam T. Rapid and simple differentiation of *Candida dubliniensis* from *C. albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004; 48: 149-51.
- 87 Guggenheimer J, Moore P, Rossie K, Myers D, Mongelluzzo MB, Block HM et al. Insulin-dependent diabetes mellitus and oral soft tissue pathologies: II. Prevalence and characteristics of *Candida* and candidal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000; 89(5): 570-6.

- 88 Gugnani HC, Becker K, Fegeler W, Basu S, Chattopadhyaya D, Baveja U et al. Oropharyngeal carriage of *Candida* species in HIV-infected patients in India. *Mycoses* 2003; 46:281-8.
- 89 Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison H, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2002; 42(2):1519-27.
- 90 Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kähkölä P, Pirinen S et al. Comparison of virulence factors of oral *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. *Oral Microbiol immunol.* 2000; 15: 238-44.
- 91 International Diabetes Federation (IDF). Diabetes e-Atlas: Estatísticas Mundiais do diabetes. Disponível em: [www.diabetes.org.br/imprensa/estatisticas/atlas2000.php](http://www.diabetes.org.br/imprensa/estatisticas/atlas2000.php); acesso em 18/02/07; 17:07h.
- 92 Irobi I, Schoofs A, Goossens H. Genetic identification of *Candida* species in HIV-positive patients using the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of its DNA. *Molec Cell Probes* 1999; 14: 401-6.
- 93 Iwen PC, Kelly DM, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. *Clin Infect Dis.* 1995; 20: 342-7.

- 94 Jabra-Rizk MA, Baqui AA, Kelley JF, Falkler WA Jr, Merz WG, Meiller TF. Identification of *Candida dubliniensis* in a prospective study of patients in the United States. J Clin Microbiol. 1999; 37(2): 321-6.
- 95 Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Enwoncu CO, Onwujekwe DI, Merz G, Meiller TF. Prevalence of yeast among children in Nigeria and the United States. Oral Microbiol Immunol. 2001; 16: 383-5.
- 96 Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI et al. 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(56): 2423-6.
- 97 Jabra-Rizk MA, Ferreira SMS, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of *Candida dubliniensis* and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. J Clin Microbiol. 2001; 39(12): 4620-2.
- 98 Jabra-Rizk MA, Johnson JK, Forrest G, Mankes K, Meiller TF, Venezia RA. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia at a large teaching hospital. Clin Infect Dis. 2005; 41: 1064-7.
- 99 Jensen SB, Pedersen AM, Reibel J, Nauntofte B. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. Support Care Cancer 2003;8(1):12-22.

- 100 Jobbins J, Bagg J, Parsons K, Finlay I, Add M, Newcombe RG. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease. *J Oral Pathol Med.* 1992; 21: 305-8.
- 101 Joly S, Pujol M, Rysz M, Vargas K, Soll DR. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:1035-44.
- 102 Jorge AOC, Koga CY, Gonçalves RC, Fantinato V, Unterkircher C S. 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: 279-85.
- 103 Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human  $\beta$ -defensin 1: high-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type 1 diabetics and nondiabetic controls. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(1): 90-6.
- 104 Kadir T, Pisitriciler R, Akyüz A, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: through analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil.* 2002; 29: 452-7.
- 105 Kamei K, Mc Cullough MJ, Stevens DA. Initial case of *Candida dubliniensis* infection from Asia: non mucosal infection. *Med Mycol* 2000; 38:81-3.

- 106 Karjalainen KM, Knuutila MLE, Käär M-L. Salivary factors in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am Acad Pediatr Dent.* 1996; 18(4): 306-11.
- 107 Kan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Simplified sunflower (*Helianthus annuus*) seed agar for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10: 590-2.
- 108 Kantarcioglu AS, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19: 44-8.
- 109 Kim JO, Garofalo L, Blecker-Shelly D, McGowan KL. *Candida dubliniensis* infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7): 3354-7.
- 110 Kirkpatrick WR, Lopes-Ribot JL, Mcatee RK, Patterson TF. Growth competition between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* under broth and biofilm growing conditions. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(2):902-4.

- 111 Kirkpatrick WR, Revankar SG, AcAtee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, Sanche SE, Cantu R, Rinaldi MG, Patterson TF. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROM agar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3007-12.
- 112 Koga-Ito CY, Unterkircher CS, Watanabe H, Martins CAP, Vidotto V, Jorge AOC. Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients. *Caries Res.* 2003; 37: 38-43.
- 113 Koga-Ito CY, Martins CAP, Jorge AOC. Estudo do gênero *Candida*. In: Jorge AOC. Princípios de Microbiologia e Imunologia. São Paulo: Santos, 2006.
- 114 Kremery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 2002; 50(4):243-60.
- 115 Kung H, Wang J, Chang S, Wang J, Sun H, Hsueh P, Chen Y. Community-onset candidemia at a university hospital 1995-2005. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007; 40:355-63.
- 116 Kurzai O, Heinz WJ, Sullivan DJ, Coleman DC, Frosch, M, Mühlischlegel FA. Rapid PCR test for discriminating between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* isolates using primers derived from

the pH-regulated PHR1 and PHR 2 genes of *C. albicans*. J Clin Microbiol. 1999; 37(5): 1587-90.

- 117 Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. Infect Immun. 1985; 49 (3): 571-5.
- 118 Lagrou K, Verhaegen J, Peetermans WE, De Rijdt T, Maertens J, Van Wijngaerden E. Fungemia at a tertiary care hospital: incidence, therapy, and distribution and antifungal susceptibility of causative species. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26(8): 541-7.
- 119 Leinberger DM, Schumacher U, Autenrieth IB, Bachmann TT. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. J Clin Microbiol. 2005; 43(10): 4943-53.
- 120 Mähneß 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; 46:55-61.
- 121 Manfredi M, Al-Karaawi Z, McCullough MJ, Hurel S, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol. 2002; 17: 181-5.

- 122 Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J Clin Microbiol. 1998; 36(6): 1634-41.
- 123 Mariano PL, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis* in Brazilian yeast stock collection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(4): 533-8.
- 124 Marot-Leblond A, Beucher B, David S, Nail-Billaud S, Robert R. Development and evaluation of a rapid latex agglutination test using a monoclonal antibody to identify *Candida dubliniensis* colonies. J Clin Microbiol. 2006; 44(10): 138-42.
- 125 Marriott D, Laxton M, Harkness J. *Candida dubliniensis* candidemia in Australia. Emerg Infect Dis. 2001; 7(3):479.
- 126 Marsh P, Martin M. Oral microbiology. 3<sup>a</sup> ed. London: Chapman & Hall; 1992.
- 127 Martin C, Roberts D, van der Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T et al. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. J Clin Microbiol. 2000; 38(10): 3735-42.
- 128 Martinez M, Lópes-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TH. Replacement of *Candida albicans* with *C. dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with fluconazole. J Clin Microbiol 2002; 40(9):3135-9.

- 129 Maxwell MJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Diekema DJ et al. Evaluation of Etest method for determining fluconazole and voriconazole MICs for 279 clinical isolates of *Candida* species infrequently isolated from blood. J Clin Microbiol. 2003; 41(3): 1087-90.
- 130 McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol. 1999, 37(20): 417-21.
- 131 McCullough MJ, Jorge JJ, Lejbkowsics F, Lefler E, Nassar F, Clemons KV et al. Genotypic differences of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* isolates related to ethnic/racial differences within the same geographic area. Mycopathologia 2004; 158: 39-41.
- 132 McCullough MJ, Ross B, Reade P. Characterization of genetically distinct subgroup of *Candida albicans* strains isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol. 1995; 22: 696-700.
- 133 Meiller T, Jabra-Rizk MA, Baqui AAMA, Kelley JI, Meeks VI, Merz WG et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-positive patients in the United States. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999; 88:573-80.
- 134 Meis JFGM, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siegert W, Verweij PE. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-

induced neutropenia and bone marrow transplantation. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5(1): 150-3.

- 135 Melkusová S, Lisalová M, Pavlik P, Bujdákofá H. The first clinical isolates of *Candida dubliniensis* in Slovakia. *Mycopathologia* 2005; 159: 369-71.
- 136 Melo NR, Taguchi H, Culhari VVP, Sano A, Fukushima K, Makoto M et al. *Candida dubliniensis* in a Brazilian family with an HIV 1-infected child: identification, antifungal susceptibility, drug accumulation and sterol composition. *Braz J Microbiol.* 2006; 37:237-43.
- 137 Metzgar D, Belkum A, Field D, Haubrich R, Wills C. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and post-treatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(8):2308-13.
- 138 Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* *Med Mycol.* 2001; 39: 185-93.
- 139 Milán EP, Colombo AL, Laet Sant'Ana P, Lewi D, Melo ASA. Primeiro isolamento de *Candida dubliniensis* no Brasil. Apresentado ao XI Congresso Brasileiro de Infectologia; 1999. São Paulo; 1999.
- 140 Milán EP, Laet Sant'Ana P, Melo ASA, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D, Colombo AL. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida*

- dublينيensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001; 41: 29-35.
- 141 Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubلينيensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Jpn J Infect Dis*. 2005; 58: 235-7.
- 142 Moran GP, Sanglard D, Donnely SM, Shanley DB, Sullivan DJ, Coleman DC. Identification and expression of multidrug transporters responsible for fluconazole resistance in *Candida dubلينيensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(7): 1819-30.
- 143 Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubلينيensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV-) infected and non-HIV infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41: 617-23.
- 144 Moreira TA. Panorama sobre a hanseníase: Quadro Atual e perspectiva. Secretaria de Saúde do Rio de Janeiro, v.1. p 1-16, 2003.
- 145 Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Pontón J. Isolation of *Candida dubلينيensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10: 25-31.

- 146 Mubareka S, Vinh DC, Sanche SE. *Candida dubliniensis* bloodstream infection: a fatal case in a lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2005; 7: 146-9.
- 147 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) / Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras: Norma Aprovada-Segunda Edição, Norma M27-A2 do NCCLS. Pennsylvania, Estados Unidos, 2002.
- 148 National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report. Data summary from January 1992- June 2001. *Am J Infect Control*. 2002; 29: 404-21.
- 149 Navas EAFA. Presença e suscetibilidade aos antifúngicos de isolados de *Candida* da cavidade bucal de pacientes hansenianos. [Dissertação]. São José dos Campos; Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 150 Navazesh M, Mulligan R, Pagoda J, Greenspan D, Alves M, Phelan J et al. The effect of HAART on salivary microbiota in the women's interagency HIV study (WIHS). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005, 100: 701-8.
- 151 Neppelenbroek KG, Campanha NG, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Seo RS, Pavarina AC. Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis* 2006, 12(3): 242-53.

- 152 Odds FC, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J Clin Microbiol. 1998; 6: 2869-73.
- 153 Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ, Stender H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol. 2001; 39(11): 4138-41.
- 154 Organização Mundial da Saúde (WHO). Global leprosy situation in 2003. Disponível em <http://whosea.org/leprosy/prevalence.htm>. Acesso em 05/11/2005, 16:17h.
- 155 Park S, Wong M, Marras SAE, Cross EW, Kiehn TE, Chaturved V et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* using a species-specific molecular beacon. J Clin Microbiol. 2000; 38(8): 2829-36.
- 156 Pasquale T, Tomada JR, Ghannoun M, Dipersio J, Bonilla H. Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. J Antimicrob Chemother. 2007 (epub ahead of print).
- 157 Perea S, López-Ribot JL, Wickes BI, Kirkpatrick W, Dib OP, Bachmann SP et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(6): 1695-703.
- 158 Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole

susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. Clin Microbiol Infect. 2004;10:11-23.

- 159 Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN et al. In vitro activities of voriconazole, posaconazole and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 76-83.
- 160 Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN. In vitro activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(3): 1068-71.
- 161 Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan DJ et al. In vitro susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. J Clin Microbiol. 1999; 37(3): 870-2.
- 162 Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M et al. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. J Clin Microbiol. 1999; 37(11): 3533-9.
- 163 Pinjón E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. Biochem Soc Transact. 2005; 33: 1210-4.

- 164 Pinjón E, Moran GP, Jackson CJ, Kelly SL, Sanglard D, Coleman DC, Sullivan DJ. Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(5): 2424-37.
- 165 Pinjón E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(7): 2093-5.
- 166 Polacheck I, Strahilevitz J, Sullivan D, Donnely S, Salkin IF, Coleman DC. Recovery of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Israel. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):170-4.
- 167 Polak A. Virulence of a *Candida albicans* mutants. *Mycoses* 1992; 35, 9-16.
- 168 Portela MB, Souza IPR, Costa EMMB, Hagler AN, Soares RMA, Santos ALS. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003; 42(12): 5925-7.
- 169 Price M, Cawson RA. Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1977; 15: 179-85.

- 170 Price M, Wikinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 28:7-4.
- 171 Quindós G, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP, Salgado J, Alonso-Vargas R, Rodrigo JM et al. *In vitro* susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemotherapy*. 2000; 46: 395-401.
- 172 Ramos-Zepeda R, Franco-Gamboa E et al. Phagocytosis of *Candida albicans* by polymorphonuclear leucocytes from patients with nodular lepromatous leprosy. *Soc Pathol Exot Filiales*. 1982; 75: 476-83.
- 173 Redding S, Bailey CW, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Fothergill AW, Rinaldi MG et al. *Candida dubliniensis* in radiation-induced oropharyngeal candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91: 659-62.
- 174 Reichart PA, Samaranayake LP, Samaranayake YH, Grote M, Pow E, Bheung B. High oral prevalence of *Candida Krusei* in leprosy patients in Northern Thailand. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4479-85.
- 175 Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(7): 2590-2.
- 176 Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 223-44.
- 177 Ruhnke M, Schmidt-Westerhausen A, Morschhäuser J. Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and

*Candida dubliniensis* in a patient with AIDS. J Antimicrob Chemother. 2000; 46: 291-5.

- 178 Salgado-Parreño FJ, Alcoba-Florez J, Arias A, Moragues MD, Quindós G, Pontón J et al. *in vitro* activities of voriconazole and five licensed antifungal agents against *Candida dubliniensis*: comparison of CLSI M27A-2, Sensititre YeastOne, disk diffusion and Etest methods. Microb Drug Resist 2006; 12(40): 246-51.
- 179 Salkin LF, Pruitt WR, Padhye AA, Sullivan DJ, Coleman DC, Pincus DH. Distinctive carbohydrate assimilation profiles used to identify the first clinical isolates of *Candida dubliniensis* recovered in the United States. J Clin Microbiol. 1998; 36(5): 1467.
- 180 Samaranayake LP, Mac Farlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. J Oral Pathol. 1998; 15:386-8.
- 181 Sancak B, Rex JH, Paetznick V, Chen E, Rodrigues J. Evaluation of a method for identification of *Candida dubliniensis* bloodstream isolates. J Clin Microbiol. 2003; 41(1): 489-91.
- 182 Sandvén P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. Acta Odontol Scand 1990; 48: 27-36.

- 183 Sant'ana PL, Milan EP, Martinez R, Queiroz Telles F, Ferreira MS, Alcantara AP et al. Multicenter Brazilian Study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97(2): 253-7.
- 184 Schörling SR, Kortinga HA, Froschb M, Mühlshlegel FA. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus infected individuals. Crit Rev Microbiol. 2000; 26(1): 59-68.
- 185 Sebti A, Kiehn T, Perlin D, Chatuvedi V, Wong M, Doney A et al. *Candida dubliniensis* at a cancer center. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1034-8.
- 186 Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization. J Clin Microbiol. 2002; 40(100): 4308-12.
- 187 Shen S, Samaranayake LP, Yip HK, Dyson JE. Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly, ethnic Chinese. Oral Dis. 2002; 8: 207-17.
- 188 Shimizu MT. Cinética de infecção por diferentes espécies de *Yersinia* em camundongos. [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 1983.
- 189 Ship JA, Vissink A, Challacombe SJ. Use of prophylactic antifungals in the immunocompromised host. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007; 103 (suppl 1): s6.e1-S6.e14.

- 190 Silva V, Cabrera M, Diaz MC, Abarca C, Hermosilla G. Prevalência de serotipos de *Candida albicans* em aislamentos de hemocultivo em Chile y primer caso de candidemia por *Candida dubliniensis*. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 46-51.
- 191 Silva GM, Silveira FRX, Pires MF. Adherence to HeLa cells, typing by killer toxins and susceptibility to antifungal agents of *Candida dubliniensis* strains. Braz Oral Res. 2007;21(1):87-90.
- 192 Sims CR, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner. Correlation between microdilution, E-test, and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol. 2006; 44(6):2105-08.
- 193 Somogyvari F, Doczi I, Serly J, Ahmad S, Nagy. Rapid discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using real-time polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2007, in press.
- 194 Staib F, Arastéh K. Chlamydospore formation on Staib agar. Observations made before *Candida dubliniensis* was described. Mycoses 2001; 44: 23-7.
- 195 Stenderup, A. Oral mycology. Acta Odontol Scand. 1990; 48: 3-10.
- 196 Stokes C, Moran GP, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans* Fung Gen Biol. 2007, in press.

- 197 Sullivan DJ, Coleman DC *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998; 36: 329-34.
- 198 Sullivan DJ, Haynes K, Bille J, Boerkin P, Rodero L, Lloyd S, Henman M, Coleman D Widespread distribution of oral *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol. 1997; 35: 960-4.
- 199 Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanlye DB et al. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. J Med Microbiol. 1996; 44: 399-408.
- 200 Sullivan DJ, Moran G, Donnely S, Gee S, Pinjon E, McCartan B et al. *Candida dubliniensis*: An update. Rev Iberoam Micol. 1999; 16:72-6.
- 201 Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res. 2004; 369-76.
- 202 Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC *Candida dubliniensis* sp. nov: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995; 141: 1507-21.
- 203 Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG. Clinically significant fungi. Baltimore: Williams & Wilkins, 1998.

- 204 Sweeney MP, Bagg J, Baxter WP, Aitchison TC. Oral disease in terminally ill cancer patients with xerostomia. *Oral Oncol.* 1998; 34: 123-6.
- 205 Tan AL, Wang GCY, Chiu YW. *Candida dubliniensis* infection, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8:445-6.
- 206 Tay ST, Chai HC, Na SL, Ng KP, Soo-Hoo TS. Molecular subtyping of clinical isolates of *Candida albicans* and identification of *Candida dubliniensis* in Malaysia. *Mycopathologia.* 2005; 159: 325-9.
- 207 Tekeli A, Akan OA, Koyuncu E, Dolapci I, Usyal S. Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001 and 2004. *Mycoses* 2006; 49: 60-4.
- 208 Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. *Mycoses* 2004; 47:315-8.
- 209 Tekeli A, Koyuncu E, Dolapci I, Guven GS, Sahin GO, Uzun O. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of Turkish HIV-positive patients. *Mycoses* 2005; 48: 197-201.
- 210 Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(4): 1599-1608.

- 211 Tsuruta R, Oda Y, Mizuno H, Hamada H, Nakahara T, Kasaoka S, Maekawa T. *Candida dubliniensis* isolated from the sputum of a patients with end-stage liver cirrhosis. Intern Med. 2007; 46(9):597-600.
- 212 Us E, Cengiz SA. Prevalence and phenotypic evaluation of *Candida dubliniensis* in pregnant women with vulvovaginal candidosis in a university hospital in Ankara. Mycoses 2006; 50:13-20.
- 213 Vargas K, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals J Clin Microbiol. 2002; 40(2): 341-50.
- 214 Vidotto V. Manual de Micologia Médica. Riberão Preto: Tecmedd, 2004.
- 215 Vidotto V, Mantoan B, Pugliese A, Pontón J, Quindós G, Aoki S et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. Rev Iberoam Micol. 2003; 20: 52-4.
- 216 Vidotto V, Pontón J, Aoki S, Quindós G, Mantoan B, Pugliese A et al. Differences in extracellular enzymatic activity between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* isolates. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 70-4.

- 217 Vigouroux S, Morin O, Moreau P, Harousseau J, Milpied N. Candidemia in patients with hematologic malignancies: analysis of 7 years' experience in a single center. *Haematologica* 2006; 91(5):717-8.
- 218 Vilela MMS, Kamei JK, Sano A, Tanaka R, Uno J, Takahashi I et al. Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*. *Med Mycol.* 2002; 40: 249-57.
- 219 Vitkov L, Weitgasser R, Lugstein A, Noack MJ, Fuchs K, Krautgartner WD. Glycaemic disorders in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med.* 1999; 8: 406-9.
- 220 Yang CW, Barkham TMS, Chan FY, Wang Y. Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(3): 472-4.
- 221 Yoneyama K, Koshida Y, Toriumi F, Murayama T, Toeda H, Imazu Y et al. Examination of the safety of docetaxel/cyclophosphamide combination therapy for advanced recurrent breast cancer. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2006; 33(10): 1525-7.
- 222 Yu DT, Seger DL, Peterson JF, Numar RN, Bates DW. Fluconazole for empiric antifungal therapy in cancer patients with fever and neutropenia. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 1-10.
- 223 Williams DW, Lewis MAO. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Dis.* 2000; 6:3-11.

- 224 Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey P-J. Factors affecting the adhesion of *Candida albicans* to epithelial cells of insulin-using diabetes mellitus patients. J Med Microbiol. 2000; 49: 291-3.
- 225 Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey P-J. Oral carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. Diabet Med. 1999; 16: 675-9.
- 226 Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey P-J. The influence of antifungal drugs on virulence properties of *Candida albicans* in patients with diabetes mellitus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001; 91: 317-21.
- 227 Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM, Lamey P-J. Isolation of *C. dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. J Oral Pathol Med. 2000; 29: 86-90.
- 228 Willis AM, Coulter WA, Fulton CR, Hayes JR, Bell PM, Lamey PJ. Oral candidal carriage and infection in insulin-treated diabetic patients. Diabetic Med. 1999; 16: 675-9.
- 229 Wirshing S, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhäuser J. *MDR1*-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(12): 3416-21.
- 230 Wortington HV, Eden OB, Clarkson JE. Interventions for preventing oral candidiasis for patients with cancer receiving treatment. Cochrane Database Syst Rev. 2004; (4) CD003807.

Apêndice 1 –Tabela 3 - Resultados individuais obtidos na avaliação da cinética de infecção de *C. dubliniensis* em relação a outras espécies de *Candida* (valores em unidades formadoras de colônia por grama do órgão; UFC)

Órgãos	Espécies			
	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. albicans</i>
Valores em UFC				
<b>BAÇO</b>				
6 horas	24720	61260	3780	102450
3 dias	2520	23280	4380	33735
7 dias	240	4860	390	13950
14 dias	0	0	120	1050
21 dias	0	0	0	825
<b>FÍGADO</b>				
6 horas	50730	6340	61500	672600
3 dias	16230	24380	53190	208245
7 dias	126300	4930	17160	13650
14 dias	51075	0	70980	435
21 dias	0	0	41490	570
<b>CÉREBRO</b>				
6 horas	1020	1110	2580	3225
3 dias	93570	9930	960	795
7 dias	9090	510	270	900
14 dias	960	210	270	165
21 dias	0	30	1905	150
<b>RIM</b>				
6 horas	12420	23550	7020	111300
3 dias	52620	2070	4740	20010
7 dias	451500	450	35760	209365,5
14 dias	2796030	60	1512000	316710
21 dias	5182,5	0	5855010	19020
<b>PULMÃO</b>				
6 horas	3720	8850	34202250	101505
3 dias	2010	60	20010	10815
7 dias	1500	30	690	345
14 dias	0	3210	7050	2055
21 dias	0	0	255	2220

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP



**CERTIFICADO**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 056/2001-PH/CEP, sobre "Fatores de virulência, patogenicidade experimental, suscetibilidade aos antifúngicos e variabilidade genética em amostras de *Candida dubliniensis* e outras espécies do gênero *Candida*", 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 pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 02 de outubro de 2001.

Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo B – Certificado de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – São José dos Campos – SP 13506-900 – F (12) 263.9111 – FAX (12) 263.9122



Comitê de Ética em Pesquisa  
Envolvendo Seres Humanos

São José dos Campos, 14 de março de 2007.

Ofício nº 016/07 – CEP

Prezado(a) Sr.(a)	CRISTIANE YUMI KOGA ITO
Projeto	Fatores de virulência, patogenicidade experimental, suscetibilidade aos antifúngicos e variabilidade genética em amostras de <i>Cândida dubliniensis</i> e outras espécies do gênero <i>Candida</i>
<b>PARECER</b>	
Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a <b>ALTERAÇÃO DO TÍTULO</b> , passando para " <b>Cândida dubliniensis: Prevalência em pacientes com fatores predisponentes sistêmicos e patogenicidade experimental</b> ". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 066/2001-PH/CEP de 02/10/2001.	

Atenciosamente,

Profa. Dra. **BUELY CARVALHO MUTTI NARESSI**

Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

Anexo C – Certificado de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**CERTIFICADO**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 081/2003-PH/CEP, sobre: "Fatores de virulência e suscetibilidade aos antifúngicos em isolados de *Cândida* spp. da cavidade bucal de pacientes sob quimioterapia", 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 pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 31 de outubro de 2003.

Prof. Dr. Suely Carvalho Mutti Naresse  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo 4 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



## CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 094/2003-PH/CEP, sobre "Presença e suscetibilidade aos antifúngicos de isolados de leveduras do gênero *Cândida* da cavidade bucal de pacientes com diabetes do tipo I e II", 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 pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de novembro de 2003.

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Suely Carvalho Mutti Naressi".

Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Anexo 5 - Certificado de aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP



**CERTIFICADO**  
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 021/2005-PH/CEP, sobre "Produção de exoenzimas e suscetibilidade aos antifúngicos de isolados de *Cândida spp*, de pacientes com hanseníase", 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 pelo Comitê de Ética em Pesquisa

São José dos Campos, 18 de MAIO de 2005.



---

Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Neresini  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

KOGA-ITO, C.Y. ***Candida dubliniensis*: Prevalence in the oral cavity of diabetes, breast cancer and leprosy patients.** [Tese de Livre-docência]. São José dos Campos: São José dos Campos Dental School, São Paulo State University, 2008.

## ABSTRACT

*The purpose of this study was to evaluate the presence of C. dubliniensis among Candida oral isolates obtained from Brazilian patients with type I (n=39) and II (n=36) diabetes mellitus, leprosy (n=38) and under chemotherapy for breast cancer (n=30), and respective age/sex/oral conditions-paired control were analyzed. A total of 479 isolates previously submitted to phenotypical tests (germ tube formation, hyphae/pseudohyphae/chamidoconidea production, carbohydrate fermentation and assimilation) and identified as C. albicans/C. dubliniensis were included in the study. The existence of C. dubliniensis among the isolates was analyzed by a validated multiplex PCR protocol. Also, experimental pathogenicity study was carried out with mice in a systemic infection model, aiming to compare the virulence and infection kinetics of C. dubliniensis with the other species of Candida. One isolate of C. dubliniensis (0.002%) was detected among the oral isolates from control group. This species was not found among the isolates from the other patients. C. dubliniensis was less virulent to mice in relation to C. albicans and C. tropicalis and more virulent than C. krusei. The study on infection kinetics showed persistent infection in kidney and liver even 21 days after the inoculation of C. dubliniensis. It could be concluded that the detection of C. dubliniensis among the clinical isolates was low and observed only in control group. C. dubliniensis was less virulent than C. albicans and C. tropicalis and caused prolonged infection in kidney and liver.*

Key-words: *Candida dubliniensis*, chemotherapy, diabetes, cancer, pathogenicity.