
FREQÜÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS NA MUCOSA BUCAL DE USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTÁRIAS

Andréia Borges Coutrim,¹ Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes,¹ Fabiana Cristina Pimenta,¹ Théo Rodrigues Costa,¹ Márcio Rodrigues Costa¹ e Maria do Rosário Rodrigues Silva¹

RESUMO

O uso de próteses dentárias totais tem sido correlacionado com o aumento de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal. As características adquiridas por isolado de *Candida albicans* servem como um marcador epidemiológico. Neste trabalho foram coletadas amostras de 57 indivíduos portadores de próteses dentárias totais e de 30 indivíduos dentados, cultivadas em ágar Sabouraud dextrose. As leveduras isoladas foram identificadas através de produção de tubo germinativo e clamidósporos, além de provas bioquímicas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Isolaram-se 75,4% (43/57) leveduras em portadores de próteses dentárias totais e 26,7% (8/30) em indivíduos dentados, havendo um predomínio de *Candida albicans* nos dois grupos estudados. Através da técnica de morfotipagem foi observado o predomínio do morfotipo 5330 em 40,5% (17/43) dos isolados obtidos dos usuários de próteses e do morfotipo 0000 em 37,5% (3/8) nos isolados do grupo de dentados, o que mostra haver diferenças nas características morfológicas exibidas pelos dois grupos.

UNITERMOS: *C. albicans*. Próteses dentárias. Morfotipos.

INTRODUÇÃO

A boca possui uma microbiota própria e a maioria de seus componentes não é capaz de colonizar qualquer outro local do corpo humano. As leveduras integram-se a outros microrganismos e a compatibilidade da coexistência dessa população microbiana, desde o nascimento, é analisada através de mecanismos imunológicos, de processos de adaptação e

¹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás.

Endereço para correspondência: Rua Delenda Rezende de Melo eq. com 1ª Avenida, Setor Universitário. Caixa Postal 131, CEP 74605-050, Goiânia, GO.

Recebido para publicação em 12/6/2000. Revisto em 28/12/2000. Aceito em 29/12/2000.

readaptação contínuos dos quais se estabelece vínculo biológico entre o organismo e os microrganismos que ele abriga (24).

Com o aparecimento dos elementos dentários surgem novas regiões para o desenvolvimento de microrganismos adaptados às condições do meio gerado por estas estruturas. A partir do envelhecimento do hospedeiro algumas mudanças ocorrem na microbiota, primeiramente associadas a alterações fisiológicas das quais a perda dos dentes é sem dúvida de grande importância (10, 16).

O uso de próteses dentárias totais, como meio de recuperar a função mastigatória e a estética, é capaz de promover a transformação do ecossistema microbiano, propiciando o desenvolvimento de patologias bucais (8). A má adaptação e o uso contínuo de próteses pode atuar como um fator significativo, desencadeando um processo que provoca degeneração das glândulas salivares palatinas e diminuição do pH, o que favorece a proliferação de leveduras do gênero *Candida* (21). As leveduras uma vez estabelecidas na mucosa bucal produzem o aparecimento de áreas eritematosas denominadas "estomatite protética" (6, 7, 13).

A caracterização e individualização dos isolados de espécies de *Candida* podem ser obtidas por várias metodologias de tipagem que têm sido desenvolvidas diante da necessidade de informações de caráter epidemiológico e de relações filogenéticas (11, 20, 22). Esses métodos, embora possam apresentar limitações vinculadas à dificuldade de reprodutibilidade, são capazes de permitir uma discriminação das cepas (4, 17).

A morfotipagem é considerada um marcador fenotípico desenvolvido com base na observação das diferenças morfológicas de leveduras do gênero *Candida*. Phongpaichit et al. (19) propuseram inicialmente um modelo, passando a analisar a presença, o tamanho e a textura de franjas na borda da colônia, além da sua topografia de superfície, sendo que a formação de franjas é vista como um atributo fúngico de infecciosidade (5).

Com base nessas observações e em função da escassez de estudos a respeito da colonização microbiana de aparelhos protéticos, o objetivo do presente estudo é avaliar a ocorrência de leveduras na mucosa bucal de indivíduos portadores de próteses totais, caracterizando as leveduras encontradas por morfotipagem.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram selecionados para este estudo 87 indivíduos, divididos em dois grupos:

Grupo I – Constituído de 57 indivíduos portadores de próteses dentárias, indivíduos provenientes do abrigo para idosos da cidade de Goiânia (Asilo Vila Vida – OVG) e Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás;

Grupo II – Constituído de 30 indivíduos com dentes naturais, alunos voluntários da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás. Esse grupo-controle foi escolhido em razão das dificuldades de se encontrar idosos com ausência de próteses.

Coleta da amostra

Para a coleta da amostra de indivíduos portadores de próteses dentárias, procedia-se da seguinte maneira:

As próteses foram depositadas pelos indivíduos em placas de Petri, e sobre as placas vertia-se 10ml de solução salina, realizando-se a escovação para a retirada do material. A solução foi então transferida para um tubo de ensaio e levada para o laboratório.

No grupo de indivíduos não-usuários de próteses dentárias as amostras foram coletadas através de *swabs* esterilizados passados por toda a cavidade bucal e, posteriormente, depositados em solução salina esterilizada, contida em um tubo de ensaio.

Isolamento e identificação

As amostras foram semeadas assepticamente, em duplicata, com *swabs* esterilizados em ágar Sabouraud dextrose acrescido de 100mg/dl de cloranfenicol e mantidos à temperatura ambiente por até 10 dias, sendo que os isolados obtidos foram submetidos à caracterização macroscópica e microscópica.

A identificação das leveduras foi feita de acordo com Lodder (14) e Kreger van Rij (15).

Morfotipagem

O teste de morfotipagem foi feito de acordo com Phongpaichit et al. (19) & Hunter et al. (12). Os isolados de *Candida albicans* foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a 25°C. Suspensões do isolado correspondentes à escala 0,3 de McFarland foram semeadas em placas de ágar extrato de malte, fazendo estrias sobre a superfície de meio. As placas foram incubadas a 25°C por 10 dias, com a inoculação de cada cepa sempre realizada em duplicata. A leitura foi feita com base nos aspectos morfológicos da franja e na topografia da colônia, sendo codificada pela

seqüência de quatro dígitos, conforme modelo proposto por Hunter et al. (12) (Quadro I).

Quadro 1. Modelo de tipificação de morfotipos de *Candida albicans* segundo Hunter et al., 1989

Ordem dos dígitos		Valores
1ª Franja – Distribuição	Ausente	0
	Descontínua ($\leq 20\%$ da margem)	1
	Descontínua (20 a 50% da margem)	2
	Descontínua (60 a 90% da margem)	3
	Contínua, somente na periferia ou fios conspícuos em leque	5
2ª Franja – Comprimento	Contínua, com filamentos paralelos	7
	Ausente	0
	Igual ou menor a 2mm	2
3ª Franja – Textura	Entre 3 a 5mm	3
	Igual ou maior a 6mm	5
	Ausente	0
	Muito grosseira	1
4ª Superfície – Topografia	Grosseira	2
	Intermediária	3
	Fina	4
	Lisa	0
	Nodular	1
	Escavada	2
	Crateriforme	4
	Crateriforme com dobras e pregas	5
Dobras e pregas	6	
Pêlos	8	

Análise estatística

Foi utilizado teste X^2 ($\alpha = 0,01$) para comparar os resultados de incidência de leveduras em boca de indivíduos com próteses e dentados.

RESULTADOS

Das 57 amostras coletadas de usuários de prótese dentária total isolaram-se 75,4% (43/57) de leveduras e dos 30 indivíduos não-usuários de prótese foram isoladas 26,6% (8/30) amostras de leveduras. O número de isolados mostrou-se significativamente superior nos indivíduos usuários da prótese.

As características morfofisiológicas permitiram a identificação de *Candida albicans* em 97,7% dos isolados (42/43) dos portadores de próteses dentárias e um isolado foi classificado como *Candida krusei*. Nos indivíduos dentados, os oito isolados foram identificados como *Candida albicans*.

Verificou-se que as 42 cepas de *Candida albicans* isoladas de indivíduos usuários de prótese pertenciam a oito morfotipos diferentes, observando-se o predomínio do morfotipo 5330 (franja contínua em leque com 3 a 5mm, de textura intermediária e superfície lisa), enquanto nos oito isolados de *C. albicans* obtidos dos indivíduos dentados foram identificados quatro (4) morfotipos, com predominância do 0000 (sem franja e com superfície lisa) (Tabela 1).

Tabela 1. Morfotipos obtidos através de testes de morfotipagem das cepas de *Candida albicans* isoladas de indivíduos usuários de próteses totais e de dentados

Morfotipos	c/ Prótese	Dentados
0000	1 (2,4%)	3 (37,5%)
1230	-	2 (25,0%)
5320	3 (7,1%)	-
5330	17 (40,5%)	1 (12,5%)
5335	5 (11,9%)	-
5336	2 (4,8%)	-
5340	8 (19,0%)	2 (25,0%)
7330	6 (14,3%)	-

DISCUSSÃO

As leveduras do gênero *Candida* são tidas como fungos pertencentes à microbiota bucal do homem. Diversos fatores propiciam a passagem das cepas de *Candida* à condição de patógeno. O uso de prótese dentária é apontado como um dos fatores de patogenicidade mais descritos na literatura (3, 18, 25). Pela dificuldade de se encontrar idosos não portadores de próteses, optamos por comparar a incidência de leveduras em pacientes idosos, portadores de próteses, com a ocorrência em indivíduos jovens, verificando-se uma incidência de leveduras significativamente maior nos indivíduos do grupo I (portadores de próteses totais), quando comparado com o grupo II (dentados). Apesar da presença de leveduras nos pacientes com uso de próteses ter sido elevada, não podemos afirmar que essa diferença possa ter sido ocasionada somente pelo uso do aparelho, visto que a resposta imunológica e os hábitos alimentares dos dois grupos não foram levados em consideração. Arendorf & Walker (1) observaram que a colonização de

leveduras é significativamente maior nos casos de estomatite por próteses, se comparados à colonização da cavidade oral de pessoas dentadas, e que o uso noturno do aparelho aumenta o número desse microrganismo e a inflamação. Budtz-Jørgensen & Bertram (2) obtiveram cultura positiva para leveduras em 90% dos casos de indivíduos com próteses, enquanto apenas 40% do grupo-controle (indivíduos sem próteses) apresentaram-se com esses microrganismos. Estabeleceu-se, desta forma, uma relação entre a inflamação da mucosa em contato com próteses totais e a presença de leveduras do gênero *Candida*.

A predominância da espécie *Candida albicans* foi verificada em todos os grupos estudados. A alta incidência de *C. albicans* é verificada na maioria dos casos de candidíase relatados (9, 23).

A caracterização das leveduras do gênero *Candida*, isoladas da boca de indivíduos portadores de próteses dentárias totais, através de morfotipagem, mostrou uma predominância do morfotipo 5330 nos isolados de indivíduos que faziam uso de prótese dentária e do morfotipo 0000 nos isolados de indivíduos-controle, sendo que a formação de franjas por cepas de *Candida* foi observada em 97,6% dos isolados de portadores de próteses totais e em 62,5% dos isolados de indivíduos-controle. Através da morfotipagem, estudos epidemiológicos são feitos com alto grau de reprodutibilidade, tanto para os isolados recentes, como para os isolados mantidos em estoque no laboratório (12, 19). A presença de franjas contínuas de tamanho grande, semelhantes às observadas no nosso trabalho, foi também verificada no trabalho de Crockett et al. (6), no qual também se mostraram dominantes os casos de indivíduos usuários de próteses. A formação de franjas maiores nos isolados de *Candida albicans*, obtidos de indivíduos usuários de próteses dentárias totais do que nos isolados obtidos do grupo-controle, pode levar à interpretação de que a produção de franjas grandes é um morfotipo predominante em usuários de próteses. As franjas são apontadas como um atributo fúngico de infecciosidade. Hunter et al. (12) sugerem que esse sistema possa correlacionar um morfotipo distinto com a capacidade de virulência, em que franjas descontínuas estão presentes geralmente em isolados de infecções sistêmicas e fatais.

Os resultados obtidos permitiram a diferenciação de morfotipagem entre os dois grupos; entretanto, a associação de virulência e morfotipo não foi permitida, pois apesar da ocorrência de franjas ser maior em indivíduos que faziam uso de prótese, não foi realizado estudo com relação à presença de infecção. Estudos mais detalhados envolvendo patogenicidade em animal são necessários para afirmar a correlação de um determinado morfotipo de isolados de indivíduos portadores de próteses dentárias com a virulência do microrganismo.

SUMMARY

Frequency and characterization of *Candida albicans* in the mouth of people with dental prosthesis.

Dental prosthesis have been related to an increase of yeasts of the genus *Candida* in oral mucosa. The features acquired by each *Candida albicans* strain turn into an epidemiologic marker. We collected samples from 57 total dental prosthesis' users and from 30 natural teeth individuals, which were cultured in agar sabouraud dextrose media. Identification of yeasts was done by germ tube and chlamydo-spores production, besides assimilation carbon and nitrogen biochemical tests. We isolated yeasts in 75,4% (43/57) of the total dental prosthesis users and in 26,7% (8/30) of teetted people. The most prevalent yeast was *Candida albicans* in both groups. 5330 morphotype was observed in 40,5% (17/43) of samples from prosthesis users, being the most prevalent morphotype, and morphotype 0000 was found in 37,5% (3/8) of people with teeth, showing different morphological features between groups.

KEYWORDS: *C. Albicans*. Prosthesis. Morphotype.

REFERÊNCIAS

1. Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J* 147: 267-272, 1979.
2. Budtz-Jørgensen E, Bertram U. Denture stomatitis. I. The etiology in relation to trauma and infection. *Acta Odontol Scand* 28:71-92, 1970.
3. Budtz-Jørgensen E, Theilade E, Theilade J. Quantitative relationship between yeasts and bacteria in denture-induced stomatitis. *Scand. J Dent Res* 91:134-142, 1983.
4. Candido RC. *Candida albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos. São Paulo, 1991, 167 p. Tese de Doutorado, Escola Paulista de Medicina.
5. Caramalac DA. Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidos: tipagem das amostras de *Candida albicans*. São Paulo, 1995. 123p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas - USP.
6. Crockett DN, O'grady JF, Reade PC. *Candida* species and *Candida albicans* morphotypes in erythematous candidiasis. *Oral Surg Oral Med Pathol* 73:559-563, 1992.
7. Eliasson L, Dahlén G, Heyden G, Möller A. The predominant microflora of the palatal mucosa in na elderly island population. *Acta Odontol Scand Oslo* 50:163-169, 1992.
8. Emilson CG, Thorselius I. Prevalence of mutans streptococci and lactobacilli in elderly Swedish individuals. *Scand. J Dent Res* 96:14-21, 1988.
9. Finquielievich JL. Candidiasis sistemicas. VI Encuentro International sobre Paracoccidioidomycosis y II Simposio Iberoamericano sobre relación Hongo-Hospedero, Montevideo, Uruguay, 1996, 71.
10. Genco RJ, Mergenhagen SE. *Host-parasite interactions in periodontal diseases*. Washington, American Society for Microbiology, 1982.
11. Hunter PR. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. *Crit Rev Microbiol* 17:417-434, 1991.
12. Hunter PR & Fraser CAM, Mackenze DWR. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *J Med Microbiol* 28:85-91, 1989.

13. Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis – a review of the aetiology, diagnosis and management. *Australian Dental Journal, Sydney* 37:107-114, 1992.
14. Lodder J. *The Yeast: a taxonomic study*. 2 ed. Amsterdam, North-Holland, 1970:1385.
15. Kreger-Van Rij NJW. *The Yeast: a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1984:1982.
16. Maki Y, Takaesu Y. Age Specific Bacterial Flora in Saliva. *J Dent Res* 69:1106, 1990.
17. Odds FC, Brawner DL, Staudinger J, Magee PT, Soll DR. Typing of *Candida albicans* strains. *J Med Vet Mycol* 30 (Suppl 1):87-94, 1992.
18. Parvinen T. Stimulated salivary flow rate, pH and lactobacillus and yeast concentrations in persons with different types of dentition. *Scand J Dent Res* 92: 412-418, 1984.
19. Phongpaichit S, Mackenzie DR, Frasier C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping *Epidem. Inf* 99:421-428, 1987.
20. Scherrer S & Magee PT. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 54:226-241, 1990.
21. Shimizu K, Shimizu F, Kamiyamak. Microbiological studies on denture - induced stomatites in children *Pediatric Dentistry* 9:304-307, 1987.
22. Stevens DA, Odds FC, Sherer S. Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. *Rev Infect Dis* 12:258-266, 1990.
23. Sugizaki MF, Rhoden CR, Bombonnati DM, Montelli AC, Martinson ME, Lopes CAM. Prevalence and *in vitro* antifungal susceptibility of *Candida spp* isolated from clinical specimens in São Paulo, Brazil. *Rev Iberoamer Micol* 15:16-18, 1998.
24. Tyldesley WR. *Oral medicine*. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press, 24-48, 1981.
25. Wright PS, Clark P, Hardie JM. The prevalence and significance of yeasts in persons Wearing complete dentures with soft-lining materials. *J Den Res* 64:122-125, 1985.