

Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária

André Gasparetto¹, Melyssa Fernanda Norman Negri², Claudete Rodrigues de Paula² e Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^{3*}

¹Departamento de Odontologia, Universidade Estadual de Maringá. ²Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900, São Paulo, Brasil. ³Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: terezinha@email.com

RESUMO. Foi analisada a presença de espécies do gênero *Candida* na saliva de indivíduos distribuídos em três grupos: 1) com prótese e lesão; 2) com prótese sem lesão; 3) sem prótese e sem lesão, correlacionando com a capacidade de produção de biofilme em meio Sabouraud dextrose, contendo 8% de glicose, sendo determinada por leitura em espectrofotômetro. Dos 220 pacientes foram isoladas 92 leveduras: 24 (grupo 1), 24 (grupo 2) e 44 (grupo 3). Em 70% foi isolado *C. albicans* e 30% *C. non albicans*. A produção de biofilme em maior freqüência (64%) foi encontrada entre as leveduras *C. non albicans* e a maior porcentagem na produção de biofilme, quanto aos grupos de pacientes, foram 75, 63 e 57% correspondendo aos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Esses dados sugerem que a produção de biofilme das espécies do gênero *Candida* pode estar associada ao processo infecioso destes isolados.

Palavras-chave: biofilme, candidose bucal, levedura, prótese dentária.

ABSTRACT. Biofilm production by yeasts isolated from bucal cavity of prosthesis wearers. The presence of some species of *Candida* was analyzed in saliva of individuals with: 1) prostheses and lesions; 2) with prostheses without lesions; 3) without prostheses and without lesions, relating with the capacity for biofilm production in Sabouraud dextrose broth medium with 8% of glucose determinate by spectrophotometric method. A total of 92 yeasts were isolated from the 220 patients: 24 (group 1), 24 (group 2) and 44 (group 3). *C. albicans* was isolated in 70% of the cases and *C. non albicans* in 30%. The most frequent biofilm production (64%) was showed by *C. non albicans* yeasts and the patient groups who presented greater percent in biofilm production was 1, 2 and 3 corresponding to 75, 63 e 57% respectively. These data support that biofilm production may be associated with infectious process caused by *Candida* species.

Key words: biofilm, yeast, oral candidosis, dental prosthesis.

Introdução

As leveduras são de ocorrência comum na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, constituindo parte da microbiota do hospedeiro. *Candida albicans* é a espécie predominante na cavidade bucal, constituindo de 60 a 90% do total de isolados, seguido por *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Soustre *et al.*, 2004). *Candida* spp pode produzir infecções em determinadas situações, sendo candidose ou monilíase o processo infecioso mais comum causado por fungos deste gênero (Ramage *et al.*, 2002).

A transição dessas leveduras de comensal inócuo à parasita prejudicial depende tanto de fatores de

virulência do microrganismo como da susceptibilidade do hospedeiro (Jorge *et al.*, 2000).

O uso de artefatos protéticos, como próteses totais e aparelhos ortodônticos, favorecem significativamente a colonização e a consequente patogenicidade de leveduras na cavidade bucal. Outras características do hospedeiro como a presença de diabetes e outras doenças imunossupressoras, uso de antimicrobianos ou corticóides, idade, entre outras, favorecem a predisposição para estomatites (Soustre *et al.*, 2004).

Quadros com inflamação da mucosa bucal, na qual se assentam próteses totais são relativamente comuns entre seus usuários (Järvensivu *et al.*, 2004).

Grande número de leveduras é comumente encontrado na superfície palatal da dentadura, a qual atuaria como um reservatório de infecções (Silva et al., 2002).

O evento inicial na patogênese de doenças infecciosas é a adesão microbiana aos tecidos hospedeiros, mediada por macromoléculas denominadas adesinas, as quais são estruturas da superfície do microrganismo que interagem com receptores específicos nas células do hospedeiro (Bailley et al., 2000). Diferentes técnicas têm sido empregadas para avaliar o potencial de aderência em leveduras como a produção de biofilme em concentrações de glicose sobre materiais sintéticos (Shin et al., 2002).

Em face dessas considerações e levando-se em conta o aumento percentual da população usuária de artefatos protéticos bucais, bem como do aumento da diversidade de novos materiais empregados em sua confecção, é evidente a importância de novos estudos visando à compreensão dos fatores clínicos relacionados a pacientes portadores de prótese dentária total ou parcial.

O objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar leveduras provenientes de pacientes usuários e não usuários de prótese dentária e a seguir avaliar quanto à capacidade destes microrganismos em formar biofilme.

Material e métodos

Isolamento e identificação

O material biológico foi coletado, com auxílio de um *swab*, da cavidade bucal de 220 pacientes que procuraram atendimento odontológico de rotina em unidades básicas de saúde da Prefeitura Municipal de Maringá, Maringá, Estado do Paraná. Foi a seguir semeado em placas de Petri contendo Sabouraud dextrose agar (SDA) e incubados a 25°C por período de 5 dias. As colônias crescidas foram subcultivadas em ChroMág® Candida (Probac). A partir desse meio seletivo diferencial seguiu-se à identificação das leveduras segundo o método clássico (Kurtzman e Fell, 1998).

Os pacientes que tiveram cultura positiva para leveduras foram divididos em 3 grupos:

- 1) Pacientes com próteses com lesões;
- 2) Pacientes com prótese sem lesões;
- 3) Pacientes sem próteses e sem lesão – considerado o grupo controle.

Formação de biofilme

As leveduras foram cultivadas em SDA por 24h a 35°C, a partir desse crescimento foi preparado um

inóculo padronizado, contendo 3 mL de salina, sendo a turbidez comparável ao padrão da escala 4 de *Mac Farland*. A produção de biofilme foi avaliada por uma metodologia com leitura em espectrofotômetro (leitor automático para microplacas LP 400) de acordo com Shin et al. (2002), realizada em quadruplicata. Alíquotas de 100 µL de cada inóculo foram transferidas para microplacas de poliestireno para cultura (*Nunclon; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark*) e completadas com 400 µL de caldo triptose de soja contendo 8% de glicose. Após um período de incubação de 24h a 35°C, a cultura foi retirada cuidadosamente com pipeta Pasteur. Em cada orifício foi colocada água destilada para lavagem e remoção das leveduras fracamente aderidas. A camada de biofilme aderente ao poliestireno foi medida em espectrofotômetro a 450 nm e a transmitância obtida foi interpretada da seguinte maneira: até 20% considerada ausente quanto à produção de biofilme e superior a isso indicaria aderência irreversível das leveduras à placa.

Resultados

Foram avaliados 220 pacientes. A freqüência de cultura positiva para fungos foi de 42%, que corresponde a um total de 92 leveduras. Nos grupos de pacientes com prótese foram isoladas 24 leveduras e entre os pacientes não usuários de prótese foram isoladas 44 leveduras. Em 70% dos casos foi isolada *C. albicans* (64/92); 12% *C. tropicalis* (11/92); 8,6% *C. glabrata* (8/92); 4,3% *C. parapsilosis* (4/92); 3,3%, *C. krusei* (3/92); 2,2% *C. lusitaniae* (2/92). Relacionando os agentes isolados com as condições apresentadas pelos pacientes obtiveram-se os resultados que são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de leveduras encontradas em pacientes nos três grupos em estudo.

Espécie	Total	Prótese com lesão	Prótese sem lesão	Sem prótese
	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
<i>Candida albicans</i>	64 (70)	18 (75)	18 (75)	28 (64)
<i>Candida glabrata</i>	8 (8,6)	3 (12,5)	1 (4,8)	4 (8,5)
<i>Candida krusei</i>	3 (3,3)	1 (4,2)	1 (4,8)	1 (2,1)
<i>Candida lusitaniae</i>	2 (2,2)	1 (4,2)	0 (0)	1 (2,1)
<i>Candida parapsilosis</i>	4 (4,3)	0 (0)	0 (0)	4 (8,5)
<i>Candida tropicalis</i>	11 (12)	1 (4,2)	4 (19)	6 (13)
Total	92 (100)	24 (100)	24 (100)	44 (100)

Pode ser observado que nos três grupos em estudo *C. albicans* foi prevalente: 75% (18/24) em pacientes com prótese e lesão; 75% (18/24) em prótese sem lesão; 64% (28/44) sem prótese. Leveduras *C. albicans* representaram 25% (6/24) em pacientes com prótese e lesão; 25% (6/24) em pacientes com prótese sem lesão; 36% (16/44) em

pacientes sem prótese.

Do total de leveduras, 63% (58/92) das espécies foram positivas quanto à produção de biofilme. Proporcionalmente as espécies *C. não albicans* foram as mais capazes de aderir (18/28). Relacionando espécies com grupo de pacientes, observou-se que entre as leveduras de usuários de prótese, com ou sem lesão, *C. albicans* foi que aderiu mais. Já no grupo sem prótese as *C. não albicans* foram as que produziram mais biofilme (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação de produção de biofilme por *C. albicans* e leveduras *C. não albicans*, isoladas em pacientes com prótese e lesão; com prótese sem lesão e sem prótese.

Espécies	No. Biofilme positivo/ no. total (%)			
	Total	Prótese com lesão	Prótese sem lesão	Sem prótese
<i>Candida albicans</i>	40/64 (63)	15/18 (83)	13/18 (72)	12/28 (43)
<i>Candida não albicans</i>	18/28 (64)	3/6 (50)	2/6 (33)	13/16 (81)
Total	58/92 (63)	18/24 (75)	15/24 (63)	25/44 (57)

Discussão

A predisposição para o desenvolvimento de infecções fúngicas é mediada por múltiplos fatores. Para as infecções da cavidade bucal são considerados como mais comuns o estado de saúde do hospedeiro, o uso de artefatos protéticos, a colonização prévia da mucosa por microrganismos com potencial de virulência e a sua capacidade de aderência às células do hospedeiro (Alonso *et al.*, 2001; El-Azizi *et al.*, 2004). A cavidade bucal de indivíduos saudáveis é normalmente colonizada por diferentes espécies de leveduras, dentre outros microrganismos (Millian *et al.*, 2000).

C. albicans é a espécie mais freqüente, segundo Ramage *et al.* (2002), ocorre em 10 a 50% dos indivíduos saudáveis. Os dados do presente trabalho confirmam a maior prevalência de *C. albicans*, que correspondeu a 70% do total de leveduras isoladas dos pacientes saudáveis. A segunda mais isolada foi *C. tropicalis* 12%, o que está de acordo com Azevedo *et al.* (1999) que isolaram essa espécie tanto em pacientes com fatores predisponentes como em indivíduos saudáveis. Foram isoladas também *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae*, em menores quantidades, o que também é descrito em outros trabalhos (Robert *et al.*, 2000; Shin *et al.*, 2002).

É interessante salientar que a proporção de *C. albicans* sobre as outras espécies foi semelhante nos três grupos de pacientes (Tabela 1). Não foi comprovada diferença na associação de espécies isoladas de pacientes com prótese e lesão, prótese sem lesão e sem prótese, conforme relatado por Jorge *et al.* (2000).

Trinta por cento das leveduras isoladas neste trabalho puderam ser agrupadas como *C. não albicans*. Este fato deve ser ressaltado, tendo em vista que os profissionais tendem a centrar a preocupação exclusivamente em *C. albicans* e pouca importância tem sido dada a outras

espécies. O incremento desses microrganismos também está sendo reportado por outros autores. Segundo El-Azizi *et al.* (2004), na candidose bucal é cada vez mais freqüente o isolamento de *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii*.

A preocupação com as leveduras se dá em um momento que o gênero *Candida* emergiu para o sexto patógeno responsável por infecções hospitalares em geral (7,2%) e o quarto mais comum em infecções hospitalares da corrente sanguínea com destaque à importante substituição de *C. albicans* por outras espécies (Colombo *et al.*, 2000). Esse aumento tem sido atribuído à capacidade de aderência dessas leveduras (Tamura *et al.*, 2003). A relevância desses achados reside sobretudo na maior resistência observada entre as espécies *C. não albicans* aos antifúngicos (Azevedo *et al.*, 1999).

A aderência microbiana é um parâmetro importante na fisiopatogenia de várias doenças infecciosas como a candidíase ou candidose. Shin *et al.* (2002) empregaram uma metodologia simples, de fácil execução e alta reprodutibilidade, capaz de inferir a aderência de microrganismos em superfícies apolares. Esse protocolo permite simular a produção de biofilme em dispositivos médicos, é indicado para estudos comparativos e considerando que a leitura é realizada em 24h, é possível considerar formação de um biofilme maduro em que a capacidade de aderência é irreversível.

Quanto à positividade, em relação à produção de biofilme de modo geral, houve uma porcentagem elevada (63% do total de leveduras), dados estes compatíveis aos observados por Li *et al.* (2003) que relataram alta freqüência na formação de biofilme entre as leveduras isoladas da cavidade bucal.

A maior proporção de produção de biofilme (64%) foi encontrada entre as leveduras *C. não albicans* concordando com Shin *et al.* (2002). Minage *et al.* (1985) observaram que *C. tropicalis* demonstrou maior aderência a polímeros plásticos do que *C. albicans*.

O grupo de pacientes com prótese e lesão apresentou maior quantidade de leveduras isoladas (18/24) e também maior capacidade quanto à produção de biofilme. Aumento da colonização por levedura, bem como da capacidade de aderência de *Candida* sp. isoladas de usuários de próteses odontológicas já foram descritas por diversos autores (Ellepolá e Samaranayake, 1998; Panagoda e Samaranayake, 1998). A ação mecânica, causada por artefatos protéticos, favorece significativamente a colonização e a patogenicidade por leveduras na cavidade bucal e, dependendo de outras características do hospedeiro, aumentam a predisposição para estomatites (Li *et al.*, 2003; Järvenpää *et al.*, 2004). Quadros com inflamação da mucosa bucal, na qual se assentam próteses são relativamente comuns entre seus usuários (Khun *et al.*, 2002).

Em pacientes não usuários de próteses, as leveduras isoladas e agrupadas como *C. não albicans* apresentaram alto grau de produção de biofilme 81% contra 43% entre as amostras de *C. albicans*. Esse dado chama atenção, pois esses indivíduos contêm em sua microbiota bucal agentes com alto potencial de virulência. A ausência de estomatite pode ser justificada pela importância da interação com outros fatores relacionados ao hospedeiro como a agressão mecânica exercida pela prótese. É de se supor que, se esses indivíduos forem expostos à utilização de artefatos protéticos, possivelmente, sofreriam lesões bucais. Essa discussão é reforçada ao analisar o grupo de pacientes com prótese e sem lesão o qual apresentou apenas 33% das leveduras *C. não albicans* como produtoras de biofilme. Esses pacientes tinham o fator predisponente, porém eram colonizados por microrganismos de menor virulência.

Com estes dados, a origem multifatorial da estomatite fica confirmada, uma vez que a lesão não ocorre apenas por fatores mecânicos, devendo-se levar em consideração, entre outros aspectos, a patogenicidade da levedura que compõe a microbiota local. É possível que o potencial de virulência de espécies não *C. albicans* esteja associado à importante emergência desse grupo de microrganismos em várias situações clínicas relatadas nos últimos anos e, portanto, as medidas adotadas na prevenção ao desenvolvimento de estomatite não devem se restringir às espécies reconhecidamente patogênicas, levando em conta, também, outros agentes, antes considerados inócuos.

Referências

- ALONSO, R. et al. Different adhesions for type IV collagen on *Candida albicans*: identification of a lectin-like adhesin recognizing the 7s (IV) domain. *Microbiology*, Oxford, v. 147, n. 7, p. 1971-1981, 2001.
- AZEVEDO, R.V. et al. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of Propolis and Periogard. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 335-341, 1999.
- BAILLEY, G.S.; DOUGLAS L.J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J. Antimicrob. Chemother*, London, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.
- COLOMBO, A.L. et al. High rate of non-albicans candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, London, v. 34, n. 4, p. 381-386, 2000.
- EL-AZIZI, M.A. et al. Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *J Appl. Microbiol.*, West Yorkshire, v. 96, n. 5, p. 1067-1073, 2004.
- ELLEPOLA, A.N.B.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of oral *Candida albicans* isolates to denture acrylic following limited exposure to antifungal agents. *Arch. Oral Biolog.*, London, v. 43, n. 12, p. 999-1007, 1998.
- JÄRVENSIVU, A. et al. *Candida* yeasts in clinic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases*, London, v. 10, n. 2, p. 106-112, 2004.
- JORGE, A.O.C. et al. Influência da xerostomia na transmissibilidade de *Candida albicans* na cavidade bucal de ratos. *Rev. Odontol. Unicid.*, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 121-128, 2000.
- KHUN, D.M. et al. Comparision of biofilms by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immunity*, Washington, v. 70, n. 2, p. 878-888, 2002.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. *The yeasts. a taxonomic study*. 4. ed. New York: Elsevier, 1998.
- LI, X. et al. Quantitative variation of biofilm among strains in natural population of *Candida albicans*. *Microbiology*, Spencers Wood, v. 149, n. 2, p. 353-362, 2003.
- MILLIAN, R.S. et al. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion os *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology*, Spencers Wood, v. 146, n. 9, p. 2105-2112, 2000.
- MINAGE, S. et al. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* end *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. *Infect Immunity*, Washington, DC, v. 47, n. 2 p. 11-4, 1985.
- PANAGODA, G.J.; SAMARANAYAKE, L.P. The relationship between the cell length, adhesion to acrylic and relative cell surface hydrophobic of *Candida parapsilosis*. *Med. Mycol.*, London, v. 36, n. 6, p. 373-8, 1998.
- RAMAGE, G. et al. Inibition of *Candida albicans* biofilm formation by farmezol, a quorium-sensing molecule. *Appl Environ. Microbiol.*, Washington, DC, v. 68, n. 11, p.5459-5463, 2002.
- ROBERT, R. et al. Adherence of platelets to *Candida* species in vivo. *Infect. Immunity*, Washington, DC, v. 68, n. 2, p. 570-576, 2000.
- SHIN, J.H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of blood stream isolates with isolates from other sources. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, DC, v. 40, n. 4, p. 1244-1248, 2002.
- SILVA, C.H.L. et al. Evidenciadores de biofilme em poróteze total: avaliação clínica e antimicrobiana. *Pesq. Odontol. Bras.*, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 270-275, 2002.
- SOUSTRE, J. et al. Caspofungin modulates *in vitro* adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. *J Antimicrobial. Chemoth.*, London, v. 53, n. 3, p. 522-525, 2004.
- TAMURA, N.K. et al. Evaluation of the adherence of *Candida* species to urinary catheters. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 156, n. 4, p. 269-272, 2003.

Received on January 31, 2005.

Accepted on May 25, 2005.