

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Evandro Leão Ribeiro

**Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem
Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos,
relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**

Orientador:

Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo
Universidade de Brasília
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Co-Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta
Universidade Federal de Goiás
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Brasília – DF

2008

Evandro Leão Ribeiro

**Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem
Síndrome de Down: aspectos feno-genotípicos,
relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília - UnB, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências da Saúde

Orientador

Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo

Universidade de Brasília
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Co-Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Fabiana Cristina Pimenta

Universidade Federal de Goiás
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Brasília – DF

2008

R484L Ribeiro, Evandro Leão.
Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down : aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas / Evandro Leão Ribeiro ; Orlando Ayrton de Toledo, orientador ; Fabiana Cristina Pimenta, co-orientadora. – Brasília, 2008.
129 f. : il. ; 30 cm.

Inclui bibliografia

Tese (doutorado) – Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2008.

1. *Candida albicans*. 2. Síndrome de Down. 3. Boca. 4. Odontologia. I. Toledo, Orlando Ayrton (orient.) II. Pimenta, Fabiana Cristina (co-orient.) III. Título.

CDU 616.314-053.2(043)

**A grandeza de qualquer sonho...
repousa na arte de saber usar seus conhecimentos como instrumento...
que possam servir ao próximo.**

À criança com Síndrome de Down

Todas as imagens humanas
refletem
uma superabundância de amor
e conhecimento,
portanto...
são fragmentos com luz própria
que tocam para sempre
a vida...
de quem as conhecem...
e sua própria jornada de existência,
porque refletem...
suavidade, carinho, pureza e amor,
são portanto...
imagens criadas e abençoadas pelo Criador.

Agradecimento

Nenhum trabalho emerge se não provier de um sonho que houvera transformado em ideal. Não é resultado isolado de um pensador... Mas a fusão de muitos idealizadores, que entre diversos rabiscos traçados na plataforma da imaginação unificaram-se em busca de um desejo comum.

Toda estrada é árdua, dura e áspera, quando a fé e a persistência humana são fracas. Entretanto quando há serenidade, tolerância, compreensão e convicção, seus entraves se diluem e a jornada intransponível torna-se realizável a cada aurora e a cada crepuscular na rotatividade dos dias.

Assim foi a trilha que percorremos todos nós que fizemos desta busca um objetivo e deste título uma marca para alçarmos o maior vôo que o homem pode almejar... Que é vôo de sua própria liberdade! De servir seu semelhante como irmão através do seu saber, no amenizar ou curar de suas chagas. Todavia também servir de condutor na procura de novos sonhos idealizados por aqueles ou outros que tenham o propósito de distribuir e compartilhar seus saberes com o próximo. Pois quem não ama e não serve passa pela vida sem que nunca houvesse vivido.

Recordar é voltar os olhos ao longo do caminho percorrido e saber que somente quem semeou é quem terá o que colher. É uma história escrita onde ao farfalhar das páginas do livro do tempo reencontrará personagens que muito mais que simples figuras humanas, são pessoas que impregnaram a história de nossa alma e viverão para sempre na essência de nossa existência. Neste lampejo de memória, retornamos a um princípio onde figuram duas pessoas que sempre me acolheram com encorajamento, convicção e, sobretudo, amor no prosseguir deste caminho: o odontopediatra *Orlando Ayrton de Toledo* (orientador) e a microbiologista bucal *Fabiana Cristina Pimenta* (co-orientadora), ensinando-me a fazer ciência e antes de tudo a acreditar num sonho e convertê-lo em realidade, galgado na persistência, na tolerância, na serenidade e na fé. Na cirurgiã-dentista *Cerise de Castro Campos*, encontrei a expressividade do sorriso, do carinho, das confidências, da persistência, do aconselhamento e da real amizade. Na imunologista *Mara Silvia Carvalhaes*, vislumbrei um dos dons mais relevantes no indivíduo humano: o aconchego, o incentivo e o auxílio de amigo. Na bióloga molecular *Silvana Petrofeza da Silva*, convivi com a amabilidade profissional de servir ao próximo. No farmacêutico *Wesley Magno Ferreira*, descobri

a verdadeira qualidade de companheiro no demonstrar de afetuosidade em todos os momentos de nossas vidas e desta jornada. No casal biomédico *Clever Gomes Cardoso* e fisioterapeuta *Flávia Liara Massaroto Cessel Chagas*, deparei-me com o espírito de luz que me fez enxergar a trilha desta estrada a seguir. Na bacharela e licenciada em Letras *Marina Honorato Costa* e na biomédica *Sueli Meira da Silva Dias*, em cada uma, conheci a figura terna e peculiar de amiga entre conselhos, ouvidoras e incentivadoras no prosseguir dos objetivos de vida. Na biomédica *Keili Maria Souza*, visualizei sempre a beleza de um sorriso que sempre se convertera em energia propulsora em busca do amanhã. Nas técnicas de Laboratório *Ester de Moraes* e *Maria de Lourdes Paiva*, diante da simplicidade de atos de amizade, o profissionalismo em acolherem nossas crianças em estudo. No auxiliar de laboratório *Cícero Júnior da Silva*, descobri um amigo no raiar diário da labuta laboratorial. No setor de limpeza, as Sr^{as} *Cerlina Justina da Silva* e *Maria do Socorro da Silva*, encontrei a disposição constante de servir o semelhante. Nos amigos eternos, que embora o trajeto da vida nos tenha momentaneamente separados ou unidos para sempre: biomédico *Plínio Lázaro Faleiros Naves*, enfermeira *Priscila Maggi*, biomédicas *Luciana Alves*, *Silvana Vilela*, *Hildene Menezes* e *Leda Valadão*, farmacêutico-bioquímico *Ailton José Soares* e cirurgiões-dentistas *Jorivê S. Castro*, *Frederico P. Rocha*, *Gustavo M. Nagato* e *Niwmar A. Souza*, sempre um ponto de apoio em quaisquer circunstâncias da vida. Nos professores e amigos *Cleomones Reis*, *José Daniel Gonçalves Vieira*, *Renato Maurício de Oliveira*, *Marcus Túlio Gracia-Zapata*, *Adriana de Moraes C. Crespo*, *Miriam Cristina L. Dorta*, *Ana Paula J. Kipnis*, *Eliana Issac*, *Christian Wolf*, *Ana Maria de Castro* e *Maria Lúcia Scrofermerk*, encontrei, a cada momento, os alicerces vitais a materialização deste ideal. Há aqueles, que cruzei no caminho da vida e durante a jornada deste trabalho, converteram-se em cais para os embates dos tumultos da vida, ancoradouros de reposição de energia dos sonhos e estimuladores como verdadeiros guardiões da fé: Sr^{as} *Marli Maria Ferreira*, *Romilda Vieira Silva*, *Josilene Carrilho Furtado* e *Ruth Libâneo da Silva* e Srs. *Uanderson Escobar Cunegundes*, *Luciano Geraldo* e *Antônio Hélio Feitosa*. Na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UnB: *Edigrês Alves de Sousa*, deparei-me com a real lealdade, fraternidade e amizade para sempre. Jamais faltariam os verdadeiros baluartes e pilares de sustentação em carinho, amor e encorajamento das verdadeiras amigas e docentes *Regina Maria Bringel Martins* e *Adelair Helena dos Santos*.

A cada um destes nomes mencionados há ainda uma denominação que somente se é capaz de dar quando realmente levamos no mais íntimo de nosso ser a capacidade de amar, pois em meu eu sempre haverá um espaço a todos na expressão mais simples e tocante da palavra amor.

Dedicatória

Aqueles que me ensinaram na jornada da vida...
Que a única razão pela qual se vive é o AMOR...

A Deus

e a minha família:

Rui Barbosa Ribeiro (pai),

Leone Leão Ribeiro (mãe) (*in memoriam*)

e *Maurício Leão Ribeiro* (irmão)

RESUMO

Um total de 160 amostras de secreção salivar foi coletado da mucosa jugal de indivíduos avaliados neste estudo de caso-controle e atendidos na Unidade Odontológica Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás na cidade de Goiânia - GO, Brasil. Sessenta (60/160) (37,5%) amostras de *Candida* foram isoladas e identificadas como pertencentes apenas a espécie *albicans*. Destas, trinta e sete (37/40) (92,5%) leveduras foram provenientes da mucosa bucal de crianças com Síndrome de Down (grupo teste), catorze (14/80) (17,5%) de crianças sem síndrome (grupo controle) e nove (9/40) (22,5%) de pais e/ou responsáveis. As amostras de *C. albicans* bucais foram detectadas em crianças com uma faixa etária de zero a 11 anos e a maioria pertencia ao gênero masculino. A mãe apresentou-se como responsável pela curadoria dos filhos com uma média de idade de 39,4 anos. Todas as crianças e pais e/ou responsáveis, incluídos neste estudo, apresentavam mucosa bucal intacta e não faziam uso de nenhuma droga terapêutica. Análises das características fenotípicas das amostras de *C. albicans* bucais permitiram identificar nove morfotipos diferentes (3240, 3340, 5320, 5330, 5340, 5530, 5540, 7530 e 7540) no grupo teste e quatro morfotipos (2330, 5240, 5320 e 5330) e (5230, 5240, 5520 e 5530) nos grupos controle e pais e/ou responsáveis, respectivamente. Colônias fúngicas franjadas foram mais expressivas entre amostras de *C. albicans* oriundas da boca de crianças com irregularidade cromossômica. A formação de tubos germinativos, em soro fetal bovino, ocorreu em menor espaço de tempo entre os isolados de *C. albicans* bucais de crianças síndrômicas. Todas as amostras de *C. albicans*, isoladas da boca das crianças e pais e/ou responsáveis, mostraram-se produtoras de aspartil proteínases e 95,0% (57/60) de fosfolipases, cabendo ao grupo teste os isolados de *C. albicans* mais produtivos. Maior diversidade de *killer*-tipos (111, 112, 121, 186 e 888) foram presenciados entre os cultivos de *C. albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down. Todos os isolados de *C. albicans*, originados da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis, foram suscetíveis às drogas antifúngicas empregadas (anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina). Estudo estatístico empregando o teste qui-quadrado (X^2) em relação ao número de amostras de *C. albicans* bucais decorrentes dos grupos teste, controle e pais e/ou responsáveis, quanto às variáveis: carregamento de leveduras bucais, intervalo de tempo necessário à formação de tubos germinativos e o índice de produtividade de exoenzimas demonstrou *in vitro* diferenças estatísticas significantes às características fenotípicas presenciadas nas amostras de *C. albicans* da boca pertencentes ao grupo de crianças com Síndrome de Down em relação aos demais grupos controle e pais e/ou responsáveis inclusive neste trabalho. Concentrações elevadas de IgA e IgM e normais de IgG séricas totais foram detectadas em crianças com Síndrome de Down basicamente na faixa etária de quatro a sete anos de idade. Variabilidade de 45,0 a 100,0% de similaridade genética presenciou-se entre os pares de *C. albicans* isoladas da boca simultaneamente de pais e/ou responsáveis e crianças com Síndrome de Down mediante emprego de RAPD usando os *primers* RSD10 e RSD12. *In vitro* *C. albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down demonstraram ampla capacidade de colonização da boca de indivíduos com irregularidade cromossômica.

ABSTRACT

A total of 160 samples of saliva secretion were collected of the jugal mucosa of appraised individuals in this case-control study and assisted at the Infantile Dental Unit of the School of Dentistry at the Universidade Federal de Goiás in the city of Goiânia - GO, Brazil. Sixty (60/160) (37.5%) *Candida* samples were just isolated and identified as belonging to the *albicans* species. Of these, thirty seven (37/40) (92.5%) yeasts were coming from the buccal mucosa of children with Down's syndrome (test group), fourteen (14/80) (17.5%) of children without syndrome (control group) and nine (9/40) (22.5%) of parents and/or responsible. The buccal *C. albicans* samples were detected in children with an age group from zero to 11 years old and most belonged to the masculine gender. The mother came as responsible for the trusteeship of the children with an average of 39.4 years old. All the children and parents and/or responsible, included in this study, presented intact buccal mucosa and were not on any type of drug therapy. Analyses of the phenotypical characteristics of buccal *C. albicans* samples allowed to identify nine different morphotypes (3240, 3340, 5320, 5330, 5340, 5530, 5540, 7530 and 7540) in the test group and four morphotypes (2330, 5240, 5320 and 5330) and (5230, 5240, 5520 and 5530) in the control and parents and/or responsible groups, respectively. Fungal colonies with fringes were more expressed among *C. albicans* samples originating of the mouth of children with chromosomal irregularity. The formation of germ tubes, in bovine fetal serum, happened in smaller space of time among the buccal *C. albicans* isolates of children with syndrome. All *C. albicans* samples isolated of the mouth of children and parents and/or responsible were shown producing of aspartil proteinases and 95.0% (57/60) of phospholipases, fitting to the test group the *C. albicans* isolates more productive. Larger diversity of killer types (111, 112, 121, 186 and 888) was witnessed among the buccal *C. albicans* cultivates of children with Down's syndrome. All the *C. albicans* isolates, originated of the mouth of children with and without Down's syndrome and parents and/or responsible, were susceptible to the antifungal drugs used (amphotericin B, fluconazole, itraconazole and 5-fluorocytosine). Statistician study using the qui-square test (X^2) in relation to the number of buccal *C. albicans* samples resulting from the test, control and parents and/or responsible groups, as the variables: buccal yeasts carriage, interval of necessary time to the formation of germ tubes and the exoenzymes productivity index demonstrated *in vitro* significant statistical differences to the phenotypical characteristics witnessed in the *C. albicans* samples from mouth belonging to the children with Down's syndrome group in relation to the other control and parents and/or responsible groups included in this work. High concentrations of IgA and IgM and normal total of IgG in the serum of the blood were detected in children with Down's syndrome basically in the age group from four to seven years old. Variability from 45.0 to 100.0 of genetic similarity was witnessed among the pairs of *C. albicans* isolated of the mouth simultaneously of parents and/or responsible and children with Down's syndrome by employment of RAPD using the primers RSD10 and RSD 12. *In vitro* buccal *C. albicans* of children with Down's syndrome demonstrated wide capacity of colonization of the mouth of individuals with chromosomal irregularity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C. antes de Cristo

ATTC Sigla em inglês do Centro de coleção de células de microrganismos padronizados dos Estados Unidos da América (*American Type Culture Collection*)

C1 e C3-C5 componentes protéicos da cascata da via clássica do sistema complemento (C1, C3, C4 e C5)

C1q subunidade do componente protéico C1 da cascata da via clássica do sistema complemento

CCSD crianças com Síndrome de Down

CD₄ receptor de superfície de linfócito T auxiliar

CD₈ receptor de superfície de linfócito T citotóxico

CIM concentração inibitória mínima

cm centímetro

CO₂ dióxido de carbono

corn-meal meio de cultura fubá de milho (*corn-meal*)

CSSD crianças sem Síndrome de Down

dc diâmetro da colônia fúngica

dcp diâmetro da colônia fúngica acrescido de zona de precipitação enzimática

dL decilitro

DMSO dimetil sulfóxido

DNA ácido desoxirribonucléico

dNTP Sigla em inglês de deoxinucleotídeo trifosfatados (*deoxynucleotide triphosphate*)

ependorf microtúbulos com tampas usados para armazenamento de materiais de

laboratório

€ símbolo matemático representativo de pertence

Fe⁺⁺ íon ferroso

Fe⁺⁺⁺ íon férrico

G1, 2, 3 e Total grupos 1, 2, 3, T de CCSD

g giro

HCl ácido clorídrico

HIV vírus da imunodeficiência humana

H₂O₂ peróxido de hidrogênio

IC₅₀ concentração da droga capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras do microrganismo em estudo

IgA imunoglobulina A

IgD imunoglobulina D

IgE imunoglobulina E

IgG imunoglobulina G

IgG 1 imunoglobulina G tipo 1

IgG 2 imunoglobulina G tipo 2

IgG 3 imunoglobulina G tipo 3

IgG 4 imunoglobulina G tipo 4

IgM imunoglobulina M

INF γ interferon gama

IL 1 interleucina 1

IL 2 interleucina 2

IL 4 interleucina 4

IL 5 interleucina 5

IL 6 interleucina 6

IL 10 interleucina 10

kDa quilodalton

L litro

M molar

mg miligrama

MgCl₂ cloreto de magnésio

min minuto

mL mililitro

MM marcador molecular

mm milímetro

mM minimolar

MOPS ácido morfolinopropanosulfônico

n número

NCCLS *National Committee for Clinical Laboratory Standards* dos Estados Unidos da América, hoje denominado de CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute* dos Estados Unidos da América

NK células *natural killer*

nm nanômetro

ng nanograma

O₂ superóxido

p índice de significância

PCR Sigla em inglês de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

P e/ou R país e/ou responsáveis

PFGE Sigla em inglês de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

pH potencial hidrogeniônico

Primer Oligonucleotídeo que inicia uma reação de polimerização a partir de sua hidratação com a cadeia molde à qual é complementar

P_z zona de precipitação enzimática da colônia fúngica

R conjunto dos números reais

RAPD Sigla em inglês de técnica de determinação dos polimorfismos de DNA amplificado aleatoriamente (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

RF relação familiar

RFLP Sigla em inglês de técnica de determinação do perfil de DNA por restrição enzimática (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNA ácido ribonucléico

rpm rotações por minuto

s segundo

Se selênio

SIDA Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

switching capacidade de variabilidade fenotípica expressada pelos isolados de *Candida*

Ta1 linfócito T auxiliar 1

Ta2 linfócito T auxiliar 2

Taq enzima DNA polimerase termoestável derivada da bactéria *T. aquaticus*

Tc linfócito citotóxico

TBE Sigla em inglês do tampão Tris-borato EDTA (Ácido etienodiaminotetracético) empregado na corrida dos produtos de PCR em gel de agarose (*Tris-borate EDTA – Ethilediaminetetraacetic acid*)

TNF fator de necrose tumoral

U unidade

UIO Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás

ufc unidade formadora de colônia

V volts (voltagem)

Vmin valores mínimos

Vmax valores máximos

VR valores de referência

x sinal de multiplicação e, numa expressão de equação de matemática, representa qualquer número

x² qui-quadrado

YEPD Sigla em inglês do meio de cultura de glicose peptonada acrescido de extrato de leveduras (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)

Zn zinco

- negativo

+ positivo

= igual

≠ diferente

°C grau Celsius

> maior

< menor

≥ maior ou igual

≤ menor ou igual

% por cento (porcentagem)

/tal que

μg micrograma

μL microlitro

μm micrômetro

μM micromolar

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

- Figura 1.** Morfotipos de *Candida albicans* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down em meio de ágar - extrato de malte.....Pág. 41
- Figura 2.** Formação de tubos germinativos por *Candida albicans* oriundas da boca de crianças com Síndrome de Down em soro fetal bovino a 37°C.....Pág. 42
- Figura 3.** *Candida albicans* provenientes da boca de crianças com Síndrome de Down produtoras de aspartil proteinases meio básico de albuminaPág. 44
- Figura 4.** Produção de fosfolipases por *Candida albicans* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down em meio de ágar Sabouraud dextrose enriquecido com gemas de ovo.....Pág. 45
- Figura 5.** *Killer*-tipo 111 referente à *Candida albicans* da boca de criança com Síndrome de Down suscetível a todas as leveduras produtoras de toxinas *killer* em meio de ágar Sabouraud dextrose modificado.....Pág. 47
- Figura 6.** Suscetibilidade *in vitro* de três *Candida albicans* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down frente à anfotericina B mediante o emprego da técnica de microdiluição em caldo.....Pág. 48
- Figura 7.** Dendograma de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) entre os pares conjugados de *Candida albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis obtidos com os *primers* RSD 10 e RSD 12.....Pág. 49
- Figura 8.** Perfil eletroforético de fragmentos de DNA de *Candida albicans* da boca simultaneamente de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis pela técnica de RAPD com emprego do *primer* RSD10..... Pág.50
- Figura 9.** Distribuição de fragmentos de DNA de *Candida albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis em perfil eletroforético mediante uso do *primer* RSD 12 pela técnica de RAPD.....Pág.50
- Quadro 1.** Modelo de tipificação de morfotipos de espécies de *Candida* segundo Hunter et al., 1989 Pág. 31
- Quadro 2.** Código de leitura aplicado ao sistema *killer* proposto por Polonelli et al., 1990.....Pág. 33
- Quadro 3.** Valores de referências das imunoglobulinas séricas humanas.....Pág.36
- Tabela 1.** Distribuição de *Candida albicans* nos grupos de crianças com e sem Síndrome de

Down e pais e/ou responsáveis atendidos na UOI/FO/UFG.....	Pág. 38
Tabela 2. Faixa etária das crianças com e sem Síndrome de Down portadoras de <i>Candida albicans</i> na boca.....	Pág. 39
Tabela 3. Gênero das crianças e pais e/ou responsáveis colonizados por <i>Candida albicans</i> na boca.....	Pág. 39
Tabela 4. Morfotipos presenciados em <i>Candida albicans</i> isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.....	Pág. 40
Tabela 5. Formação de tubos germinativos por <i>Candida albicans</i> oriundas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis em soro fetal bovino.....	Pág. 42
Tabela 6. Produção de aspartil proteinases por <i>Candida albicans</i> da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.....	Pág. 43
Tabela 7. Perfil da atividade de fosfolipases por <i>Candida albicans</i> isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.....	Pág. 45
Tabela 8. <i>Killer</i> -tipos de <i>Candida albicans</i> da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.....	Pág. 46
Tabela 9. Concentração inibitória mínima de antifúngicos em relação <i>Candida albicans</i> isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.....	Pág. 48
Tabela 10. Distribuição de crianças com Síndrome de Down por idade e dosagem de IgA sérica.....	Pág. 51
Tabela 11. Distribuição de crianças com Síndrome de Down por idade e dosagem de IgM sérica.....	Pág. 52
Tabela 12. Distribuição de crianças com Síndrome de Down por idade e dosagem de IgG sérica.....	Pág. 52

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1. Infecção bucal por <i>Candida</i>	1
1.2. Leveduras do gênero <i>Candida</i>	3
1.3. Síndrome de Down.....	4
1.3.1. Características bucais de indivíduos com Síndrome de Down	6
1.3.2. Relação intrafamiliar.....	10
1.3.3. A resposta imune nos portadores de Síndrome de Down	11
1.4. Determinantes de virulência em <i>Candida</i>	13
1.5. Caracterização fenotípica de <i>Candida</i>	14
1.5.1. Morfotipagem.....	15
1.5.2. Tubotipagem.....	16
1.5.3. Exoenzimotipagem.....	17
1.5.4. Sensibilidade a toxinas <i>killer</i>	19
1.5.5. Suscetibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	20
1.6. Genotipagem de <i>C. albicans</i>	23
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Aspectos éticos do estudo.....	27
3.2. Delineamento do estudo.....	27
3.3. Amostras de saliva e sangue.....	27
3.4. Coleta de saliva e sangue.....	28
3.5. Isolamento, identificação e manutenção das leveduras.....	28
3.5.1. Teste de Reynolds-Braude.....	29
3.5.2. Microcultivo em lâmina.....	29
3.5.3. Testes bioquímicos.....	30
3.5.3.1. Auxanograma.....	30
3.5.3.2. Zimograma.....	30
3.6. Determinação das características fenotípicas de <i>Candida</i>	30
3.6.1. Morfotipagem.....	30
3.6.2. Tubotipagem.....	31
3.6.3. Enzimotipagem (aspartil proteinases e fosfolipases).....	32
3.6.4. Tipagem pela sensibilidade a toxinas <i>killer</i>	32
3.6.5. Determinação da suscetibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	33
3.7. Similaridade genética de <i>Candida</i>	35
3.7.1. Extração de DNA.....	35
3.7.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
3.8. Dosagem de imunoglobulinas séricas totais por turbidimetria.....	36
3.9. Análise estatística.....	37

4. Resultados	38
4.1. Isolamento e identificação de <i>Candida</i>	39
4.2. Características fenotípicas das <i>C. albicans</i>	39
4.2.1. Morfotipagem.....	39
4.2.2. Tubotipagem.....	41
4.2.3. Enzimotipagem.....	43
4.2.3.1. Aspartil proteinases.....	43
4.2.3.2. Fosfolipases.....	44
4.2.4. Tipagem pela sensibilidade a toxinas <i>killer</i>	46
4.2.5. Tipagem pela suscetibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	47
4.3. Determinação da similaridade genética de <i>Candida</i>	49
4.4. Dosagem de imunoglobulinas séricas totais.....	51
5. Discussão	53
5.1. <i>Candida albicans</i>	53
5.2. Fenotipagem das <i>C. albicans</i>	55
5.3. Suscetibilidade <i>in vitro</i> a drogas antifúngicas.....	59
5.4. Similaridade genética em <i>Candida</i>	61
5.5. Imunoglobulinas séricas totais.....	62
6. Conclusões	65
Referências Bibliográficas	67
Anexos	94
Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética e Consentimento informado e esclarecido	95
Anexo 2 – Ficha do paciente	99
Anexo 3 – Meios de cultura, soluções, reagentes e leveduras – padrão	101

1. Introdução

A Síndrome de Down figura como uma das irregularidades genéticas mais relevantes entre as diversas alterações cromossômicas que os seres humanos podem sofrer desde a sua formação embrionária até a vida pós-uterina (Rozone & Mustachi, 1990; Danielski, 2002; Roncari et al., 2002). O monitoramento dos indivíduos portadores desta síndrome é importante, não só para que se entenda o seu mecanismo fisiológico, mas também para que se possa garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes (Danielski, 2002).

Hoje, frente a uma maior expectativa de vida dos portadores de Síndrome de Down, faz-se necessária uma melhor compreensão das infecções nestes indivíduos.

As características anátomo-fisiológicas da boca de indivíduos com Síndrome de Down propiciam diversas alterações biológicas e fisiológicas como o desenvolvimento de candidíase bucal. Relatos frequentes de isolados de *Candida* em dados anamnésicos da Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (UOI/FO/UFG) na cidade de Goiânia, Estado de Goiás/Brasil estimularam a realização do presente trabalho, visando avaliar o comportamento de leveduras em indivíduos com Síndrome de Down, relação intrafamiliar destes microrganismos e características do sistema imune destes pacientes.

1.1. Infecção bucal por *Candida*

A candidíase bucal é uma das infecções fúngicas mais comuns em seres humanos. Esta infecção pode ocorrer em qualquer fase da vida, embora o período da infância apresente-se como um dos mais propícios a sua manifestação (Linossier et al., 2002; Vidotto et al., 2002; Pinto, 2003; Sanchez-Vargas et al., 2005; Carvalho et al., 2007).

A *Candida* pode ser detectada na boca de crianças recém-nascidas, seis a dez horas após o parto (Morhart & Fitzgeraldi, 1984; Borba & Menezes, 1996; Lacaz et al., 1998; Pimenta et al., 2001; Scherma et al., 2004) e depois de 14 a 21 dias do nascimento em todo trato gastrointestinal. Portanto, esse microrganismo faz parte da microbiota da boca desde o nascimento até a formação da definitiva na fase adulta do homem e permanece durante toda a

vida (Ribeiro et al., 2004; Carvalho et al., 2007). Coube a Hipócrates (460 a 337 a.C.) o relato inicial da ocorrência de *Candida* na boca de crianças, como *aphthae albus* ou *albae* (Birman, 1998). Sua descrição referia-se às placas esbranquiçadas com aspecto similar as presenciadas também em pacientes debilitados. Galeno (200 a 130 a.C.) observou essas mesmas lesões em crianças enfermas. No entanto, relatos sobre a manifestação clínica de candidíase bucal em crianças já era freqüente na Europa no século XVIII (Ribeiro et al., 2004).

As leveduras do gênero *Candida* caracterizam-se como fungos oportunistas que se encontram presentes como comensais desde a superfície de mucosas, pele do homem e de certos animais. Cerca de 20,0 a 50,0% da população carrega espécies de *Candida* na boca. *C. albicans* compreende entre 60,0 a 90,0% dos isolamentos, *C. tropicalis* cerca de 7,0%, todavia *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são evidenciadas em menor freqüência (Lacaz, 1980; Henning & Perrone, 2001_a; Martins et al., 2002_b; Ribeiro, 2002; Urizar, 2002; Scherma et al., 2004). Esta relação de equilíbrio entre *Candida* e hospedeiro é propiciada pela manutenção da integridade das barreiras teciduais, relação harmônica da microbiota autóctone e funcionamento adequado do sistema imunológico humano, havendo em contrapartida por parte do fungo leveduriforme, permanência equilibrada da capacidade de aderência e da produção de enzimas e toxinas (Calderone & Fonziwa, 2001; Vieira et al., 2005).

Diversos fatores mecânicos, físicos, químicos e iatrogênicos podem contribuir para a ruptura do equilíbrio da microbiota bucal que se estabelece entre *Candida* e os demais microrganismos. Mastigação, redução do fluxo salivar, trauma local com perda da integridade tecidual, debilidade orgânica generalizada, dietas ricas em carboidratos, deficiência de ferro, ácido fólico ou vitamina B12, desordens endócrinas (hipotireoidismo, insuficiência adrenocortical e diabetes mellitus), infecção por HIV, alterações de taxas sanguíneas (leucemia aguda e agranulocitose), antibioticoterapia, quimioterapia, radioterapia, xerostomia e comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro constituem fatores comumente relacionados à infecção fúngica por *Candida* (Pardi & Cardozo, 2002).

As candidíases bucais apresentam-se sob variados aspectos clínicos, destacando-se os tipos: *pseudomembranoso*, como o mais comum e caracterizado pela freqüência de formação de placas brancas que, ao serem raspadas promove sangramento. As lesões apresentam, além de coloração típica branca, distribuição variável, podendo atingir todas as regiões da boca. Em certos casos, nos exames histopatológicos observam-se edemas,

microabscessos e intenso infiltrado inflamatório, acompanhado de forma filamentosa invasiva de *Candida* no epitélio bucal; o *eritematoso*, de aspecto avermelhado ora como área difusa ou pontilhado com características agudas ou crônicas, comumente descrito em pacientes portadores de prótese total superior; o *hiperplásico* ou também chamado de candidíase leucoplásica, também de coloração esbranquiçada, resistente à raspagem, além da *queilite angular* localizada nos cantos dos lábios com a participação de bactérias e o tipo *mucocutâneo*, relacionado a síndromes de imunodeficiências congênitas ou também a fatores genéticos, compreendendo vários problemas orgânicos principalmente endócrinos (Birman, 1998; Urizar, 2002).

1.2. Leveduras do gênero *Candida*

São descritas atualmente 197 espécies do gênero *Candida* pertencentes ao Reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes* e família *Cryptococcaceae*. Embora haja algumas espécies classificadas na subdivisão *Ascomycotina* (Kreegen-Van Rij, 1984; Lacaz et al., 1998; Sidrim & Rocha, 2004).

As leveduras do gênero *Candida* apresentam em meio sólido, ágar Sabouraud dextrose, colônias úmidas, cremosas, de aspecto liso ou rugoso e coloração branco-amarelada. Microscopicamente, as células são globosas, ovaladas ou ovaladas-alongadas, medindo em média de 3 por 7µm a 3 por 14µm. Ao microcultivo em ágar *corn-meal*, há formações predominantes de pseudomicélios, podendo ser encontrados micélios verdadeiros e clamidósporos. A formação de tubos germinativos ocorre em cultivos com soros de animais a 37°C. Em meio líquido, há formação de sedimento em caldo Sabouraud dextrose, e testes de assimilação de fonte de carbono (celobiose, galactose, glicose, lactose, maltose, rafinose e sacarose) e de fermentação de açúcares (dextrose, lactose, maltose e sacarose) que permitem a identificação de espécies de *Candida* (Kreegen Van Rij, 1984; Souza et al., 1990; Lacaz et al., 1998; Sidrim & Rocha, 2004).

Candida albicans é a espécie de *Candida* mais relacionada com os processos de colonização e patogenicidade na boca do homem. Esta habilidade é decorrente da acentuada capacidade de dimorfismo morfológico e a produção de exoenzimas, facilitadoras da interação do fungo às células do hospedeiro, propiciando a aderência e a penetração ao tecido afetado, etapas consideradas relevantes na patogênese de candidíase em mucosa (Xu et al., 2000;

Panizo & Reviákina, 2001; Martins et al., 2002_b; Menezes et al., 2004; Ribeiro et al., 2006; Carvalho et al., 2007).

1.3. Síndrome de Down

A Síndrome de Down é uma condição genética caracterizada pela presença de um cromossomo a mais nas células de quem é portador e acarreta um variável grau de retardo no desenvolvimento físico e mental. Este cromossomo extra se acrescenta ao par de número 21, favorecendo o termo também utilizado para sua denominação de trissomia 21 (Coelho & Loevy, 1982; Guedes, 1997; Campos, 2001; Danielski, 2002).

O epônimo *Down* deriva do sobrenome do médico inglês John Langdon Haydon Down que, em 1866, descreveu pela primeira vez esta cromossomopatia. Todavia somente Jérôme Lejeune et al., 1959 caracterizaram através da cariotipagem humana a síndrome propriamente dita (Danielski, 2002).

Esta irregularidade cromossômica autossômica é a alteração genética mais frequente. Com base no censo populacional de 2000, a população infantil brasileira na faixa etária de zero a 11 anos de idade é aproximadamente de 39,7 milhões de crianças (IBGE, 2000). Sabendo que a frequência de crianças acometidas por Síndrome de Down é estimada no Brasil em 1/600 nascimentos (Coelho & Levy, 1982; Ribeiro et al., 2002), tem-se, portanto 66,2 mil crianças portadoras desta síndrome equivalendo aproximadamente a 0,2% da população brasileira infantil e com uma divisão quase igualitária quanto ao gênero.

A cidade de Goiânia, capital do Estado de Goiás, possui aproximadamente 433 crianças portadoras de Síndrome de Down, inclusa numa população de 260,0 mil indivíduos possuidores de uma faixa etária de zero a 11 anos de idade (IBGE, 2000).

Há três tipos de irregularidades cromossômicas relacionadas à Síndrome de Down, caracterizadas por um cromossomo a mais no 21^o par: *na trissomia 21 simples* (95% dos casos), há uma alteração numérica devido à falta de disjunção durante a meiose, fazendo com que o patrimônio genético, que era adequado na mãe, não se dividisse exatamente na metade e o ovócito ficasse com um cromossomo a mais. *A trissomia em translocação* é mais rara (3 a 5% dos casos), pois existe uma alteração também numérica dos cromossomos de um dos pais: por exemplo, um dos pequenos cromossomos 21 se liga a um outro cromossomo. Na mãe, a translocação é do cromossomo 15-21, que embora clinicamente saudável, tem um

desequilíbrio (45 cromossomos) no seu cariótipo e na translocação do 21-22 é o pai responsável por apresentar este desequilíbrio. A *trissomia 21 em mosaicismo* (2 a 3%) pode se verificar também depois da fecundação. Neste caso, a célula embrionária inicial é geneticamente íntegra e o erro numérico ocorre no momento da primeira duplicação desta célula e se repete em cada célula enquanto o feto se desenvolve. O indivíduo portador desta alteração cromossômica passa a ter um mosaico celular com dois tipos: um tipo com 46 e outro com 47 cromossomos em cada célula (Danielski, 2002).

Dentre as prováveis causas que predisõem à ocorrência de Síndrome de Down, a idade materna representa um fator de risco. Mulheres com mais de 45 anos têm uma maior predisposição a ter uma criança com Síndrome de Down para cada 50 nascimentos (Rozone & Mustachi, 1990; Pires et al., 1997). Homens com mais de 55 anos também estão sujeitos a gerar indivíduos com anomalias cromossômicas (Rozone & Mustachi, 1990). Outras causas indutoras à Síndrome de Down são: uma tendência familiar a não-disjunção cromossômica e prováveis influências externas. Infecções virais, irradiações, alcoolismo, problemas hormonais e imunológicos, certas drogas e espermaticidas têm sido aventados como possíveis elementos causadores desta cromossomopatia (Bacheshi, 1990; Rozone & Mustacchi, 1990; Pires et al., 1997).

As implicações médicas da Síndrome de Down abrangem distúrbios cardíacos congênitos, anormalidades de desenvolvimento, traços dismórficos, maior risco à leucemia e deficiências imunológicas e endócrinas (Rozone & Mustacchi, 1990; Danielski, 2002).

A expressão genética da trissomia do cromossomo 21 propicia ainda irregularidades quanto à função bioquímica de diversas substâncias em indivíduos portadores de Síndrome de Down. O nível sanguíneo de superóxido desmutase é detectado em média 1,5 vezes mais acentuado. Isto resulta em uma taxa elevada de conversão de superóxidos (O_2^-) em peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) que pode danificar estruturas celulares de ácido desoxirribonucléico (DNA) e lipídios, e em baixa concentração de superóxidos implica na diminuição da capacidade lítica dos neutrófilos frente às infecções provocadas por *Staphylococcus aureus* e *C. albicans* (Coelho & Loevy, 1982; Shaw, 2001). A reposição alimentar de selênio (Se) e zinco (Zn) fazem-se necessárias à manutenção da funcionalidade do sistema imunológico. O mineral selênio eleva os níveis plasmáticos das subclasses IgG2 e IgG4 da imunoglobulina G, reduzindo o acometimento de infecções e participa também da composição da enzima glutatona peroxidase que tem a função de capturar os peróxidos de

hidrogênio, impedindo que essas substâncias lesionem as membranas das células humanas, conjuntamente com a vitamina E (tocoferol) (Shaw, 2001; Ribeiro et al., 2003). O zinco medeia o desenvolvimento do linfócito B e a produção de anticorpos, particularmente imunoglobulina G (Shaw, 2001). O acúmulo de íons Fe^{+3} , decorrente da reação entre peróxidos de hidrogênio e íons de Fe^{+2} , armazenados na condição de sais de ferro no organismo, faz também com que os leucócitos produzam superóxidos, através do mecanismo oxidativo utilizando enzimas que contém ferro. No entanto a ação citolítica sobre microrganismos, proveniente da ligação do peróxido de hidrogênio à mieloperoxidase dos neutrófilos, é prejudicada em infecções ocasionadas por *C. albicans* e *S. aureus* devido serem produtores de catalase e, portanto capazes de degradar rapidamente o peróxido de hidrogênio, o que favorece um acentuado comprometimento da defesa orgânica (Birck, 1994; Shaw, 2001). O suplemento de ferro via alimentar, somente deve ser realizado mediante comprovação de anemia e a dieta baixa em carboidratos contribui para prevenir infecções por *Candida* na boca de portadores da Síndrome de Down, uma vez que constatou-se que animais de laboratório são 200 vezes mais suscetíveis a proliferação de leveduras bucais quando alimentados com água e açúcar (Lacaz, 1980; Shaw, 2001).

Outras irregularidades metabólicas ocasionadas pelos genes do cromossomo 21 podem se manifestar em indivíduos acometidos de Síndrome de Down. As deficiências da fosfofrutoquinase e cistationina beta-sintetase que são doenças autossômicas recessivas. A primeira é uma glicogenose tipo VII na qual é necessário o controle da ingestão de carboidratos. A segunda é relacionada ao metabolismo da metionina, aminoácido que atua na utilização dos fosfolipídios (Tommaso, 2004; Glicogenose, 2005; Orphanet, 2005). Estas alterações metabólicas parecem induzir alterações na microbiota de pacientes com Síndrome de Down, inclusive *Candida*.

1.3.1. Características bucais de indivíduos com Síndrome de Down

Em relação às características bucais de indivíduos portadores de Síndrome de Down, observam-se aspectos peculiares como, por exemplo: acromícia, macroglossia relativa, língua fissurada, hipertrofia papilar, língua geográfica, palato duro menor e ogival, protusão lingual, hipotonicidade muscular, mordida aberta anterior e mordida cruzada, anomalias dentais e fissuras nos cantos labiais. Tais alterações anátomo-fisiológicas contribuem de

maneira adjuvante para existência de diversos nichos ecológicos microbianos na boca, abrangendo desde lábios, bochechas, palato, língua, gengiva e dentes. Nesses diferentes nichos têm sido detectado *Candida* como microrganismo colonizante ou patogênico como na queilite angular numa prevalência de 16,0% da população infantil sem Síndrome de Down (Marcantoni, 1999; Ribeiro et al., 2002; Roncari et al., 2002). As *Candida* são isoladas na boca de aproximadamente 69,0% das crianças com Síndrome de Down e em 40,0% dos casos apresentam na forma pseudomembranosa, conhecida como sapinho, e geralmente descrita em pacientes com esta irregularidade (Rozone & Mustacchi, 1990; Carlstedt et al., 1996).

As bactérias presentes na boca contribuem para a colonização e a proliferação de espécies de *Candida* (Carvalho et al., 2007). Associações entre bactérias do gênero *Streptococcus* (*S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. orallis* e *S. anginosus*) e *C. albicans* se intensificam na ausência de glicose. Estas associações *in vitro* são alteradas com *S. sanguis* e *S. gordonii* quando os blastósporos de *Candida* são expostos ao calor e a presença de proteases (Jenkinson et al., 1990; Pardi & Cardozo, 2002).

O equilíbrio das condições ecológicas da boca não é estável por longos períodos. Este equilíbrio sofre influência desde a mudança da dentição primária até a permanente. Outros fatores também estão relacionados com esse desequilíbrio como: existência de lesões de cárie, restaurações, extração de dentes, inserção de próteses, aparelhos ortodônticos e produção de hormônios. Todavia as mudanças transitórias na estabilidade deste ecossistema podem ser ocasionadas pela frequência e tipo de alimentos ingeridos, variação no fluxo salivar, medicamentos entre outros (Marsh & Martin, 1992; Brambilla et al., 2000).

A boca apresenta ainda superfícies mucosas que contribuem para a diversidade microbiana. As papilas do dorso da língua favorecem a colonização de microrganismos que geralmente seriam removidos pela estimulação do ato de mastigação e liberação do fluxo salivar. O baixo potencial de óxido-redução (Eh) nos espaços interpapilares da língua propicia o desenvolvimento de uma microbiota bacteriana anaeróbia em detrimento às leveduras de *Candida* (Marsh & Martin, 1992; Pardi & Cardozo, 2002). Entretanto a maior colonização bucal de *Candida* é presenciada no dorso da língua, o que sugere ser o reservatório primário de *C. albicans* na boca, seguido pela agregação fúngica ao biofilme dentário (Alkumru & Beydemir, 1992; Pardi & Cardozo, 2002; Carvalho et al., 2007).

Os microrganismos bucais têm como fonte endógena de nutrientes a saliva, a qual fornece aminoácidos, peptídeos, vitaminas, gases e glicopeptídeos e estabelecem cadeias

alimentares com propósito de melhor aproveitar os nutrientes presentes na boca. A fonte exógena de nutrientes é a dieta, tendo os carboidratos como substâncias orgânicas que influenciam diretamente na microbiota bucal. Os carboidratos são convertidos em polímeros (glucanos e frutanos) que consolidam a aderência ou são metabolizados em ácidos. O consumo freqüente de açúcar pode selecionar uma microbiota rica em estreptococos do grupo *mutans* e *Lactobacillus* pela produção de ácido lático. A dificuldade de higienização da boca por crianças com Síndrome de Down favorece condições microbiológicas ideais à proliferação de *Candida* como microrganismo oportunista (Loesche, 1986; Marsh & Martin, 1992; Pimenta et al., 2001; Roncari et al., 2002; Carvalho et al., 2007).

Vários fatores antimicrobianos são detectados na saliva, os quais atuam no controle da colonização da boca. Estes fatores compreendem a lisozima, lactoferrina e o sistema da sialoperoxidase, polipeptídeos ricos em histidina entre outros. No que se referem à *Candida*, importantes enzimas salivares, lactoferrina, lisozima e outras, exercem ação inibidora sobre a sua multiplicação (Urizar, 2002). Verificou-se que a lactoferrina existente na saliva parotídica é capaz de inibir a *C. albicans in vitro*, por exercer ação quelante sobre o ferro, elemento essencial para a sua multiplicação (Lacaz, 1980). O controle microbiano bucal também é exercido pelo fluido do sulco gengival tanto no processo de manutenção da microbiota, como nas infecções. O fluido também pode remover células microbianas não aderidas, atuar como fonte primária de nutrientes e conter componentes de defesa do hospedeiro (Marsh, 1989; Tenovou, 1998).

O fluxo e a composição salivar exercem papel relevante quanto à manutenção das propriedades físicas e químicas da boca, além de interferir na composição da microbiota bucal. A saliva é constituída principalmente de água. Há ainda presença de fosfatos, peptídeos, compostos nitrogenados (uréia e aminoácidos), além de bicarbonato atuando como o principal sistema tampão. Apresenta também uma acentuada concentração de proteínas e glicoproteínas, por exemplo, as mucinas, as quais influenciam diretamente na agregação e aderência dos microrganismos, inclusive atuando com receptores das manoproteínas de superfície de *C. albicans*; interagem com componentes de defesa do hospedeiro e funcionam como fonte primária de nutrientes para a microbiota autóctone (Marsh & Martin, 1992; Pardi & Cardozo, 2002; Simmonds et al., 2002). Siqueira et al., 2005 encontraram fluxo salivar menor em crianças com Síndrome de Down quando comparado ao grupo de crianças sem Síndrome de Down.

Outros fatores como o potencial de óxido-redução (Eh) e o pH, além dos nutrientes, afetam o desenvolvimento microbiano da boca. Embora a cavidade bucal tenha fácil acesso ao oxigênio, a maioria dos microrganismos bucais é facultativa, anaeróbia ou capnofílica. Leveduras do gênero *Candida* são detectáveis mesmo com a diminuição do potencial de óxido-redução bucal, na superfície do esmalte do dente (Marsh & Martin, 1992; Douglas, 2002).

O pH da boca, regulado pela saliva, oscila entre 6,75 a 7,25. O consumo freqüente de carboidratos leva a uma diminuição do pH da boca devido à produção de ácidos e, posteriormente, retorna aos valores fisiológicos (capacidade tampão da saliva). Essas constantes oscilações do pH da boca podem induzir a uma seletividade de microrganismos acidúricos como: *Candida*, *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Lactobacillus*. Todavia o aumento do pH bucal, por exemplo, durante resposta inflamatória favorece a ocorrência do grupo de bactérias alcalófilas como: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella sp*, *Fusobacterium sp* etc (Simmonds et al., 2002). *C. albicans* pode estar presente nesse processo inflamatório uma vez que este fungo leveduriforme, além de oportunista, suporta um amplo espectro de variação de pH entre 2,5 a 7,5 (Webb et al., 1998; Pardi & Cardozo, 2002) e a sua virulência é favorecida pela temperatura corporal de 37°C (Sidrim & Rocha, 2004).

A capacidade tampão da saliva de pacientes com Síndrome de Down entre dois e 60 meses de idade mostrou-se mais alta do que a do grupo controle (crianças sem Síndrome de Down) com variação de pH 6,9 a 4,9 e 6,0 a 4,0; respectivamente (Siqueira et al., 2005).

Outro aspecto importante a ser ressaltado é a elevada prevalência de doença periodontal em crianças com Síndrome de Down. Associação com esta infecção tem sido vinculada à alelobiose microbiológica, relação dos microrganismos entre si, a qual os isolados de *Candida* fazem parte por consequência de formação do biofilme dentário, de baixa higiene bucal e deficiência na capacidade de reparação frente à rápida perda óssea (Ribeiro et al., 2002; Roncari et al., 2002, Guaré & Ciamponi, 2004; Carvalho et al., 2007).

As leveduras do gênero *Candida* podem ainda estar presentes em um dos principais biofilmes, o dentário, como resultado de interassociação microbiana com a massa de polissacarídios no intuito de favorecer a aderência, o desenvolvimento e a multiplicação dos microrganismos sobre essa superfície óssea. A detecção de elevado índice de *Candida* na boca de crianças portadoras da Síndrome de Down assegura sua presença no biofilme dentário e no oriundo também de doença periodontal (Martins et al., 2002b; Carvalho et al., 2007).

1.3.2. Relação intrafamiliar

Em geral, os microrganismos são transmitidos por contato direto ou indireto, por meio de gotículas de secreções respiratórias e pelo ar. No ambiente da assistência à saúde é consenso que a transmissão por contato desempenha o papel mais revelante nesta transmissão. Nas atividades diárias as mãos humanas estão constantemente em intenso contato com o ambiente ao redor e esta forma de transmissão também fica evidente. As cadeias de transmissão de microrganismos são assim demonstradas (Cardoso et al., 2005).

A colonização da boca de crianças acometidas de Síndrome de Down por fungos depende basicamente da transmissão intrafamiliar e as mães são consideradas as principais fontes de infecção, embora a transmissão extrafamiliar também possa ocorrer (Pimenta et al., 2001; Linossier et al., 2002; Scherma et al., 2004; Carvalho et al., 2007).

Três vias de transmissão de leveduras do gênero *Candida* à boca de crianças, inclusive nas portadoras de Síndrome de Down, são comumente relatadas como: a deglutição ou aspiração de secreção vaginal contendo *Candida* no momento do parto, a contaminação cutânea nosocomial e o contato salivar da boca do neonato com a superfície da pele do seio materno durante a amamentação (Menezes et al., 2004; Scherma et al., 2004; Carvalho et al., 2007). A ocorrência freqüente de infecção vaginal por *Candida*, principalmente no último trimestre de gravidez, parece favorecer a colonização rápida da boca de recém-nascidos. Esta via de transmissão faz com que as leveduras possam atuar inicialmente como elemento integrante da microbiota autóctone e seqüencialmente como agente oportunista (Ribeiro, 1997; Scherma et al., 2004; Carvalho et al., 2007).

A colonização da boca de crianças por isolados de *Candida*, mediante contato com a microbiota da pele das mãos de profissionais de saúde, também é descrita (Amorim et al., 1999; Lacaz et al., 1998; Ribeiro et al., 2004; Carvalho et al., 2007). *C. parapsilosis* tem sido uma das espécies de *Candida* comumente associada a esta via de transmissão mediante os cuidados realizados pelo corpo de enfermagem junto aos neonatos (ScharDOSIMI & Cherubini, 2004).

Outra via de contato de *Candida* com a boca de recém-nascidos é durante o processo de aleitamento materno. As leveduras do gênero *Candida*, como elemento integrante da microbiota da pele das mães, embora sejam parcialmente removidas diante do asseio corporal do seio materno, podem colonizar a boca das crianças durante amamentação pelo

contato da saliva da boca do recém-nascido com a superfície do seio materno ainda colonizado por *Candida*. Esta via de disseminação, muitas vezes em crianças portadoras da Síndrome de Down, é dificultada pela hipotonicidade muscular da boca e pelo aspecto psicológico que envolve inicialmente o relacionamento entre pais e filhos (Amorim et al., 1999; Roncari et al., 2002; Menezes et al., 2004; Carvalho et al., 2007).

1.3.3. A resposta imune nos portadores de Síndrome de Down

As crianças portadoras da Síndrome de Down apresentam o sistema imunológico comprometido, o que as tornam predispostas a diversas infecções, principalmente às respiratórias, reações autoimunes e quadros neurológicos parecidos com a doença de Alzheimer. Níveis séricos elevados de anticorpos e citocinas parecem envolvidos neste processo (Rozzone & Mustacchi, 1990; Ammann & Stiehm, 2000, Campos, 2001, Long, 2005; Shimada et al., 2006).

As cinco classes de imunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) atuam como elementos importantes em cada estágio da resposta imunológica humoral. Possuem características marcantes como proteínas antígeno-específicas e atividades biológicas secundárias, que são decisivas na defesa do hospedeiro, como por exemplo, a capacidade de atuar como opsoninas e ativar o sistema complemento (Parslow, 2000; América, 2005).

A imunoglobulina A exerce um papel relevante na imunidade humoral em mucosas. É detectada na saliva dos seres humanos, interferindo na capacidade de proliferação de microrganismos por meio de anticorpos, por exemplo, anti-*Candida*. Esta atividade é muitas vezes afetada pela clivagem do anticorpo exercida através das aspartil proteinases secretadas pelas leveduras do gênero *Candida* (Henning & Perrone, 2001_a).

Indivíduos com Síndrome de Down apresentam deficiência de precursores hematopoiéticos (Holmes et al., 2006; Jablonska et al., 2006), sendo que as subpopulações de linfócitos T tendem ao nível normal com o passar do tempo, o que não acontece com os linfócitos B, que correspondem a 61,0-88,0% da quantidade encontrada em seres humanos desprovidos desta cromossomopatia (Douglas & Stokes Jr., 2005).

Apesar desta deficiência numérica de linfócitos B, a demonstração de aumento sérico de IgA, IgG e eventualmente de IgM e IgD totais tem sido presenciada com transcorrer da idade nestes pacientes com Síndrome de Down (Burgio et al., 1975; Srivastava et al., 1975; Seger et al, 1977; Nishika et al., 1978; Trincado et al., 1984). Os níveis de IgG1 e IgG3 totais aparecem aumentados e relacionados com uma provável resposta humoral adequada, mas os de IgG2 e IgG4 estão diminuídos e predispondo-os a infecções (Mehta et al., 1993; América, 2005). As concentrações de IgA, IgM e IgG na saliva destes indivíduos são normais, mas a percentagem de IgG1 está elevada (Barr-Agholme et al., 1998).

Em relação às proteínas do sistema complemento foi demonstrado que os componentes C3, C4 e C5 estão inalterados nos pacientes com Síndrome de Down (Seger et al., 1977; Trincado et al, 1984), entretanto Stoltzner et al., 2000 verificaram a presença de C1q e C3 nas placas amilóides cerebrais destes indivíduos sindrômicos. O componente C1 do sistema complemento exerce papel relevante no controle de apoptose de células próprias (Flierman & Daha, 2007) e no desenvolvimento de doenças autoimunes e de Alzheimer (Barnun & Szalai, 2006), como também atua controlando quadros infecciosos e processos inflamatórios (Stoltzner et al., 2000). Tais alterações funcionais predisõem a ocorrência de doença periodontal e candidíase bucal em crianças com Síndrome de Down, uma vez que verifica-se deficiência na migração e quimiotaxia dos neutrófilos trissômicos e nas demais funções do sistema imunológico (Ribeiro et al, 2003).

A imunidade celular, mediada por linfócitos T, é a resposta imunológica mais efetiva exercida sobre os fungos (Stites et al., 2000). O papel da imunidade celular no controle de infecção causada por *C. albicans* tem sido demonstrado em modelos experimentais nos quais a dicotomia da resposta do tipo CD₄⁺ Ta1 e CD₄⁺ Ta2 é considerado um fator importante para a suscetibilidade ou resistência à infecção. Enquanto uma resposta tipo Ta1 com produção de IFN- γ e IL-2 está relacionada com a resistência às infecções por *Candida* (Romani et al, 1992_a; Romani et al, 1992_b; Romani et al, 1994; Carvalho et al., 2003) a resposta Ta2, com secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, está associada com a suscetibilidade a este patógeno (Romani et al., 1993; Puccetti et al., 1994; Romani et al., 1994; Spaccapelo et al., 1995; Carvalho et al., 2003).

O aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-1, IL-6, TNF e IFN- γ , em pacientes com Síndrome de Down está relacionado com a gravidade do retardo mental (Carta et al., 2002; Shimada et al., 2006). Franciota et al., 2006 demonstraram que as células Ta1 e Tc, produtoras de IFN- γ , estão elevadas em indivíduos portadores desta alteração cromossômica, bem como a taxa de linfócitos Ta1 (produtores de IFN- γ)/Ta2 (produtores de IL-4). Essas irregularidades podem contribuir para um estado pró-inflamatório nos indivíduos portadores da trissomia do cromossomo 21.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro contra *C. albicans* estão ainda representados pela atividade microbicida de fagócitos e pela citotoxicidade celular mediada pelas células natural killer (NK) (Fulurija et al., 1996; Odds et al., 1988; Carvalho et al., 2003). Embora fagócitos e células NK sejam componentes da resposta imune inespecífica ou inata, a atividade destas células é dependente da resposta imune adaptativa, visto que IL-2 e IFN- γ , produzidos pelas células CD₄⁺ Ta1 e células CD₈⁺, ativam células NK e IFN- γ ativa os fagócitos (Murray et al., 1983; Carvalho et al., 2003). No entanto, as funcionalidades dos linfócitos T e das células NK apresentam-se também alteradas em crianças com Síndrome de Down (Coelho & Loevy, 1982; Carlstedt et al., 1996; Ribeiro et al., 2002).

1.4. Determinantes de virulência em *Candida*

As infecções ocasionadas por leveduras do gênero *Candida* são favorecidas pela ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro. Aliado aos fatores do hospedeiro, este fungo possui propriedades celulares que são capazes de lhes conferir a habilidade de produzir inicialmente o processo de colonização e conseqüentemente a infecção por *Candida*. Aderência, dimorfismo (formação de micélio), variabilidade fenotípica (*switching*), produção de enzimas extracelulares e toxinas constituem os principais fatores relacionados às células fúngicas (Ghannoum & Abu-Elteen, 1990; Vartivarian & Smith, 1993; Matthews, 1994; Odds, 1994; Maffei, 1996; Henning & Perrone, 2001_a; Ribeiro et al., 2002; Pinto, 2003).

O mecanismo de aderência envolve por parte do fungo, glicoproteínas, proteínas do tipo lectinas que apresentam a capacidade de identificar vários tipos de açúcares e receptores para a fração C3b do sistema complemento, e por parte do hospedeiro, receptores celulares para as adesinas de *Candida* como: fibrina, fibronectina e laminina, que favorecem a

infecção pela matriz extracelular (Klotz & Smith, 1991; Greenfield, 1992; Maffei, 1996; Ribeiro, 1997; Pires et al., 2001; Carvalho et al., 2007). Esta capacidade fúngica é influenciada por fatores ambientais como: temperatura, pH, natureza e disponibilidade de nutrientes, IgA secretória e hidrofobicidade de superfícies celulares.

A formação de micélio pelas espécies de *Candida* tem sido relacionada com o aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do formato micelial que favorece maior aderência, dificultando a fagocitose extra e intracelular pelo sistema imune. O dimorfismo morfológico de *C. albicans* é influenciado por fatores séricos, tensão de bicarbonato-CO₂ e citocinas (IFN- γ e prostaglandina E₂) (Kalo-Klein & Witkin, 1990; Maffei, 1996; Gale et al., 1998; Vidotto et al., 2002).

A variabilidade fenotípica, expressa pelo fenômeno de *switching*, é caracterizada pela alta frequência, reversibilidade e por demonstrar diferenças nas propriedades de superfície celular de *C. albicans* e nos aspectos morfológicos das colônias fúngicas, trazendo como consequência alteração na aderência às células epiteliais, na suscetibilidade antifúngica e na atividade fungicida de neutrófilos (Kennedy et al., 1988; Vartivarian & Smith, 1993; Matthews, 1994; Miller & Johnson, 2002; Naglick et al., 2003).

A produção de substâncias toxigênicas (toxicoglicoproteínas e candidotoxinas) ocorre durante processo infeccioso por espécies de *Candida*. Estas toxinas provocam, em determinadas concentrações, a morte de animais de laboratório, suscitam a produção de anticorpos e por ação de toxóides podem ser neutralizadas, demonstrando a sua importância como elemento integrante do mecanismo de infecção fúngica (Iwata, 1975; Ghannoum & Abu-Elteen, 1990; Pardi et al., 2001).

1.5. Caracterização fenotípica de *Candida*

A caracterização fenotípica das leveduras do gênero *Candida* ocorre mediante emprego de métodos de tipagem que avaliam aspectos físico-químicos das colônias fúngicas. Várias metodologias de tipagem têm sido desenvolvidas em busca de melhor individualização dos isolados de *Candida*, caracterização epidemiológica e avaliação de relações filogenéticas.

1.5.1. Morfotipagem

O modelo de morfotipagem para *Candida* foi inicialmente proposto por Phongpaichit et al., 1987 tomando por base as diferenças morfológicas entre as colônias de *C. albicans* mantidas em meio de ágar - extrato de malte, modificado por Hunter et al., 1989. Este método de tipagem analisa a presença, o tamanho e a textura de franjas na borda da colônia, além da sua topografia de superfície. Por possuir bom índice discriminatório, a morfotipagem tem sido empregada em laboratórios onde outros métodos são inviáveis, favorecidas ainda pela facilidade de execução (Cândido, 1991; Hunter, 1991; Maffei, 1996; Ribeiro et al., 2006).

As leveduras de *Candida*, quando morfotipadas em meio contendo ágar - extrato de malte, apresentam geralmente a capacidade de induzir a formação de franjas que é vista como um atributo fúngico de virulência, evidenciado pela capacidade das *C. albicans* de aderir às células de mucosas e a uma grande variedade de superfícies inanimadas, inclusive vidro, como em tubos de ensaio (Kahama et al., 1988; Klotz & Smith, 1990; Bennett et al., 1992; Pires et al., 2001). Pires et al., 2001 determinaram a capacidade de aderência de *C. albicans*, sorotipos A e B, quanto às linhagens de células HeLa e Vero e Douglas, 2002 em relação às próteses dentárias acrílicas.

A relevância da capacidade de formação de franjas por colônias de *C. albicans* reforça a importância desse atributo fúngico no processo de colonização de mucosas. Barreto de Oliveira, 1993 detectou a ocorrência de franjas em cerca de 34,8% das amostras de *C. albicans*, oriundas da boca de pacientes imunossuprimidos. Caramalac, 1995 presenciou a formação de colônias franjadas em todas as amostras de *C. albicans* isoladas da boca de mulheres parturientes e crianças recém nascidas. Maffei, 1996 observou em 93,7% das *C. albicans* obtidas da boca de mulheres gestantes, a formação de colônias franjadas e Lusvardi, 2002 e Giammanco et al., 2005 detectaram, respectivamente, em cerca de 73,8 e 53,6% dos isolados de *C. albicans* da boca de pacientes HIV positivos sob tratamento com drogas antiproteínases e em indivíduos HIV assintomáticos, a capacidade de induzir a formação de colônias fúngicas franjadas.

1.5.2. Tubotipagem

A formação de tubos germinativos permite *Candida* inserir-se às mucosas (Kimura & Pearsall, 1980; Lacaz et al., 1998; Vidotto et al., 2002, Ribeiro et al., 2006). Esta habilidade favorece uma correlação entre a capacidade de aderência de *C. albicans* e o isolamento de leveduras proveniente de tecido parasitado uma vez que a espécie *albicans* forma tubos germinativos mais precocemente que as demais espécies de *Candida* (Lacaz et al., 1998; Sidrim & Rocha, 2004). Vários fatores regulam a transição de células leveduriformes a tubos germinativos e posteriormente a pseudo-hifas e micélios. Estes fatores compreendem: temperatura, pH e meios que contenham substâncias indutoras como: soro, N-acetil-D-glicosamina, L-prolina, etanol e presença de agentes quelantes que inativam a disulfidril redutase, enzima responsável pela redução das pontes di-sulfeto da parede celular. O crescimento miceliano, decorrente da formação de tubos germinativos, é observado como uma repressão da divisão normal da célula leveduriforme, onde as ligações covalentes de di-sulfeto da parede celular não sofram redução enzimática. Esta capacidade fúngica é acompanhada por alterações na composição química e antigênica da célula de *C. albicans*. Na fase filamentosa, a parede celular é composta por três vezes mais quantidade de quitina e a concentração protéica parecem aumentar. A fase leveduriforme pode ser considerada como uma forma mais virulenta, apresentando grande quantidade de mananas na parede celular e pequenas quantidades de glucanas, em relação à forma filamentosa. Estes complexos de mananas da parede celular atuam como toxinas em camundongos e, portanto devem contribuir para uma maior virulência (Souza et al., 1990; Ribeiro, 1997; Lacaz et al., 1998; Sidrim & Rocha, 2004). Tem-se demonstrado *in vitro* que temperatura que oscila entre 37 a 40°C, pH entre 6,5 a 7,0; assim como a presença de uma concentração inicial de leveduras que não exceda a 10⁶ufc/mL, é essencial às detecções de tubos germinativos. Também foi evidenciado que as leveduras do gênero *Candida*, submetidas a pH 2,6; mantêm esta capacidade (Webb et al., 1998), que é vista como uma característica fúngica de virulência (Pinto, 2003). Melo et al., 2003 admitiram que dois genes metabólicos CaHT17 (alta afinidade pelo transporte de hexose) e CaYLL34 (da família AAA ATPase) estariam relacionados com este dimorfismo morfológico de *C. albicans*, tendo em vista o aumento da expressividade protéica dos genes na condição de hifa.

1.5.3. Enzimotipagem

A produção de exoenzimas pela *Candida* constitui um fator determinante de virulência deste fungo leveduriforme, como também permite a sua utilização como um marcador fenotípico para a diferenciação da capacidade enzimática entre isolados de *Candida*. Aspartil proteinases e fosfolipases são as exoenzimas hidrolíticas mais descritas (Maffei, 1996; Oliveira et al., 1998; Ribeiro et al., 2002; Menezes et al., 2004).

A observação do efeito proteolítico extracelular em fungos leveduriformes foi observada inicialmente por Staib (1965), mediante cultivo de *C. albicans* em meio contendo soroalbumina bovina como fonte única de nitrogênio. As aspartil proteinases possuem um peso molecular entre 42 a 45kDa e melhor atividade enzimática a pH 5,0 (Chaffin et al., 1998; Ribeiro, 2002). A produção de aspartil proteinases por leveduras do gênero *Candida* é mediada por uma família de isoenzimas (Saps) de pelo menos 10 genes. Atuam com baixa especificidade pelos substratos e clivam várias proteínas envolvidas na defesa do hospedeiro como: anticorpos IgA e IgG, queratina, hemoglobina, colágeno e mucina (Maffei, 1996; Hube & Naglick, 2001; Stehr et al., 2002). A importância destas enzimas, como fator de virulência fúngica, foi demonstrada por meio de técnica de fluorescência indireta, em pseudomicélios penetrando mucosas, pela inibição de aderência de *C. albicans* a células epiteliais ou a mucosas humanas pela adição de pepstatina A, um reconhecido inibidor de proteases e pela atenuada virulência de mutantes com a deleção de genes SAPs (Borg & Ruchel, 1988; El-Maghrabi et al., 1990; Ruchel et al., 1991; Oller et al., 1994; Hube et al., 1997; Sanglard et al., 1997; Chaffin et al., 1998; Hube & Naglick, 2001; Stehr et al., 2002).

A produção de aspartil proteinases pela *Candida* parece depender da variabilidade dos isolados de *C. albicans* e das diferentes espécies de *Candida*, fazendo com que haja uma tendência de correspondência entre quantificação de proteinases e a ordem de virulência das espécies (*C. albicans* > *C. tropicalis* > *C. parapsilosis* > *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. guilliermondii*) (Ruchel et al., 1983; Maffei, 1996; Xu et al., 2000). Esta capacidade exoenzimática leveduriforme parece também estar relacionada com cada gene SAP que é regulado no nível de transcrição e é diferentemente evidenciada *in vitro* e *in vivo*. Os genes SAPs 1-3 e 4-6 são expressos significativamente em células leveduriformes durante a

capacidade de aderência fúngica e na forma miceliana do fungo, respectivamente. Todavia as amostras de *C. albicans* da boca evidenciam preferencialmente os genes SAPs 1-3, diante da capacidade de adaptar-se a diferentes nichos ecológicos do hospedeiro, secretando um tipo de proteinase específico. A Sap 2 é a enzima mais detectada em casos de candidíase bucal, com máxima produção durante a fase logarítmica de multiplicação do fungo. Esta também é a enzima detectada *in vitro* quando *C. albicans* são expostas a meios de cultura tendo como fonte única de nitrogênio albumina bovina (Ray & Payne, 1990; Wright et al., 1992; De Bernardis et al., 1995; Sanglard et al., 1997; Naglick et al., 1999; Zepellin et al., 1999; Schaller et al., 2001, Sterh et al., 2002).

A secreção extracelular das aspartil proteinases por *Candida* sofre ainda influência do pH da saliva da boca. Pacientes submetidos a tratamentos oncológicos e com alto índice de processos cariogênicos, além de favorecem a proliferação de leveduras na boca, criam condições que propiciam uma maior atividade enzimática proteolítica (Henning & Perrone, 2001_b).

As fosfolipases constituem outro grupo de enzimas associadas aos mecanismos de colonização e/ou infecciosidade de *C. albicans*, sendo descritas inicialmente por Werner (1966) que observou tal atividade entre isolados de *C. albicans* em meio enriquecido com gemas de ovos (fosfodilcolina e fosfatidiletanolamina). Bioquimicamente, as secreções de fosfolipases por cultivos de *Candida* são condicionadas por pH ácido (3,6 a 4,7) e inversamente dependente da concentração de carboidratos como: glicose ou lactose presente no meio de cultura (Prince et al., 1982; Samaranyake & MacFarland, 1990; Henning & Perrone, 2001_a; Ribeiro et al., 2002).

C. albicans secreta as fosfolipases A, B e C. Estas enzimas hidrolisam ligação éster de glicerofosfolipídios. Contudo cada enzima tem a habilidade de clivar uma ligação éster específica. As letras A, B, C e D são usadas para a diferenciação entre as fosfolipases, indicando qual a ligação éster na molécula de fosfolipídio é o alvo de uma determinada enzima (Ghannoum & Rice, 2000; Ribeiro, 2002).

As fosfolipases possuem dupla importância na ação colonizante e/ou infecciosa de *C. albicans*: participa no controle de multiplicação do fungo, em decorrência da sua presença nas extremidades das formas miceliais e atua também na danificação dos constituintes lipídicos da estrutura celular integrante da superfície da mucosa infectada (Henning & Perrone 2001_b; Ribeiro et al., 2002). Dez membros da família de genes lípase

(LIPs 1-10) respondem pela atividade das fosfolipases secretadas pelas *C. albicans*. A maioria destes genes é transcrita durante a transição da fase levedura-hifa e pode ser ainda atribuída, a esta família de enzimas a persistência de *C. albicans* nos tecidos hospedeiros (Hube et al., 2002). A fosfolipase B, produto do gene LIP 1 é a enzima fosfolipidolítica mais estudada em *C. albicans*, com ótima atividade em pH 6,0 e elevada virulência. O método de detecção de fosfolipases *in vitro*, proposto por Prince et al., 1982 permite evidenciar apenas a fosfolipase B uma vez que as zonas de precipitação ao redor das colônias são constituídas por complexos de cálcio com ácidos graxos livres e a atividade transacilase não resulta na liberação de ácidos graxos livres (Ibraim et al., 1995; Ghannoum & Rice, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que a maioria dos isolados de *C. albicans* é produtor de aspartil proteinases e fosfolipases, reforçando a relevância dessas enzimas como elementos integrantes do mecanismo de virulência fúngica. A detecção da produção de enzimas extracelulares por *C. albicans*, isoladas da boca de pacientes diabéticos, fumantes, imunodeprimidos, oncológicos, isenta de lesões clínicas, colonizada por bactérias e fungos e com ausência de dentes cariados, mostrou variações da atividade enzimática com a produção de aspartil proteinases entre 68,7 e 100,0% das amostras e de fosfolipases entre 71,9 e 100,0% (Quirino, 1990; Silveira et al., 1993; Barreto de Oliveira, 1993; Oliveira et al., 1998, Cândido et al., 2000; Martins et al., 2002_a; Mardegan et al., 2006).

1.5.4. Sensibilidade a toxinas *killer*

Polonelli et al., 1990 preconizaram um outro método para tipagem de leveduras denominado de sistema *killer*. Este sistema baseia-se na suscetibilidade dos isolados de *Candida* aos efeitos tóxicos de nove diferentes leveduras *killer* pertencentes ao gênero *Picchia* e *Hansenula*. Quanto às características bioquímicas, estas toxinas são glicoproteínas de baixo massa molecular, sensíveis às enzimas proteolíticas, alterações de temperaturas e pH. Seu mecanismo de ação caracteriza-se por induzir a formação de poros na membrana citoplasmática, acarretando uma alteração da permeabilidade com a saída de íons potássio para o meio, inibição do transporte ativo de aminoácidos, acompanhado de acidificação do interior celular, o que resulta em lise celular (Kogan, 1983; Bendova, 1986; Maffei, 1996; Ribeiro, 1997; Martins et al., 2002_a; Martins et al., 2002_b).

A boa reprodutibilidade do sistema *killer* na tipagem de leveduras fez com que Morace et al., 1984 sugerissem o emprego deste método na caracterização de espécies de leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. A sensibilidade a toxinas *killer* constitui um dos métodos fenotípicos empregados para tipificar leveduras de *Candida*, além de permitir uma melhor compreensão da epidemiologia leveduriforme quanto à variabilidade de isolados envolvidos na colonização de um sítio anatômico e/ou no estabelecimento de uma infecção por *Candida*.

Vários estudos têm evidenciado a diversidade de *killer*-tipos apresentada por *C. albicans* oriundas da boca de indivíduos. Caramalac, 1995 detectou os *killer*-tipos: 211, 288 e 611 de recém-nascidos. Maffei, 1996; os *killer*-tipos: 111, 211 e 212 de gestantes. Oliveira et al., 1998; os *killer*-tipos: 511 e 811 de pacientes oncológicos. Martins et al, 2002_a os *killer*-tipos: 111, 114, 116, 411, 443 e 888 de indivíduos com a boca colonizada por bactérias e fungos. De acordo com esses estudos, verifica-se que o *killer*-tipo 111 é o mais freqüente.

1.5.5. Suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

Os principais agentes antifúngicos, em uso no Brasil, com ação sobre *Candida* são os poliênicos, anfotericina B e nistatina, os azólicos que possuem dois ou três átomos de nitrogênio no anel azólico e são, respectivamente, classificados como: imidazólicos (cetoconazol e miconazol) ou triazólicos (itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol e posaconazol) e os pirimidínicos (5-fluorocitosina) (Colombo, 2003; Sidrim & Rocha, 2004).

As drogas antifúngicas de emprego mais freqüente na clínica terapêutica (poliênicos e azóis) inibem o ergosterol, principal esterol da membrana plasmática dos fungos, e este é análogo ao colesterol de células humanas. O ergosterol está envolvido em funções celulares como a fluidez e integridade da membrana e no funcionamento de várias enzimas que se ligam à membrana da célula fúngica como a quitina sintetase, enzima importante para multiplicação e divisão celular (White et al., 1998; Ribeiro, 2002; Sidrim & Rocha, 2004).

Os poliênicos, anfotericina B e nistatina, atuam diretamente no ergosterol. Apresentam porções hidrofílicas e hidrofóbicas na molécula que se ligam a membrana fúngica formando poros permeáveis à saída de água e de pequenas moléculas essenciais à sobrevivência de microrganismo, especialmente íons de potássio, amônio, fosfato e com o progredir da lesão, também açúcares, éteres, nucleotídeos e proteínas. Em consequência da

alteração da permeabilidade da membrana ocorre apoptose celular (Dommer & Lehrer, 1993; Lance et al., 1995; Barros et al., 2000; Pinto 2003).

Os azólicos, abrangendo imidazólicos e triazólicos, interagem com a enzima lanosterol 14 α -demetilase, um citocromo P-450, com uma molécula heme como sítio ativo, envolvida na biossíntese do ergosterol a partir do esqualeno, o qual é produzido a partir de acetato. Este grupo de drogas liga-se ao átomo de ferro do heme da lanosterol 14 α -demetilase evitando a demetilação do lanosterol. A inativação da enzima leva ao acúmulo de esteróis metilados, precursores do ergosterol, resultando na formação de uma membrana fúngica com estrutura e funções alteradas, que interfere no crescimento do fungo (White et al., 1998; Ghannoum & Rice, 1999; Ribeiro, 2002).

A 5-fluorocitosina é uma pirimidina sintética empregada em um espectro de infecções fúngicas, sendo geralmente utilizada em combinação com anfotericina B no tratamento de algumas micoses profundas, como aquelas causadas por *Cryptococcus neoformans* e espécies de *Candida*. Esta droga penetra na célula fúngica por intermédio de uma citosina-permease específica, não encontrada em células de mamíferos, denominada citosina-desaminase. Em seguida, é convertido em 5-fluoracil e é incorporada a cadeia de RNA em lugar da uracila com alteração da síntese protéica fúngica. A 5-fluorocitosina tem sido muito empregada com a anfotericina B, visto que essas drogas interagem sinergicamente em virtude da ação da anfotericina B, que afeta a permeabilidade celular, permitindo, assim, uma maior penetração e distribuição da 5-fluorocitosina no interior da célula fúngica (Richardson & Warnock, 1999; Sidrim & Rocha, 2004).

O emprego dos testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos tem por finalidade nortear a seleção e controle da terapia antifúngica. Visa à obtenção de informações relevantes quanto à pesquisa de novas substâncias, resistência aos antifúngicos de uso freqüente, controle terapêutico de infecções e caracterização de amostras fúngicas (Colombo et al., 1995; Maffei, 1996; NCCLS, 1998; Pinto, 2003).

A padronização dos testes de suscetibilidade para leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus neoformans* foi definida pelo NCCLS (1997) (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) dos Estados Unidos da América, atualmente denominado de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), a fim de padronizar os resultados. Este método baseia-se na macrodiluição em caldo, com a utilização de um meio quimicamente definido (RPMI-1640 tamponado com MOPS para obtenção de pH 7,0), inóculo padronizado por

espectrofotometria contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL e a leitura após 48 horas de incubação a 35°C. Para facilitar seu emprego é recomendado o micrométodo (microdiluição em placas com múltiplos poços), por ser mais prático (Colombo et al., 1995; Maffei, 1996; NCCLS, 1997; Pinto, 2003; Sidrim & Rocha, 2004).

A aplicabilidade dos métodos de suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos, fazendo uso de testes de diluição em meio líquido e sólido, continua sendo mais empregado no âmbito de pesquisa, visto que a complexidade de execução os torna inviáveis na rotina laboratorial. Embora constitua uma importante ferramenta para todos os pesquisadores da área por sua consistente reprodutibilidade, permitindo comparação de resultados entre os laboratórios, diante da aceitabilidade do protocolo M27-A apresentado pelo NCCLS dos Estados Unidos da América que preconiza os procedimentos para a realização dos testes de suscetibilidade de leveduras aos antifúngicos (anfotericina B, azóis e 5-fluorocitosina) (NCCLS, 1997; Ribeiro, 2002; Pinto 2003; Sidrim & Rocha, 2004).

Estudos realizados com *C. albicans* da boca de pacientes de diversas procedências clínicas mostraram os índices percentuais de isolados sensíveis às drogas antifúngicas testadas. Paniagua et al., 2002; analisando 80 *C. albicans* provenientes da garganta de pacientes atendidos no Hospital Universitário da Universidade do México, detectaram todas as leveduras suscetíveis *in vitro* a anfotericina B e a 5-fluorocitosina. Pinto, 2003 verificou que as 120 *C. albicans* isoladas da boca e esôfago de pacientes HIV positivos, advindos da Santa Casa de Misericórdia e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Espírito Santo foram sensíveis *in vitro* aos antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina. Diaz-Lopes, 2004 detectou que 32 *C. albicans* da boca de pacientes oncológicos, procedentes do Instituto Nacional de Cancerologia da Colombia apresentaram um perfil de suscetibilidade *in vitro* de 78,5% dos isolados a anfotericina B; 32,1% ao itraconazol e 57,1% ao fluconazol. Wingeter et al., 2007 presenciaram em 58 *C. albicans* da boca de pacientes com infecção pelo HIV, atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade de Maringá, suscetibilidade de 96,0% dos isolados a anfotericina B, 56,0% ao fluconazol e 72,0% ao itraconazol.

A constante avaliação *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* resistentes às drogas antifúngicas presentes no mercado constitui uma preocupação clínico-laboratorial freqüente. Derivados poliênicos podem ter a ação farmacológica prejudicada por alterações na composição dos lipídios da membrana plasmática fúngica e a atividade da catalase do fungo

aumentada com reduzida sensibilidade aos danos oxidativos destes medicamentos. Os azólicos, de maneira geral, têm a suscetibilidade reduzida frente aos isolados de *Candida* em decorrência da pouca afinidade de ligação da enzima 14 α -demetilase ao antifúngico, vinculado ao aumento de sua atividade enzimática e elevado conteúdo de ergosterol do fungo. A resistência fúngica às drogas pirimidínicas é provavelmente favorecida pela perda ou mutação de qualquer das enzimas associadas à sua conversão e incorporação à transcrição do RNA do fungo, no caso de *C. albicans*, a constituição deste ácido nucléico é afetada por mutação que inibe a produção de UMP PP-fosforibosil transferase (Zait et al., 1998).

A detecção da suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Candida* às drogas antifúngicas permite delinear o arsenal de fármacos disponível à terapêutica das infecções por *Candida*.

1.6. Genotipagem de *C. albicans*

Os sistemas de tipagem que utilizam métodos de genética molecular têm sido preferidos e recomendados pela sua reprodutibilidade e alto poder discriminatório. Isto ocorre em decorrência destes métodos conseguirem detectar pequenas diferenças nas seqüências de ácidos nucléicos em relação às espécies ou entre isolados pertencentes a uma mesma espécie (Lortholary et al., 1995; Gottfredsson et al., 1998; Olive et al., 1999; Ribeiro, 2002).

As técnicas moleculares, como: a caracterização do DNA mitocondrial, o uso de oligonucleotídeos fluorescentes, o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição), o PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) e o RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA* – DNA Polimórfico de Amplificação Randomizada) são novas ferramentas que vêm sendo empregadas na identificação do genoma, permitindo avaliações sobre a relação filogenética de fungos (Ribeiro, 2002; Pinto, 2003).

Dentre estas técnicas moleculares cabe ressaltar o RFLP, método que consiste basicamente na extração do DNA genômico, digestão com enzimas de restrição que clivam o DNA em sítios específicos. Quando isolados da mesma espécie possuem praticamente a mesma seqüência de DNA. Ao contrário, se isolados apresentam variações na seqüência de nucleotídeos, estas diferenças serão percebidas pelo pleomorfismo dos fragmentos de restrição (Soll, 2000; Ribeiro, 2002).

O PFGE tem sido empregado, por sua vez, na análise de fragmentos cromossômicos de elevado peso molecular. A utilização desta técnica permite analisar padrões de DNA genômico, expressando diferenças significativas discriminatórias e avaliação do polimorfismo cromossômico existente entre as mesmas (Stevens et al., 1990; Vasquez et al., 1991; William et al., 1993; Birren & Lai, 1994; Pinto et al., 2002).

O aprimoramento e as aplicações de metodologias baseadas na PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) permitem intensificar a comparação entre a diversidade de amostras de DNA em análise. As causas do sucesso destas metodologias compreendem: rapidez de execução, reprodutibilidade e a utilização de quantidades mínimas de DNA, além de uma ampla aplicabilidade. A análise do DNA favoreceu atingir altos níveis de sensibilidade e detalhamento das moléculas como, por exemplo: ubiquidade, estabilidade e plasticidade, tornam a técnica ideal para estudos evolutivos e de polimorfismo (Pinto et al., 2002).

A RAPD baseia-se na obtenção de polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente, sem a necessidade de conhecimento prévio de seqüências do DNA do organismo em estudo, não necessitando, portanto de iniciadores específicos (Williams et al., 1990; Wesh & McClelland, 1990). A ligação dos iniciadores a múltiplos sítios do genoma permite a amplificação de segmentos anônimos, que não tem correlação com regiões transcritas ou não transcritas, repetitivas ou não, variáveis ou conservadas. Isto possibilita a produção de padrões de bandeamento que refletem a constituição geral do genoma, permitindo estimar a semelhança genética entre os organismos estudados (Mullis & Faloona, 1987; Williams et al., 1993).

A técnica de RAPD vem sendo aplicada em vários estudos, inclusive nos que envolvam leveduras do gênero *Candida* (Hamelin et al., 1993; Tomerup et al., 1995; Sullivan et al., 1995; Xu et al., 1999; Alonso-Vargas et al., 2000).

Hamelin et al., 1993 e Tomerup et al., 1995 utilizaram a técnica RAPD para identificar diferenças entre algumas espécies do gênero *Candida* e entre linhagens da mesma espécie fisiologicamente semelhantes. A técnica de RAPD pode ser útil na caracterização genotípica para descrição taxonômica, na confirmação de testes bioquímicos de identificação de isolados clínicos e na sorotipagem em investigações epidemiológicas de diversos fungos patogênicos (Sullivan et al., 1995; Xu et al., 1999; Alonso-Vargas et al., 2000; Pinto, 2002).

Sullivan et al., 1995 realizaram os estudos fundamentais para a definição de *C. dubliniensis* como uma espécie diferente de *C. albicans*, pela associação das técnicas de RAPD e cariotipagem. Alonso-Vargas et al., 2000 a utilizaram permitindo separar isolados de *C. albicans* em quatro genótipos diferentes, em relação a um único genótipo observado em *C. dubliniensis*. Resende et al., 2004 e Valério et al., 2006 fazendo uso ainda da técnica RAPD, conseguiram distinguir as espécies de *Candida* (*albicans*, *tropicalis*, *parapsilosis*, *glabrata*, *krusei* e *guilliermondii*) entre si, oriundas de diversos sítios anatômicos devido procedimentos invasivos em pacientes hospitalizados e, intraespecificamente, *C. albicans* isoladas de diversos materiais clínicos, respectivamente.

O emprego e o aprimoramento constante das técnicas de genotipagem vêm permitir uma melhor compreensão sobre as relações filogenéticas das espécies de organismos vivos, inclusive das espécies de *Candida*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

1. Verificar os aspectos biológicos apresentados pelas leveduras de *Candida* isoladas da saliva de crianças com e sem Síndrome de Down e de pais e/ou responsáveis pelas crianças com irregularidade cromossômica e imunológicos das crianças portadoras de Síndrome de Down.

2.2 Objetivos específicos

1. Isolar e identificar leveduras na saliva de crianças com e sem Síndrome de Down e de pais e/ou responsáveis pelas crianças com trissomia 21.
2. Caracterizar por tipagens fenotípicas os isolados de *Candida*.
3. Determinar a suscetibilidade *in vitro* das amostras de *Candida* a quatro antifúngicos.
4. Genotipar e correlacionar às leveduras do gênero *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.
5. Quantificar as imunoglobulinas IgA, IgM e IgG totais no soro sanguíneo das crianças com Síndrome de Down.

3. Materiais e Métodos

3.1. Aspectos éticos do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG) aprovou a presente pesquisa e os pais e/ou responsáveis (P e/ou R) pelas crianças com e sem Síndrome de Down (CCSD e CSSD) forneceram consentimento informado e esclarecido aos pesquisadores para a realização deste trabalho (Anexo 1). Todos os indivíduos, inclusos neste estudo, tiveram assistência odontológica integral, mesmo que diante de livre e espontânea vontade de escolha, vinhessem a desistir de participar da pesquisa e foram cadastrados no Programa de Assistência Odontológica Infantil junto à comunidade da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) (Francisconi & Goldim 1998).

3.2. Delineamento do estudo

Este trabalho foi um estudo de caso controle onde o tamanho das amostras teste e controle advieram de estudo piloto, em decorrência de ausência de prevalência de casos de CCSD portadoras de leveduras de *Candida* na boca. Como também foi efetuado um estudo descritivo do perfil das imunoglobulinas séricas dessas CCSD no intuito de verificar a sua eficácia no processo de defesa do hospedeiro.

O tamanho dos grupos de amostras populacionais (CCSD e CSSD) para este estudo decorreu de prévia análise estatística no propósito que o intervalo de confiança desta amostragem fosse reduzido tornando mais preciso os resultados com *Odds ratio* entre 15,0 a 20,0.

3.3. Amostras de saliva e sangue

Foram coletadas 40 amostras de saliva de CCSD com trissomia 21 simples e uma amostra de saliva dos P e/ou R por cada CCSD. Outras 80 amostras de saliva de CSSD foram

analisadas. Das 40 CCSD foram coletadas uma amostra de sangue. O grupo teste (CCSD), controle (CSSD) e o grupo de P e/ou R foram provenientes dos pacientes atendidos na Unidade da Clínica de Odontologia Infantil da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (UOI/FO/UFG) na cidade de Goiânia, Estado de Goiás/Brasil.

As crianças selecionadas aleatoriamente para este estudo tiveram uma faixa etária de zero a 11 anos de idade, ambos os gêneros, mucosa da boca íntegra, sem manifestação clínica de doença, que não estivesse fazendo uso de antimicrobiano há um mês e que possuíam exame clínico-bucal considerado fisiologicamente normal após avaliação odontológica. Os P e/ou R também apresentavam a boca clinicamente sadia após exame odontológico (Anexo 2).

3.4. Coleta de saliva e sangue

A saliva foi coletada com *swabs* esterilizados da mucosa jugal das crianças e dos demais pacientes inclusos neste estudo para o isolamento de leveduras do gênero *Candida*. Em seguida foi depositada em tubos de ensaio 15x160mm, fechados com tampão de algodão hidrófobo, contendo 4,0mL de solução salina e transportada ao Laboratório de Fungos Patogênicos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (LFP/IPTSP/UFG).

Para obtenção do soro, foram coletados 3,0 a 5,0mL de sangue em uma punção venosa de cada CCSD. O soro obtido por centrifugação foi armazenado em três alíquotas e mantido em freezer a - 70°C para a formação da soroteca. Este material biológico foi mantido no Laboratório de Imunologia do IPTSP/UFG

3.5. Isolamento, identificação e manutenção de leveduras

Após a homogeneização de cada solução de salina pelo *swab*, contendo saliva dispersa no meio, este material foi semeado assepticamente, em duplicata, em tubos de ensaio de 15x160mm, fechados com tampão de algodão hidrófobo, contendo 5,0mL de ágar Sabouraud dextrose inclinado acrescido de 0,1mg.mL⁻¹ de cloranfenicol, pH ajustado entre 5,6 a 6,0 e mantido a temperatura ambiente por 15 dias.

As colônias leveduriformes de cor branco-amareladas, cremosas e úmidas, que se desenvolveram, foram identificadas, segundo Kreegen-Van Rij, 1984 e Lacaz et al., 1991 e mantidas na micoteca à temperatura ambiente com repiques bimestrais.

Uma amostra de *C. albicans* ATCC 18804 foi empregada como controle positivo em todos os testes realizados.

A composição dos meios de cultura, procedência e preparação estão descritas em Anexo 3.

3.5.1. Teste de Reynolds-Braude

As amostras de *Candida*, cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24-48 horas, foram inoculadas, após obtenção de suspensão de 1,0mL em água destilada e autoclavada, contendo aproximadamente 10^2 a 10^3 ufc/mL através de contagem das células em câmara de Neubauer, centrifugação a baixa rotação e ressuspensão, em tubos de ensaio de 13x60mm, contendo 0,5mL de soro fetal bovino, em banho-maria a 37°C por quatro horas. Durante este período, a cada intervalo de uma hora, uma gota de suspensão destas amostras foi examinada ao microscópio (objetiva de 40X) entre a lâmina e lamínula. A evidenciação do tubo germinativo configura teste positivo.

3.5.2. Microcultivo em lâmina

Volumes de 3,0mL de ágar *corn-meal*, fundido, foram distribuídos, com auxílio de uma pipeta esterilizada, em camada fina sobre lâminas previamente preparadas em câmara de microcultivo (placas de Petri de 20x100mm, bastão de vidro em U, lâmina, lamínula e chumaço de algodão hidrófilo) em condições assépticas. Após a solidificação do meio, os isolados, cultivados por 24-48 horas em ágar Sabouraud dextrose, foram semeados em três estrias finas na superfície do ágar e coberta com lamínula. Foi adicionada água destilada e esterilizada ao algodão, presente na placa, para obtenção de uma câmara úmida. O sistema foi fechado e incubado a 25°C por até 96 horas. As leituras foram realizadas diariamente, pesquisando-se a presença de micélios verdadeiros, pseudomicélios, blastósporos e clamidósporos.

3.5.3. Testes bioquímicos

3.5.3.1. Auxanograma

Foi realizado pela adição de 2,0mL de cada suspensão das leveduras cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 24-48 horas (inóculo preparado em solução salina esterilizada e ajustado em 3 na Escala de McFarland) a uma placa de Petri de 20x100mm e, em seguida, vertido 18mL de meio básico de carbono resfriado a 45°C. Após a solidificação, adicionaram-se em pontos equidistantes os açúcares (dextrose, maltose, galactose, lactose, sacarose, rafinose e celobiose), incubando-se a 25°C por 96 horas. As leituras foram realizadas diariamente, objetivando verificar a assimilação de cada açúcar, mediante a formação de halos claros.

3.5.3.2. Zimograma

O teste foi realizado mediante a inoculação de 0,1mL de suspensão de leveduras, cultivadas por 24-48 horas em ágar Sabouraud dextrose, na turbidez 3 na Escala de McFarland em tubos de ensaio de 12x120mm, contendo 5,0mL de meio básico com açúcar (maltose, glicose, sacarose ou lactose) a 2%, fechado com tampão de algodão hidrófobo e incubado a 25°C por 20 dias. A formação de gás no interior dos tubos de Durham foi observada, diariamente, para verificar a fermentação dos açúcares, mediante mudança de coloração do meio.

3.6. Determinação das características fenotípicas de *Candida*

3.6.1. Morfotipagem

A morfotipagem foi realizada segundo Phongpaichit et al., 1987 e Hunter et al., 1989. As leveduras do gênero *Candida*, cultivadas em tubos de ensaio de 15x160mm contendo ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a 25°C, foram utilizadas na preparação de 3,0mL de suspensões feitas em água destilada e esterilizada (inóculo ajustado a 3 na Escala de McFarland). Cada suspensão foi inoculada (três por placa de Petri de 20x100mm) na superfície do ágar extrato de malte com auxílio de *swabs* esterilizados a fim de formar uma

estria padronizada de 8mm de largura por 60mm de comprimento. As placas foram incubadas a 25°C por dez dias, com a inoculação de cada levedura sempre realizada em duplicata. A leitura foi feita com base nos aspectos macromorfológicos da franja e topografia da colônia. A mesma foi codificada pela seqüência de quatro dígitos conforme modelo proposto por Hunter et al., 1989 (Quadro 1).

Quadro 1. Modelo de tipificação de morfotipos de espécies de *Candida* 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 conspicuos em leque	5
	Contínua, com filamentos paralelos	7
2ª Franja – Comprimento	Ausente	0
	Igual ou menor a 2mm	2
	Entre 3 a 5mm	3
	Igual ou maior a 6mm	5
3ª Franja – Textura	Ausente	0
	Muito grosseira	1
	Grosseira	2
	Intermediária	3
	Fina	4
4ª Superfície – Topografia	Lisa	0
	Nodular	1
	Escavada	2
	Crateriforme	4
	Crateriforme com dobras e pregas	5
	Dobras e pregas	6
	Pêlos	8

3.6.2. Tubotipagem

Descrito no teste de Reynolds-Braude (item 3.5.1).

3.6.3. Enzimotipagem (aspartil proteinases e fosfolipases)

As amostras de *Candida*, obtidas de culturas de 24-48 horas em ágar Sabouraud dextrose, foram semeadas com alça de platina em pontos equidistantes no meio de albumina (placas de Petri de 20x100mm) e incubadas a 37°C durante 24-48 horas para a detecção de produção de aspartil proteinases (Rüchel et al., 1982) e no meio enriquecido com gemas de ovo (placas de Petri de 20x100mm) e incubadas por 72-96 horas a 37°C para verificação da produção de fosfolipases (Prince et al., 1982). A leitura de cada atividade enzimática (P_z) das amostras-teste decorreu da detecção de um halo opaco de precipitação ao redor do ponto de inoculação das amostras de levedura, medida através da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (dcp), ou seja, $P_z = dc/dcp$ e utilizada como unidade de medida o centímetro (cm). Os resultados foram divididos em cinco níveis para melhor diferenciação e visualização da atividade enzimática por leveduras do gênero *Candida*:

$P_z = 1,00$ – produção ausente (PA)

$0,99 \leq P_z \leq 0,75$ – produção fraca (PF)

$0,74 \leq P_z \leq 0,50$ – produção intermediária (PI)

$0,49 \leq P_z \leq 0,25$ – produção alta (PAL)

$0,24 \leq P_z \leq n$ – produção muito alta, (PMAL), sabendo que $n = \{x \in \mathbb{R} / x < 0,24 \text{ e } \pm 0\}$

3.6.4. Tipagem pela sensibilidade a toxinas *killer*

Os isolados de *Candida* estudados, bem como as leveduras produtoras de toxinas *killer* (K_1 a K_9), foram previamente incubadas em meio de ágar Sabouraud dextrose modificado, sem azul de metileno, a 25°C por 48 horas antes dos testes. Das amostras-teste, foi preparada uma suspensão em tubos de ensaio de 13x60mm, contendo 1,0mL de água destilada e esterilizada, propiciando a formação de inóculo correspondente a 5 na escala McFarland, e esta foi adicionada e homogenizada, em placa de Petri 20 x 100mm esterilizada, com 20mL do meio de Sabouraud modificado previamente fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização, foi semeada com alça de platina no meio solidificado, em pontos equidistantes, às amostras de leveduras *killer* (K_1 a K_9). As placas foram incubadas a 25°C por

72 horas. Foram considerados sensíveis (+), os cultivos que produziram halo incolor e/ou zona de inibição com colônias azuis, ao redor do cultivo padrão, e resistentes (-), crescimento ao redor das leveduras *killer*. Os resultados da tipagem foram designados pelo esquema proposto por Polonelli et al., 1990 composto por três dígitos, onde cada um representa a combinação dos resultados obtidos no conjunto de três cepas padrão (Quadro 2).

Quadro 2. Código de leitura aplicado ao sistema *killer* proposto por Polonelli et al., 1990

Atividade do 1 ^o “triplet” de leveduras				Atividade do 2 ^o “triplet” de leveduras				Atividade do 3 ^o “triplet” de leveduras			
K ₁	K ₂	K ₃	Código	K ₄	K ₅	K ₆	Código	K ₇	K ₈	K ₉	Código
+	+	+	1	+	+	+	1	+	+	+	1
+	+	-	2	+	+	-	2	+	+	-	2
+	-	+	3	+	-	+	3	+	-	+	3
-	+	+	4	-	+	+	4	-	+	+	4
+	-	-	5	+	-	-	5	+	-	-	5
-	+	-	6	-	+	-	6	-	+	-	6
-	-	+	7	-	-	+	7	-	-	+	7
-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-	8

Legenda : - levedura sem halo claro ao redor das leveduras-padrão *killer*
 + levedura com halo claro ao redor das leveduras-padrão *killer*

3.6.5. Determinação da suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

Todas as amostras de *Candida* identificadas foram testadas quanto à suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas (anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina), utilizando a técnica de microdiluição em meio líquido proposto pelo NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standards*) dos Estados Unidos da América (NCCLS, 1997). A anfotericina B e a 5-fluorocitosina foram obtidas da *Sigma Chemical Company* e mantidas a 4°C. Os triazólicos (fluconazol e itraconazol) foram utilizados em sua preparação comercial (Triazol – cápsulas com 150mg de fluconazol e Sporanox - cápsulas com 100mg de itraconazol). Para o preparo da solução-estoque foram pesados 5mg de cada droga.

A anfotericina B e o itraconazol foram solubilizados em DMSO, na concentração de 1% do volume da solução-estoque. O itraconazol foi mantido em banho-maria a 70°C para

sua total dissolução. Quanto à solubilização de fluconazol e a 5-fluorocitosina, foi empregada água destilada.

Para o poliênico anfotericina B foi preparada solução-estoque a 640µg/mL, para a 5-fluorocitosina 1000µg/mL, para o fluconazol 1250µg/mL e para o itraconazol foi correspondente a 1280µg/mL. A partir das soluções-estoque foram realizadas diluições seriadas das drogas em meio sintético RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com tampão MOPS para obtenção das concentrações desejadas das drogas antifúngicas.

Uma seqüência de 12 tubos de hemólise foi separadamente preparada para cada droga e a cada uma delas foi adicionado 1mL de meio, sendo que ao primeiro, foram adicionados 9mL de meio e 1mL da solução-estoque da droga previamente preparada. Em seguida, deu-se início a diluição seriada retirando-se 10mL do primeiro tubo e passando ao segundo e assim sucessivamente. As concentrações testadas correspondem a intervalos citados na literatura micológica como padrão de suscetibilidade de amostras de *Candida*. Para a anfotericina B foram utilizadas as seguintes concentrações: 0,02; 0,04; 0,08; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 16,0µg/mL; para a 5-fluorocitosina: 0,012; 0,024; 0,049; 0,09; 0,19; 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25 e 12,5µg/mL, para o itraconazol: 0,04; 0,08; 0,16; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 e 32,0µg/mL e para o fluconazol: 0,08; 0,16; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0 e 64,0µg/mL. Todas as drogas foram preparadas no momento do teste.

O inóculo de *Candida* foi cultivado em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas a 25°C. Esta solução foi preparada em 5mL de água deionizada esterilizada e a densidade celular ajustada em espectrofotômetro para transmitância de 85% em comprimento de onda de 530nm, resultando em uma solução aproximadamente com um inóculo entre $0,5 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ ufc/mL.

Para a realização da técnica de microdiluição, foram utilizadas placas de acrílico com 96 orifícios de fundo chato e com tampa (Difco, Detroit, USA). Em cada orifício, foram dispensados 100µg/mL da concentração da droga antifúngica e 100µg/mL da solução de suspensão de *Candida*-teste. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As placas com anfotericina B foram cobertas com papel alumínio para a proteção contra a luz.

A concentração inibitória mínima (CIM), para drogas azólicas, foi definida como sendo o primeiro poço da placa com redução de 50,0% do crescimento celular leveduriforme, comparado ao crescimento do controle positivo (meio sem droga). Para

anfotericina B e 5-fluorocitosina, a CIM foi definida como a mais baixa concentração capaz de inibir qualquer crescimento visual.

3.7. Similaridade genética de *Candida*

3.7.1. Extração de DNA

Os pares de *C. albicans* isolados da boca de CCSD e P e/ou R foram cultivadas em meio YEPD a 37°C por 24 a 48 horas.

A extração do DNA genômico foi baseada no método descrito por Del Poeta et al., 1999; modificado por Casali et al., 2003. Após o cultivo deste fungo leveduriforme em ágar YEPD, um inóculo de *C. albicans* foi suspenso em 0,5mL de TENTS, contendo 0,2mL de pérolas de vidro de 0,45mm e 0,5mL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:10). O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado em vortex por dois minutos. Após a centrifugação por dez minutos a 13.000g, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, adicionado etanol 100% e submetido à temperatura de - 20°C por uma hora para a precipitação do DNA. O DNA precipitado foi ressuspensionado em 0,5mL TE contendo 50µg/mL de RNase e incubado a 37°C durante 30 minutos. O DNA foi desproteíneo e extraído da amostra pela adição de igual volume de fenol:clorofórmio. Em seguida, o DNA foi precipitado com etanol 70% e depois de seco, foi ressuspensionado em 100µg/mL de TE e estocado a - 20°C.

3.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para PCR foram usados 2µL (100ng/µL) do DNA de *Candida*, 5µL de tampão de PCR 10X (Tris-HCl 200mM, pH 8,4 e KCl 500mM), dNTP 200µM, MgCl₂, *primer* 1µM e Taq Polimerase 1,5U (Invitrogen). Os *primers* utilizados na reação foram RSD10 5'-CCGCAGCCA-3' e RSD12 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3' (IDT Technologies) (Samaranayake et al., 2003). O DNA foi desnaturado por cinco minutos a 94°C acrescido de cinco ciclos que incluíam 30 segundos de desnaturação a 94°C, dois minutos de anelamento a 52°C e dois minutos de extensão do *primer* a 72°C, seguido por 45 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 94°C, dois minutos de anelamento e dois minutos de extensão do *primer* a

72°C. A reação foi mantida a 72°C por 15 minutos. Tubos controle sem DNA foram incluídos em cada conjunto de reações e a reprodutibilidade foi observada (Lehmann et al., 1992; Steffan et al., 1997). O gel foi corrido a temperatura ambiente em tampão TBE. Após, foi realizada a eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio.

3.8. Dosagem de imunoglobulinas séricas totais por turbidimetria

Este teste baseou-se na precipitação de IgA, IgM ou IgG presente no soro por anticorpos anti-IgA, IgM ou IgG humana. A concentração do anticorpo na amostra foi diretamente proporcional à dispersão de luz gerada pelo complexo antígeno-anticorpo que foi medida por turbidimetria. As amostras e os reagentes foram pré-aquecidos a 37°C. Anti-IgA ou anti-IgM (500µL) acrescida de 25µL de soro teste diluído 1/10 em salina, ou anti-IgG (500µL) acrescida de 10µL do soro teste diluído 1/10 em salina, foi incubada por cinco minutos a 37°C, lendo-se a absorbância a 340nm exatamente cinco minutos após a adição da amostra (*kits* Bioclin K061, K062 e K063). A curva de calibração foi traçada lançando a absorbância das amostras do padrão (*kit* calibrador, Bioclin K064) na ordenada (aplicando-se o fator de correção indicado pelo fabricante) e concentração de IgA, IgM ou IgG em mg/dL na abcissa. Após adição de linha de tendência, calculou-se a concentração de anticorpos aplicando-se a fórmula vinculada ao gráfico. Os valores de referências são mostrados no quadro 3 das imunoglobulinas séricas humanas.

Quadro 3. Valores de referências das imunoglobulinas séricas humanas

Idade	IgA (mg/dL)	Idade	IgM (mg/dL)	IgG (mg/dL)
Sangue do cordão umbilical	até 4	Neonatos	9 a 35	50 a 1.500
1 mês	até 50	1 a 3 meses	10 a 87	190 a 780
2 a 5 meses	4 a 80	3 a 5 meses	15 a 120	60 a 860
6 a 9 meses	8 a 80	6 a 12 meses	18 a 104	250 a 1.180
10 a 12 meses	15 a 90	1 a 2 anos	20 a 190	350 a 1.200
1 a 2 anos	15 a 110	2 a 4 anos	20 a 200	500 a 1.440
2 a 3 anos	18 a 150	4 a 8 anos	20 a 210	610 a 1.420
4 a 5 anos	25 a 180	8 a 9 anos	20 a 175	570 a 1.410
6 a 8 anos	35 a 265	9 a 11 anos	30 a 155	630 a 1.400
9 a 12 anos	68 a 333	11 a 15 anos	30 a 150	630 a 1.510
Adultos	70 a 380	Adultos	38 a 280	650 a 1.500

Fonte: Bioclin (Quibasa Química Básica Ltda)

3.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados, quando pertinente, através do teste qui-quadrado (X^2), para a análise de homogeneidade de proporções, utilizando um nível de significância igual a 0,05 (Tabelas 1, 5, 6 e 7).

4. Resultados

4.1. Isolamento e identificação de *Candida*

Das 160 amostras de saliva coletadas de crianças com (CCSD) e sem Síndrome de Down (CSSD) e pais e/ou responsáveis (P e/ou R), verificou-se o isolamento de sessenta (60/160) (37,5%) leveduras do gênero *Candida*. Dos cultivos de *Candida*, trinta e sete (37/40) (92,5%) leveduras foram detectadas no grupo de CCSD, catorze (14/80) (17,5%) no grupo controle (CSSD) e nove (9/40) (22,5%) no grupo de P e/ou R. Todas as leveduras isoladas foram identificadas como *C. albicans* (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de *Candida albicans* nos grupos de crianças com e sem síndrome e pais e/ou responsáveis atendidos na UOI/FO/UFG.

Saliva	Leveduras do gênero <i>Candida</i>		<i>C. albicans</i>					
			Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Positiva	60	37,5	37	92,5	14	17,5	09	22,5
Negativa	100	62,5	03	7,5	66	82,5	31	77,5

Legenda: n – número
% – por cento

Relação entre o número de indivíduos portadores de *C. albicans* na boca:

CCSD x CSSD $X^2 = 61,4$; $p < 0,05$

CCSD x P e/ou R $X^2 = 40,1$; $p < 0,05$

As CCSD portadoras de *C. albicans* apresentaram uma média de idade de 6,5 anos, sendo que a faixa etária entre quatro a sete anos de idade apresentava um acentuado número de crianças. No grupo CSSD, a faixa etária de oito a 11 anos de idade caracterizou-se por uma maior quantidade de crianças e média de idade de 6,7 anos (Tabela 2). Os P e/ou R apresentaram uma variação de idade de 30 a 55 anos de idade e média de idade de 39,4 anos.

Tabela 2. Faixa etária das crianças com e sem Síndrome de Down portadoras de *Candida albicans* na boca.

Idade (Anos)	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)	
	n = 37	(%)	n = 14	(%)
0 – 3	09	(21,6)	02	(14,3)
4 – 7	15	(40,6)	05	(35,7)
8 – 11	13	(35,1)	07	(50,0)

Legenda: n – número
% – por cento

Em ambos os grupos teste e controle (CCSD e CSSD), houve predomínio de indivíduos de gênero masculino. No grupo de P e/ou R caracterizou-se ainda a figura da mãe como o elemento familiar responsável pela curadoria dos filhos (Tabela 3).

Tabela 3. Gênero das crianças e pais e/ou responsáveis colonizados por *Candida albicans* na boca.

Gênero	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	(%)	n = 14	(%)	n = 09	(%)
Masculino	25	(67,6)	12	(85,7)	01	(11,1)
Feminino	12	(32,4)	02	(14,3)	08	(88,9)

Legenda: n – número
% – por cento

4.2. Características fenotípicas das *C. albicans*

4.2.1. Morfotipagem

A morfotipagem de 60 *C. albicans*, oriundas da boca de CCSD, CSSD, P e/ou R, permitiu caracterizar 13 morfotipos diferentes. No grupo teste (CCSD) observou-se o predomínio do morfotipo 5530 (colônia fúngica com franja contínua em leque, igual ou maior

a 6mm, de textura intermediária e superfície lisa). Ambos os grupos controle (CSSD) e P e/ou R caracterizaram-se pelo elevado número de *C. albicans* morfotipo 5240 (colônia fúngica com franja contínua em leque, igual ou menor a 2mm, de textura fina e superfície lisa) (Tabela 4 e Figura 1).

Tabela 4. Morfotipos presenciados em *Candida albicans* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.

<i>C. albicans</i>	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	%	n = 14	%	n = 09	%
2330	-	-	02	14,3	-	-
3240	02	5,4	-	-	-	-
3340	02	5,4	-	-	-	-
5230	-	-	-	-	02	22,2
5240	-	-	06	42,9	04	44,5
5320	02	5,4	03	21,4	-	-
5330	07	19,0	03	21,4	-	-
5340	03	8,1	-	-	-	-
5520	-	-	-	-	01	11,1
5530	15	40,5	-	-	02	22,2
5540	03	8,1	-	-	-	-
7530	01	2,7	-	-	-	-
7540	02	5,4	-	-	-	-

Legenda: n – número
% – por cento



Figura 1. Morfotipos de *C. albicans* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down em meio de ágar - extrato de malte (Morfotipos: 5330 – colônia fúngica com franja contínua em leque com 3 a 5mm, de textura intermediária e superfície lisa; 5530 – colônia fúngica com franja contínua em leque igual ou maior a 6mm, de textura intermediária e superfície lisa e 7540 – colônia fúngica com franja contínua paralela igual ou maior a 6mm, de textura fina e superfície lisa).

4.2.2. Tubotipagem

A formação de tubos germinativos por *C. albicans*, em presença de soro fetal bovino, foi observada nos isolados dos grupos de CCSD, CSSD e P e/ou R, em maior quantidade, após o intervalo de tempo de duas horas. Vinte isolados (33,3%) de *C. albicans* pertencentes aos grupos teste e controle (CCSD e CSSD) e de P e/ou R o formaram dentro de uma hora (Tabela 5 e Figura 2).

Tabela 5. Formação de tubos germinativos por *Candida albicans* oriundas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis em soro fetal bovino.

<i>C. albicans</i> Tubos germinativos	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	%	n = 14	%	n = 09	%
1 h	17	45,9	02	14,3	01	11,1
2 h	20	54,1	12	85,7	08	88,9

Legenda: h – horas

n – número

% – por cento

Relação entre o intervalo de tempo, entre uma a duas horas, necessário à formação de tubos germinativos em soro fetal bovino: CCSD x CSSD $X^2 = 4,3$; $p < 0,05$

CCSD x P e/ou R $X^2 = 4,8$; $p < 0,05$

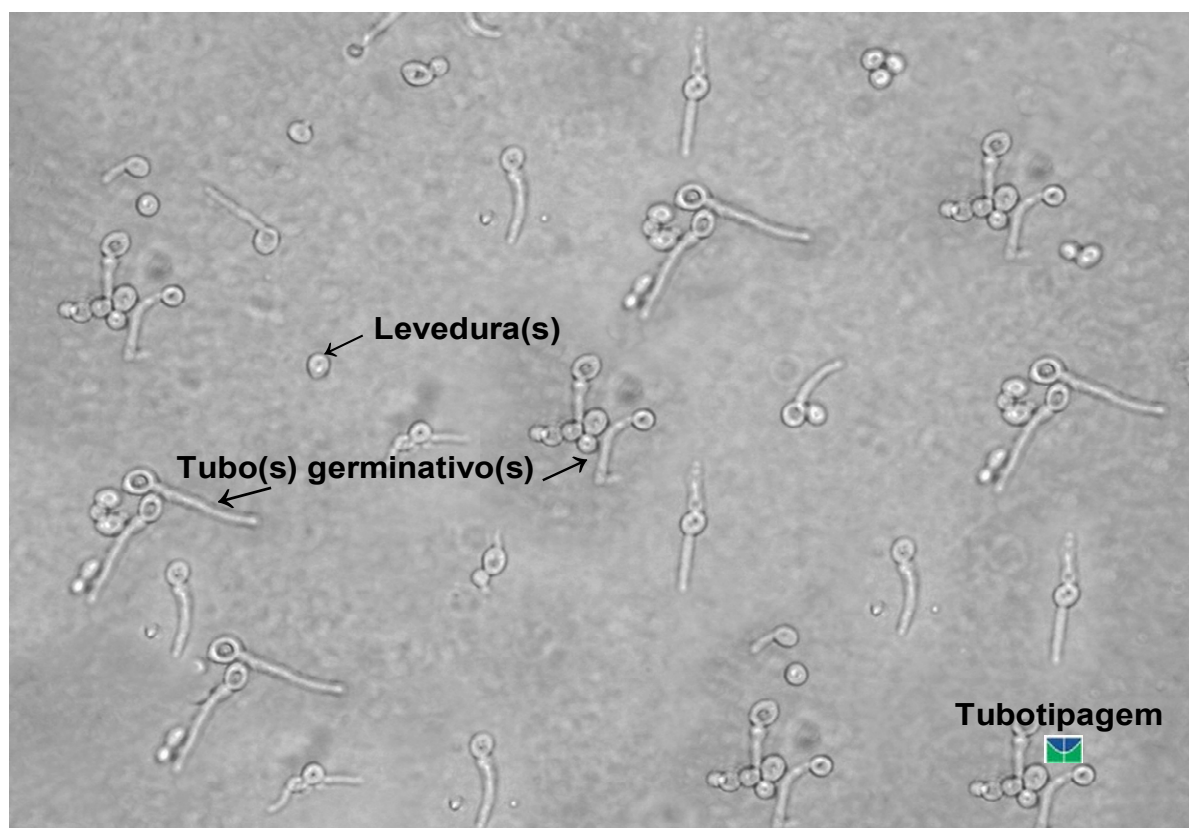


Figura 2. Formação de tubos germinativos por *C. albicans* oriundas da boca de crianças com Síndrome de Down em soro fetal bovino a 37°C.

4.2.3. Enzimotipagem

4.2.3.1. Aspartil proteinases

Todas as *C. albicans* isoladas da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R mostraram-se produtoras de aspartil proteinases. No grupo de CCSD detectou-se *C. albicans* com produção de aspartil proteinases de intermediária a muito elevada, havendo 27 (73,0%) *C. albicans* com produção alta a muito alta desta exoenzima. Os grupos de CSSD e P e/ou R apresentaram o maior número de *C. albicans* com produção intermediária (Tabela 6 e Figura 3).

Tabela 6. Produção de aspartil proteinases por *Candida albicans* da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.

<i>C. albicans</i> Aspartil Proteinases (P _z)	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	%	n = 14	%	n = 09	%
PA	-	-	-	-	-	-
PF	-	-	01	7,1	-	-
PI	10	27,0	10	71,5	06	66,7
PAL	21	56,8	02	14,3	01	11,1
PMAL	06	16,2	01	7,1	02	22,2

Legenda: n – número

% – por cento

P_z – Zona de precipitação enzimática
medida em centímetro (cm)

PA – Produção Ausente (P_z = 1,00)

PF – Produção Fraca (0,99 ≤ P_z ≤ 0,75)

PI – Produção Intermediária (0,74 ≤ P_z ≤ 0,50)

PAL – Produção Alta (0,49 ≤ P_z ≤ 0,25)

PMAL – Produção Muito Alta, sabendo que n = {x ∈ R/ x < 0,24 e ± 0}

Relação entre a produção de aspartil proteinases de fraca/intermediária à alta/muito alta por isolados de *C. albicans* da boca: CCSD x CSSD X² = 11,6; p < 0,05
CSSD x P e/ou R X² = 5,0; p < 0,05

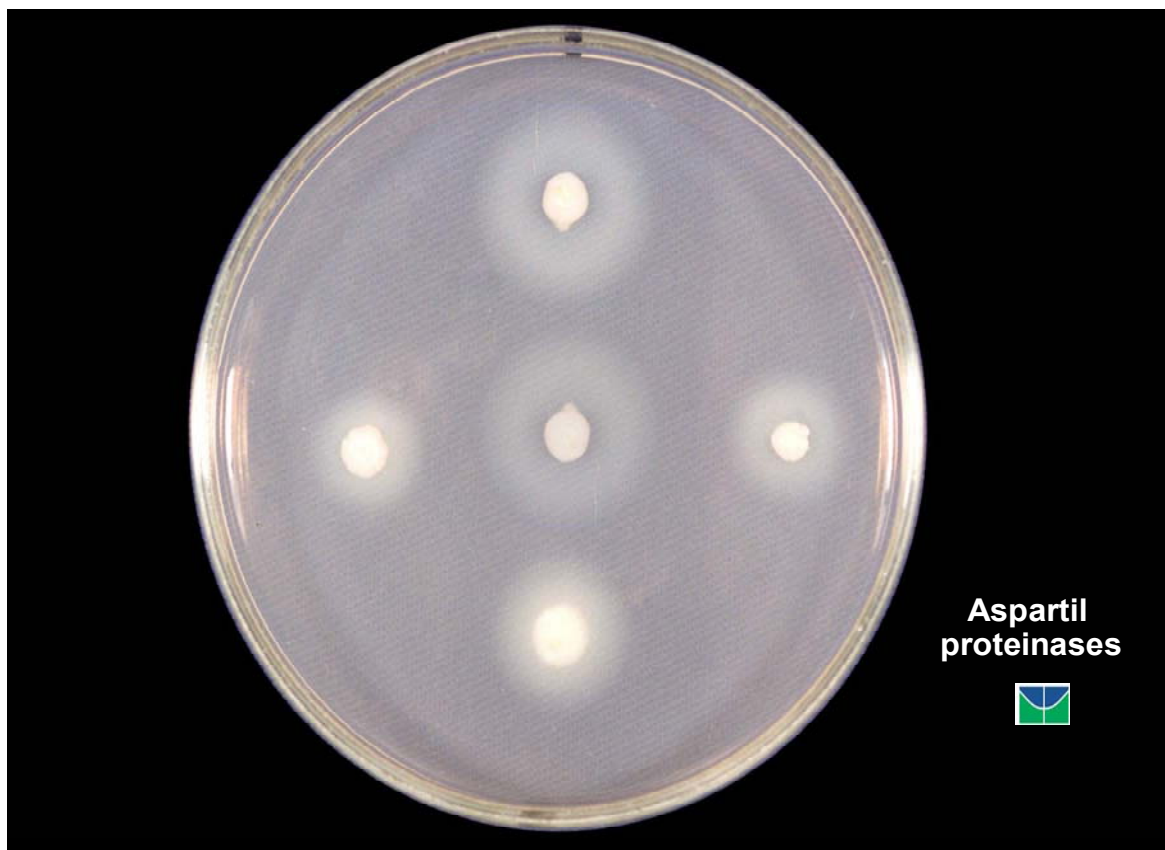


Figura 3. *C. albicans* provenientes da boca de crianças com Síndrome de Down produtoras de aspartil proteinases em meio básico de albumina.

4.2.3.2. Fosfolipases

C. albicans da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R caracterizaram-se por produção de fosfolipases de ausente a altamente produtiva. Trinta e quatro (91,9%) *C. albicans* do grupo de CCSD apresentaram-se produtoras de fosfolipases com predomínio de leveduras com produção alta a muito alta. No grupo de CSSD, a produção exoenzimática foi observada em 13 (92,9%) isolados e oito (88,9%) no grupo de P e/ou R. Dentre as *C. albicans* da boca de CSSD e P e/ou R, a maioria das leveduras mostraram-se com produção enzimática de intermediária a fraca (Tabela 7 e Figura 4).

Tabela 7. Perfil da atividade de fosfolipases por *Candida albicans* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.

<i>C. albicans</i> Fosfolipases (P _z)	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	%	n = 14	%	n = 09	%
PA	03	8,1	01	7,1	01	11,1
PF	02	5,4	02	14,3	02	22,2
PI	02	5,4	10	71,5	05	55,6
PAL	24	64,9	01	7,1	01	11,1
PMAL	06	16,2	-	-	-	-

Legenda: n – número

% – por cento

P_z – Zona de precipitação enzimática
medida em centímetro (cm)

PA – Produção Ausente (P_z = 1,00)

PF – Produção Fraca (0,99 ≤ P_z ≥ 0,75)

PI – Produção Intermediária (0,74 ≤ P_z ≥ 0,50)

PAL – Produção Alta (0,49 ≤ P_z ≥ 0,25)

PMAL – Produção Muito Alta, sabendo que $n = \{x \in R / x < 0,24 e \neq 0\}$

Relação entre a produção de fosfolipases de fraca/intermediária à alta/muito alta por amostras de *C. albicans* da boca: CCSD x CSSD $X^2 = 27,1$; $p < 0,05$

CSSD x P e/ou R $X^2 = 19,4$; $p < 0,05$

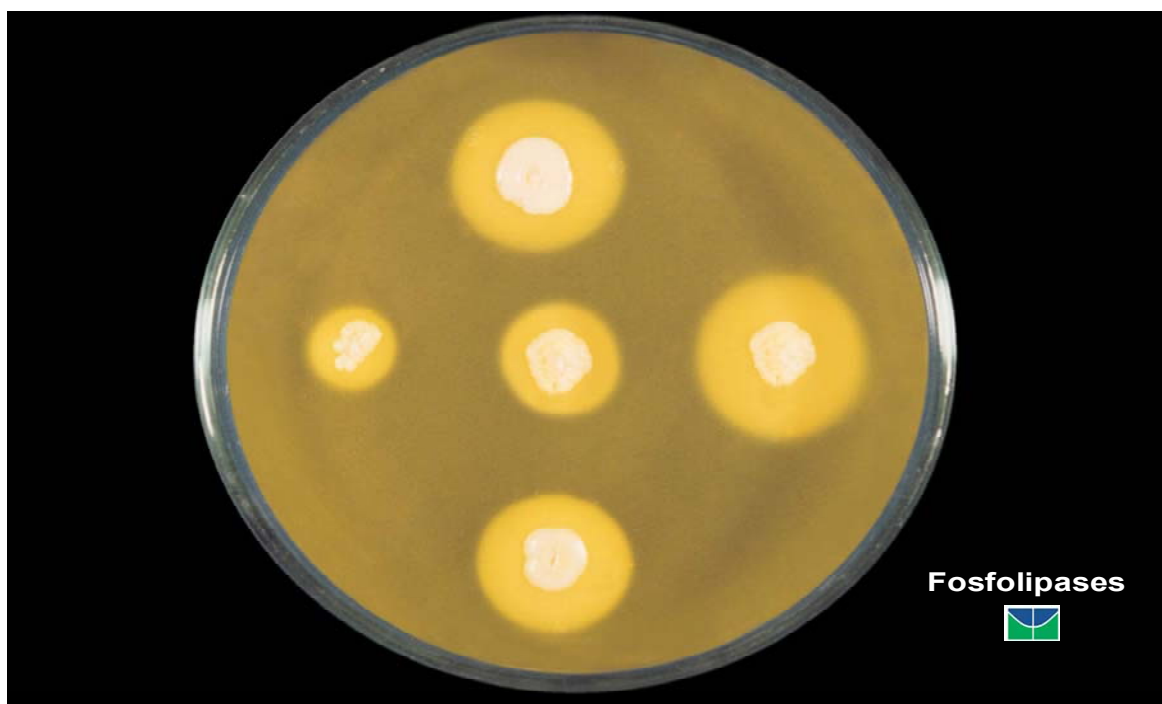


Figura 4. Produção de fosfolipases por *C. albicans* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down em meio de ágar Sabouraud dextrose enriquecido com gemas de ovo.

4.2.4 Tipagem pela sensibilidade a toxinas *killer*

A biotipagem das *C. albicans* da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R, frente às leveduras produtoras de toxinas *killer*, permitiu a detecção de cinco *killer*-tipos. Maior diversidade destes *killer*-tipos foi verificada no grupo de CCSD. O *killer*-tipo 111 predominou nos três grupos em estudo (Tabela 8 e Figura 5).

Tabela 8. *Killer*-tipos de *Candida albicans* da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.

<i>C. albicans</i> <i>Killer</i> -tipos	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	n = 37	%	n = 14	%	n = 09	%
111	17	46,0	11	78,6	05	55,6
112	14	37,8	03	21,4	03	33,3
121	03	8,1	-	-	01	11,1
186	02	5,4	-	-	-	-
888	01	2,7	-	-	-	-

Legenda: n – número
% – por cento

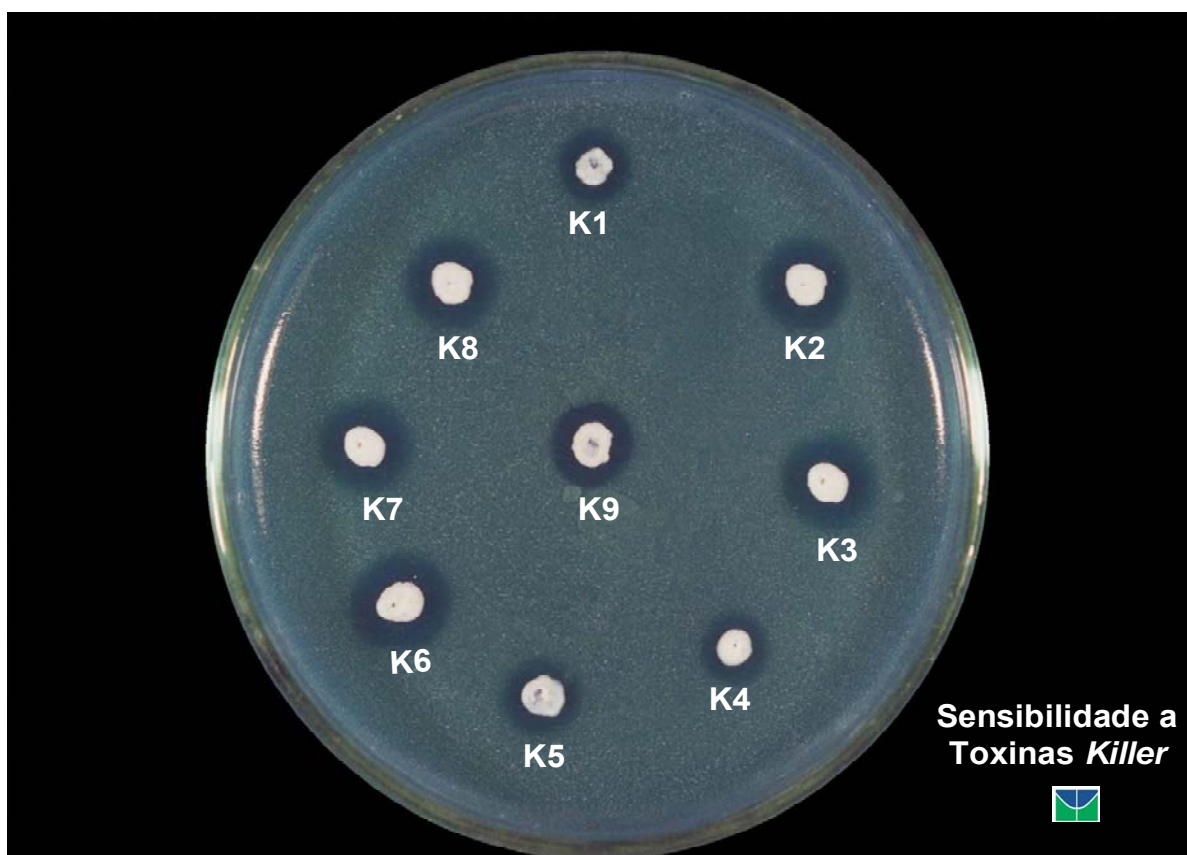


Figura 5. *Killer*-tipo 111 referente à *C. albicans* da boca de criança com Síndrome de Down suscetível a todas as leveduras produtoras de toxinas *killer* em meio ágar Sabouraud dextrose modificado

4.2.5. Tipagem pela suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

Isolados de *C. albicans* da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R mostraram-se *in vitro* sensíveis às drogas antifúngicas empregadas. A anfotericina B foi o antifúngico que apresentou a menor concentração inibitória mínima capaz de inibir 50,0% das *C. albicans* em relação aos grupos de crianças em estudo. No grupo de P e/ou R foi a 5-fluorocitosina (Tabela 9 e figura 6).

Tabela 9. Concentração inibitória mínima de antifúngicos em relação *Candida albicans* isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis.

Antifúngicos CIM	Crianças com Síndrome de Down (CCSD)		Crianças sem Síndrome de Down (CSSD)		Pais e/ou Responsáveis (P e/ou R)	
	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	Intervalo ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Anfotericina B	0,08 – 1,00	0,25	0,04 – 1,00	0,25	0,125 – 1,00	0,25
Fluconazol	0,25 – 4,00	1,00	0,05 – 4,00	2,00	0,50 – 4,00	1,00
Itraconazol	0,08 – 1,00	0,50	0,04 – 1,00	0,50	0,08 – 1,00	0,25
5-fluorocitosina	0,024 – 1,56	0,39	0,049 – 1,56	0,39	0,024 – 0,78	0,19

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima

IC₅₀ – Concentração da droga capaz de inibir 50% das amostras de leveduras

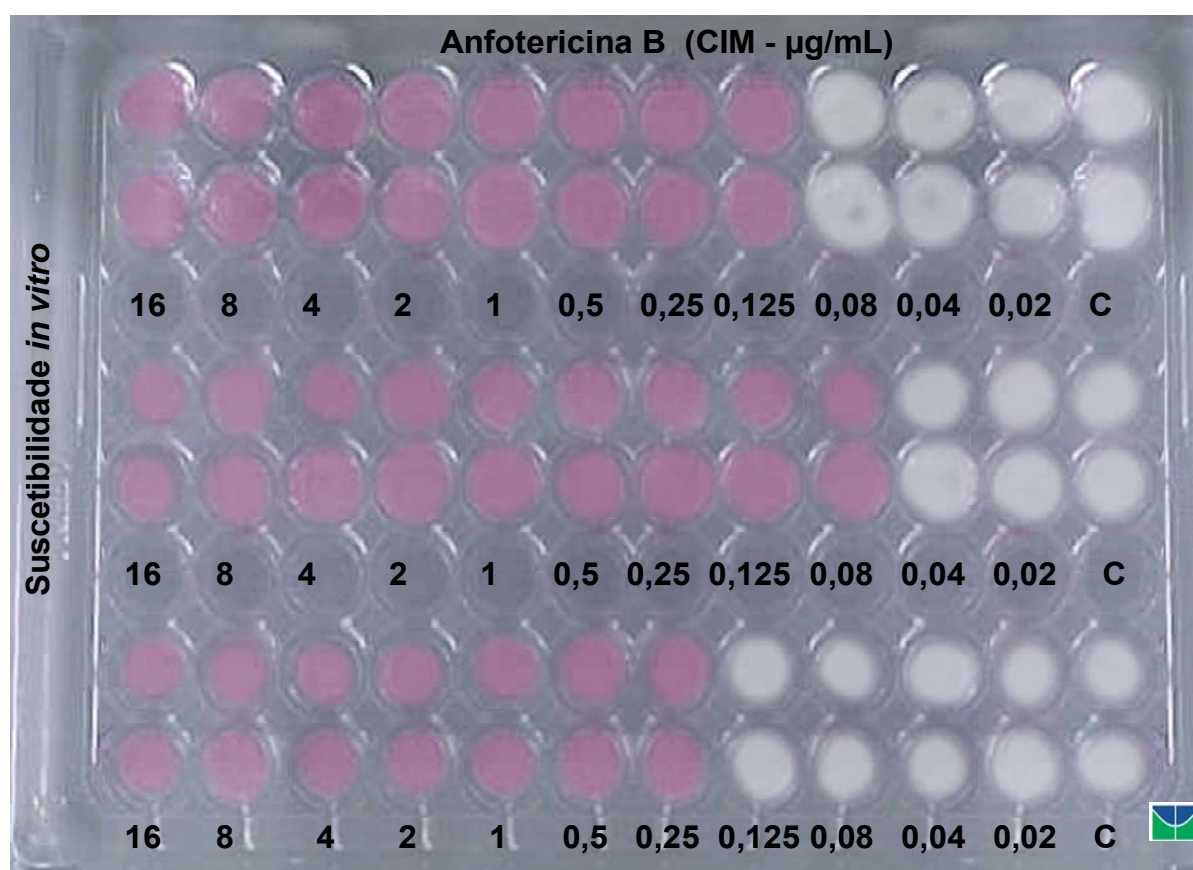


Figura 6. Suscetibilidade *in vitro* de três *C. albicans* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down frente à anfotericina B mediante o emprego da técnica de microdiluição em caldo

4.3. Determinação de similaridade genética de *Candida*

Foram analisados nove (9/37) (24,3%) pares de *C. albicans* concomitantemente isoladas da boca de CCSD e P e/ou R. A análise do perfil de similaridade genética entre os pares isolados de *Candida*, pela técnica de RAPD fazendo uso dos *primers* RSD 10 5'-CCGCAGCCA-3' e RSD 12 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3' de análise de polimorfismo intra-específico de *C. albicans*, mostrou haver homologia genética do fungo leveduriforme em dois (2/9) (22,2%) pares conjugados 16-16RF e 37-37RF. Similaridade genômica foi presenciada nos demais outros sete (7/9) (77,8%) pares de *Candida* decorrentes de pai/mãe-criança portadora desta alteração cromossômica. Os nove pares de *C. albicans* (04-4RF, 08-8RF, 14-14RF, 16-16RF, 19-19RF, 22-22RF, 27-27RF, 33-33RF e 37-37RF) analisados caracterizaram-se por induzir no perfil eletroforético à formação de três a nove bandas genômicas com pesos moleculares diversificados de DNA leveduriforme de cada par conjugado da relação intrafamiliar (CCSD e P e/ou R) (figura 7, 8 e 9).

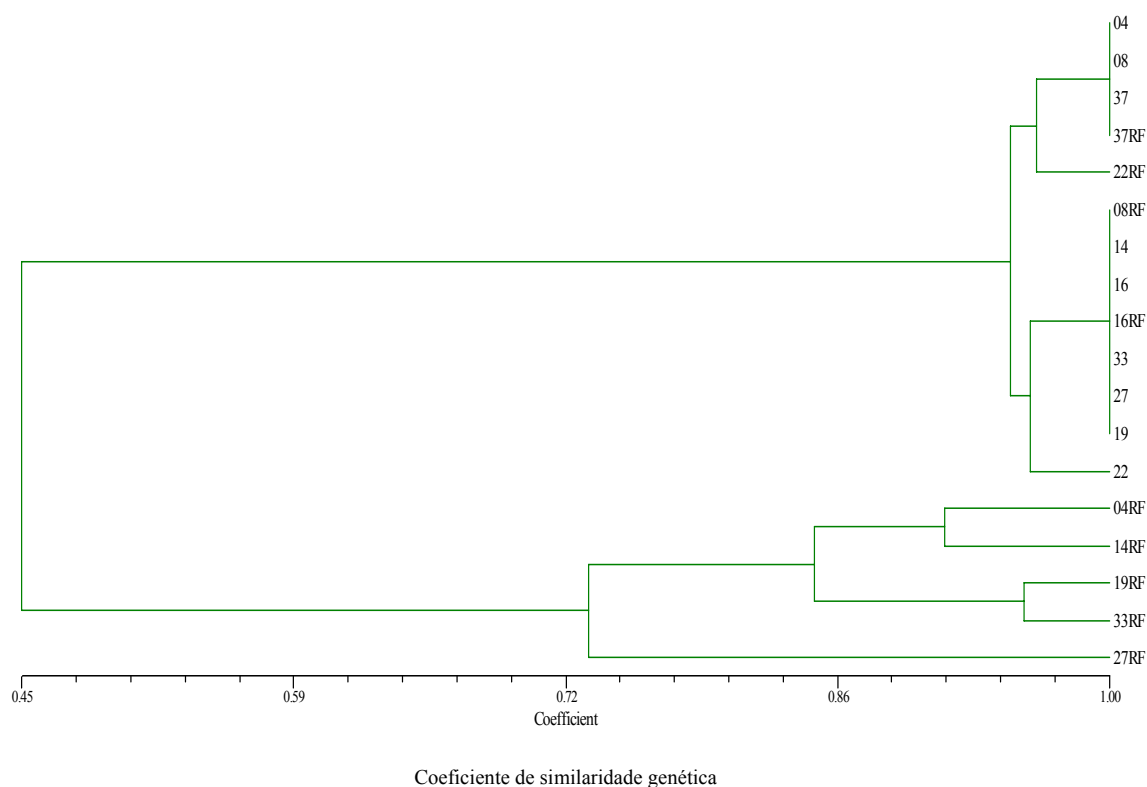


Figura 7. Dendrograma de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) entre os pares conjugados de *C. albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis obtidos com os *primers* RSD 10 e RSD 12

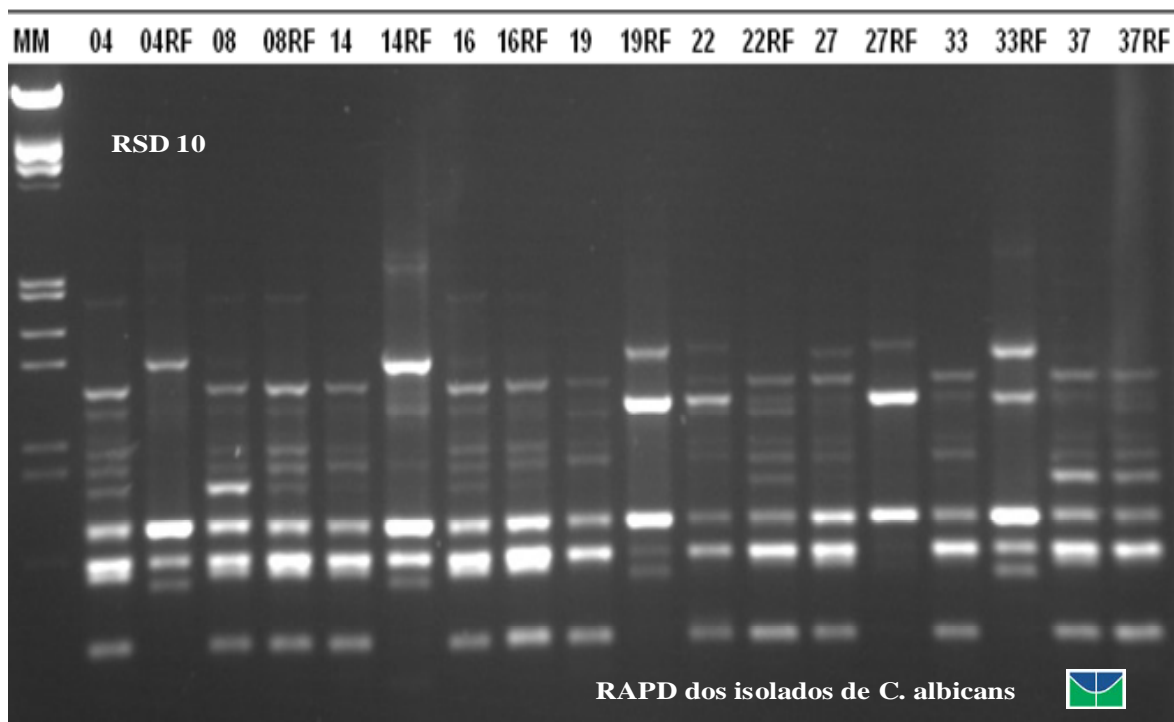


Figura 8. Perfil eletroforético de fragmentos de DNA de *C. albicans* isoladas da boca simultaneamente de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis pela técnica de RAPD com emprego do *primer* RSD 10

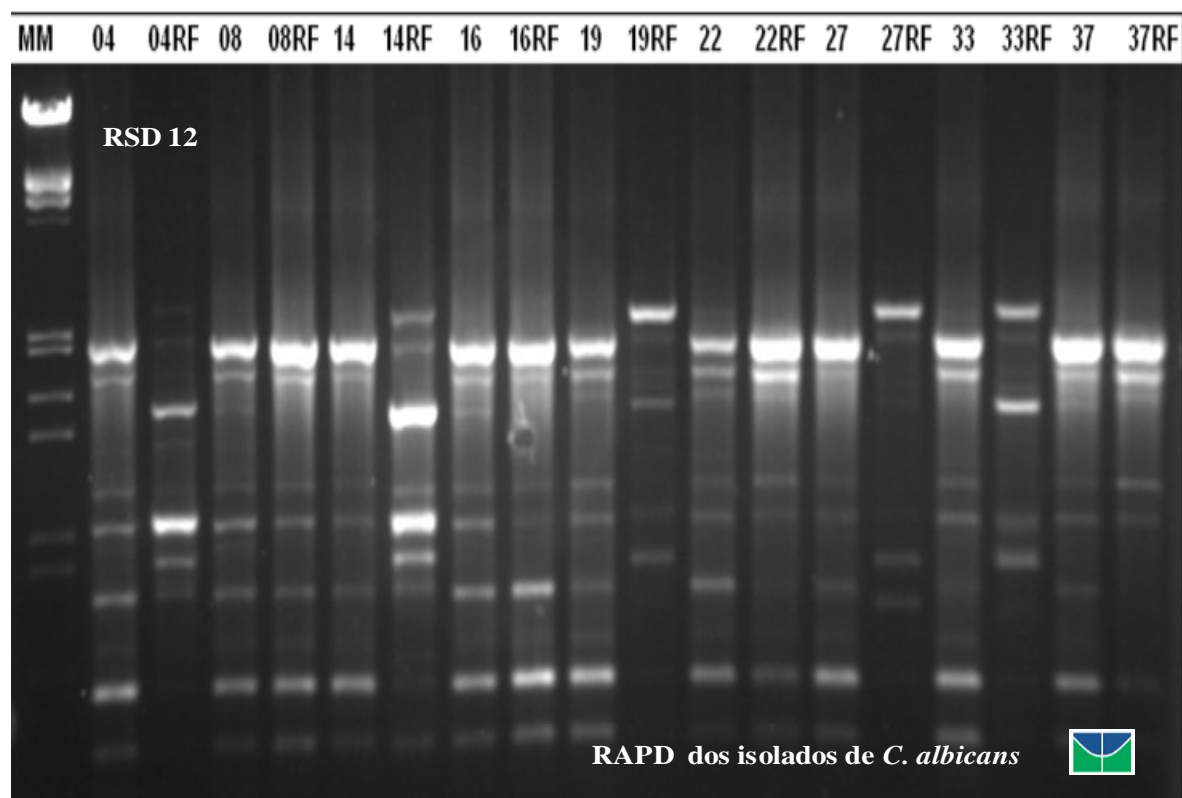


Figura 9. Distribuição de fragmentos de DNA de *C. albicans* bucais de crianças com Síndrome de Down e pais e/ou responsáveis em perfil eletroforético mediante uso do *primer* RSD 12 pela técnica de RAPD

4.4. Dosagem de imunoglobulinas séricas totais

As trinta e sete (37/40) (92,5%) CCSD, das quais foram isoladas *Candida albicans* da mucosa bucal, submeteram-se a coleta de sangue para as dosagens séricas das imunoglobulinas IgA, IgM e IgG. Níveis elevados de IgA foram detectados em 23 (62,1%) amostras de soro de crianças portadoras desta síndrome com maior ocorrência nas crianças com faixa etária de quatro a sete anos de idade. Normoglobulemia de IgA foi presenciada nos demais 14 (37,9%) soros analisados. Este aspecto imunológico verificou-se principalmente no grupo de CCSD de oito a 11 anos de idade (Tabela 10). Vinte e duas (59,5%) amostras de sangue de crianças com alteração cromossômica caracterizam-se por concentrações séricas elevadas de IgM e normais em 15 (40,5%). Crianças de oito a 11 anos de idade apresentaram basicamente dosagens no soro sanguíneo de IgM normais, enquanto as de quatro a sete anos de idade aumentadas (Tabela 11). Níveis normais e elevados de IgG foram detectados em 27 (72,9%) e 10 (27,1%) dos soros de CCSD com predomínio nos grupos de crianças de quatro a sete anos e de oito a 11 anos de idade, respectivamente (Tabela 12). Hipoglobulemia das imunoglobulinas analisadas (IgA, IgM e IgG) não foi detectada em nenhum soro de CCSD.

Tabela 10. Distribuição de crianças com Síndrome de Down por idade e dosagem de IgA sérica.

Idade (Anos)/Grupos	Crianças com Síndrome de Down (CCSD) (n = 37)	IgA sérica normal (n = 14 - 37,9%) (%)	IgA sérica aumentada (n = 23 - 62,1%) (%)	IgA sérica diminuída (n = 00 - 00,0%) (%)
0 – 3 (G1)	09 (24,3)	02 (14,3)	07 (30,4)	-
4 – 7 (G2)	15 (40,6)	05 (35,7)	10 (43,5)	-
8 – 11 (G3)	13 (35,1)	07 (50,0)	06 (26,1)	-

Legenda: n – número

% – percentagem

CCSD – crianças com Síndrome de Down

IgA – imunoglobulina A

Vmin – valores séricos mínimos

Vmax – valores séricos máximos

VR – valores de referência (Bioclin – Quibasa Química Ltda)

G1, 2, 3 e T – grupos 1, 2, 3 e total de CCSD

VR de IgA sérica em crianças: 4,0 - 333,0 mg/dL

Vmin e max de IgA sérica em CCSD:

G1 – 200,0 - 462,5mg/dL média – 333,5mg/dL

G2 – 143,7 - 443,7mg/dL média – 322,4mg/dL

G3 – 118,7 - 437,5mg/dL média – 303,3mg/dL

GT – 118,7 - 462,5mg/dL média – 318,4mg/dL

Tabela 11. Distribuição de crianças com Síndrome de Down por idade e dosagem de IgM sérica.

Idade (Anos)/Grupos	Crianças com Síndrome de Down (CCSD) (n = 37)	IgM sérica normal (n = 15 - 40,5%) (%)	IgM sérica aumentada (n = 22 - 59,5%) (%)	IgM sérica diminuída (n = 00 - 00,0%) (%)
0 – 3 (G1)	09 (24,3)	05 (33,3)	04 (18,2)	-
4 – 7 (G2)	15 (40,6)	04 (26,7)	11 (50,0)	-
8 – 11 (G3)	13 (35,1)	06 (40,0)	07 (31,8)	-

Legenda: n – número
 % – percentagem
 CCSD – crianças com Síndrome de Down
 IgM – imunoglobulina M
 Vmin – valores séricos mínimos
 Vmax – valores séricos máximos
 VR – valores de referência (Bioclin – Quibasa Química Ltda)
 G1, 2, 3 e T – grupos 1, 2, 3 e total de CCSD

VR de IgM sérica em crianças: 9,0 - 155,0mg/dL
 Vmin e max de IgM sérica em CCSD:
 G1 – 121,0 - 310,5mg/dL média – 203,4mg/dL
 G2 – 105,2 - 436,8mg/dL média – 232,2mg/dL
 G3 – 94,7 - 321,0mg/dL média – 187,4mg/dL
 GT – 94,7 - 436,8mg/dL média – 209,4mg/dL

Tabela 12. Distribuição de crianças com Síndrome de Down por idade e dosagem de IgG sérica.

Idade (Anos)/Grupos	Crianças com Síndrome de Down (CCSD) (n = 37)	IgG sérica normal (n = 27 - 72,9%) (%)	IgG sérica aumentada (n = 10 - 27,1%) (%)	IgG sérica diminuída (n = 00 - 00,0%) (%)
0 – 3 (G1)	09 (24,3)	09 (33,3)	-	-
4 – 7 (G2)	15 (40,6)	11 (40,8)	04 (40,0)	-
8 – 11 (G3)	13 (35,1)	07 (25,9)	06 (60,0)	-

Legenda: n – número
 % – percentagem
 CCSD – crianças com Síndrome de Down
 IgG – imunoglobulina G
 Vmin – valores séricos mínimos
 Vmax – valores séricos máximos
 VR – valores de referência (Bioclin – Quibasa Química Ltda)
 G1, 2, 3 e T – grupos 1, 2, 3 e total de CCSD

VR de IgG sérica em crianças: 60,0 - 1510,0mg/dL
 Vmin e max de IgG sérica em CCSD:
 G1 – 662,5 - 1087,5mg/dL média – 987,5mg/dL
 G2 – 562,5 - 2150,0mg/Dl média – 1336,7mg/dL
 G3 – 587,5 - 2037,5mg/dL média – 1391,3mg/dL
 GT – 562,5 - 2150,0mg/dL média – 1275,0mg/dL

5. Discussão

5.1. *Candida albicans*

Observou-se o isolamento e a identificação de *C. albicans* oriundas da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o número de isolados de *C. albicans* da boca do grupo de CCSD (92,5%) (37/40) em comparação com o número de leveduras provenientes do grupo controle (CSSD) (17,5%) (14/80) e P e/ou R (22,5%) (9/40) (Tabela 1). Carlstedt et al., 1996 avaliando a presença de leveduras na boca de crianças e adolescentes suecos com Síndrome de Down, na faixa etária de sete meses a 20 anos e seis meses de idade, encontraram 69,0% de 55 indivíduos portadores desta alteração cromossômica com a presença de leveduras do gênero *Candida* em relação aos 35,0% no grupo controle. Esta prevalência de *C. albicans* da boca de CCSD mostrou-se menor em relação à presenciada em nosso estudo. No grupo controle, a ocorrência de *C. albicans* foi maior. Em pacientes com algum comprometimento local da boca ou sistêmico (uso de prótese dentária, estomatite, neoplasia de orofaringe ou síndrome da imunodeficiência adquirida) verifica-se até 85,0% de colonização por *Candida* (Barreto de Oliveira, 1993; Oliveira et al., 1998; Ribeiro et al., 2002; Pinto, 2003; Sánchez-Vargas, 2005).

Linossier et al., 2002 presenciaram diferença na colonização de *C. albicans* entre CCSD, crianças com retardo mental comparadas com as crianças do grupo controle sem nenhuma afecção. Os dois primeiros grupos de crianças com dificuldade motora apresentaram higiene da boca diminuída, o que ocasiona uma maior proliferação de biofilme dental pela oferta facilitada de substrato para o metabolismo microbiano proveniente da dieta dos pacientes estudados (Bowden & Li, 1997). Na Síndrome de Down isto se torna particularmente relevante visto que existe um comprometimento imunológico dos indivíduos (Burgio et al., 1975; Srivastava et al., 1975; Seger et al., 1977; Nishida et al., 1978; Tricado et al., 1984; Mehta et al., 1993, Stites et al., 2000, Henning & Perrone, 2001_a, Carta et al., 2002; Carvalho et al., 2003, Douglas & Stokes Jr., 2005, Long, 2005; Holmes et al., 2006, Jablonska et al., 2006, Shimada et al., 2006). *C. albicans* com características de aderência, agregação e

virulência acentuadas podem encontrar um *habitat* favorável na debilidade de saúde a que crianças com trissomia 21 estão afeitas (Carlstedt et al., 1996; Ribeiro et al., 2002; Siqueira et al., 2005; Vieira et al., 2005; Ribeiro et al., 2006).

Em crianças não acometidas de alterações cromossômicas, na faixa etária de um a 11 anos de idade, a ocorrência de colonização de *Candida* na boca tem variado de 28,0 a 50,0% (Starr et al., 2002; Schardosimi & Cherubini, 2004). Esta prevalência foi maior do que a detectada neste estudo em relação ao grupo controle (Tabela 1). Starr et al., 2002 constataram a redução de 47,0% para 28,0% na colonização de *C. albicans* em 150 estudantes portugueses com mucosa da boca íntegra e faixa etária de oito a 11 anos de idade, antes e pós-tratamento odontológico com acompanhamento a intervalos de 12, 24 e 36 meses. A prevalência encontrada foi menor em relação ao grupo controle de mesma faixa etária nas CCSD (Tabela 2). A microbiota da boca sofre influência de hábitos dietéticos, higienização e experiência de cárie, sendo que na infância ocorrem alterações transitórias principalmente nesta faixa etária com a troca de dentição (Marsh & Martin, 1992; Caufield et al., 1993; Brambilla et al., 2000).

O grupo de P e/ou R pelas crianças com trissomia 21 apresentou uma ocorrência de leveduras do gênero *Candida* (22,5%) (9/40) compatível com a prevalência encontrada nos trabalhos de Lacaz, 1980 (20,0 a 50,0%); Ito et al, 2004 (10,0 a 50,0%); Panizo & Reviakina, 2001 (5,0 a 50,0%) e pouco abaixo a de Henning & Perrone 2001_a (30,0 a 50,0%) (Tabela 1).

Na faixa etária de quatro a sete anos de idade entre CCSD e de oito a 11 anos de idade nas sem alteração cromossômica houve predominância maior de colonização de *C. albicans* (Tabela 2). A colonização por leveduras do gênero *Candida* predominou no gênero masculino em todos os grupos avaliados (Tabela 3). Siqueira et. al., 2005 pesquisando capacidade tampão, pH e fluxo salivar de 25 CCSD e 21 CSSD com idade entre dois e 60 meses encontrou maior capacidade tampão e menor fluxo da saliva das crianças síndrômicas. Os meninos com trissomia 21 tinham maior capacidade tampão que os do grupo controle, enquanto as meninas não apresentaram diferença. O pH salivar das meninas com síndrome de Down tinha valores menores (pH $7,25 \pm 0,24$) quando comparado aos dos meninos. (pH $7,48 \pm 0,38$). *C. albicans* suporta um espectro de variação de pH de ácido a alcalino (pH 2,5 a 7,5) (Webb et al., 1998; Pardi & Cardoso, 2002).

5.2. Fenotipagem de *C. albicans*

A diversificação fenotípica das leveduras do gênero *Candida* parece estar relacionada à virulência das colônias, sendo que a análise desta tipagem contribui para a compreensão do comportamento fisiopatológico da candidíase, segundo a expressividade variável apresentada pelos cultivos (Senet, 1997). Entre os 60 isolados de *C. albicans* encontrou-se nove diferentes morfotipos (3240, 3340, 5320, 5330, 5340, 5530, 5540, 7530 e 7540) entre as leveduras da mucosa bucal de CCSD e quatro morfotipos no grupo de CSSD (2330, 5240, 5320 e 5330) e P e/ou R (5230, 5240, 5520 e 5530). Independentemente dos três grupos (CCSD, CSSD e P e/ou R), todas as colônias de *C. albicans* bucais caracterizaram-se pelo aspecto liso (último dígito do código de morfotipagem) (Tabela 4). Maffei, 1996; Lusvarghi, 2002 e Giammanco et al., 2005 presenciaram este mesmo aspecto em todos isolados de *C. albicans* da boca de gestantes, em 85,7% dos oriundos de pacientes HIV positivos sob tratamento com drogas antiproteínases e em 96,4% dos indivíduos HIV assintomáticos, respectivamente. A relação intrafamiliar mostrou uma vinculação entre as crianças com Síndrome de Down e suas mães como sendo a mais freqüente na amostra teste (Tabela 3).

A formação de franjas por colônias de *C. albicans* da boca, cultivadas em meio de ágar-extrato de malte, é apontada como um atributo de virulência que favorece a capacidade de aderência fúngica (Lacaz et al., 1998, Pinto, 2003). Esta característica foi constatada em todos os isolados procedentes dos grupos em estudo (CCSD, CSSD e P e/ou R). A análise macroscópica das colônias de *C. albicans* mostrou que as com franjas contínuas em leque, com tamanho igual ou maior a 6mm de comprimento, textura intermediária e topografia lisa foram predominantes na boca de CCSD (40,5%) (15/37). Foram observadas também franjas coloniais expressivas nos isolados de *C. albicans* oriundos da mucosa da boca de CSSD (42,9%) (06/14) e P e/ou R (44,5%) (04/09), sendo que as com franjas contínuas em leque de até 2mm, textura fina e topografia lisa, foram predominantes (Tabela 4). As leveduras de *C. albicans* da boca de pacientes em diversas situações clínicas mostraram em média a formação de franjas em 71,1% dos isolados. Barreto de Oliveira, 1993 presenciou o predomínio de colônias de *C. albicans* (34,8%) com franjas contínuas em leque, de tamanho de 2mm e textura intermédia isoladas da boca de pacientes com SIDA e neoplasias. Caramalac, 1995 detectou em todas as leveduras de *C. albicans* na boca de mulheres a maioria

das colônias de *C. albicans* com franjas contínuas em paralelo com até 6mm e textura grosseira. Maffei, 1996 constatou em parturientes isolados com franjas contínuas em paralelo (93,7%) com tamanho variando de 3 a 5mm e textura grosseira. Lusvarghi, 2002 e Giammanco et al., 2005 detectaram nas colônias de *C. albicans* de pacientes HIV soropositivos sob tratamento de drogas inibitórias de proteinases e indivíduos HIV assintomáticos, a formação de franjas maiores que 3mm em 73,8% e 53,6% das leveduras, respectivamente.

A avaliação entre o número de isolados de *C. albicans* capazes de induzir a formação de tubos germinativos, em soro fetal bovino a 37°C, compreendido no espaço de tempo entre uma a duas horas, mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quanto ao grupo teste (CSSD) em relação aos demais grupos estudados (Tabela 5). *In vitro*, a indução de formação de tubos germinativos ocorre inicialmente até três horas entre isolados de *C. albicans* (Kreegen Van-Rij, 1984; Lacaz et al., 1991; Sidrim & Rocha, 2004). Neste estudo, todas *C. albicans*, independente do grupo em análise, formaram tubos germinativos dentro de duas horas. Souza et al., 1990 utilizando como substrato o soro fetal bovino, observaram que com uma hora de incubação a 37°C, 86,6% das *C. albicans*, oriundas de inúmeros materiais clínicos, haviam formado tubos germinativos; com duas horas, 96,6% dos isolados induziram a formação desta estrutura e com três horas de incubação, todas as leveduras de *C. albicans* haviam formado tubos germinativos. Pinto, 2003 em indivíduos HIV hospitalizados e López et al., 2005 em pacientes com candidíase, detectaram a capacidade de isolados de *Candida* induzirem a formação de tubos germinativos em duas horas. O dimorfismo morfológico apresentado por *C. albicans* tem papel preponderante na virulência fúngica, mediante a passagem da forma leveduriforme (infectante) a filamentosa (parasitária) (Lacaz et al., 1998; Sidrim & Rocha, 2004). A análise da formação de tubos germinativos por *C. albicans* em determinado período de tempo mostra a capacidade de aderência das leveduras à mucosa de indivíduos colonizados por este fungo

A classificação das zonas de precipitação enzimáticas em cinco categorias (ausente, fraca, intermediária, alta e muito alta) frente à produção de aspartil proteinases e fosfolipases por *C. albicans* (Tabelas 6 e 7), possibilitou avaliar melhor o comportamento exoenzimático demonstrado por cada isolado leveduriforme. A produção destas enzimas é bastante relevante no que diz respeito à virulência das colônias. Cerca de 73,0% (27/37) dos isolados, provenientes da boca de CCSD, mostraram produção alta a muito alta de aspartil

proteínases em relação a 21,4% (03/14) e 33,3% (3/9) das leveduras de *C. albicans* oriunda dos grupos de CSSD e P e/ou R, respectivamente (Tabela 6). Quanto à produção de fosfolipases, os isolados de *C. albicans* da boca do grupo teste (CCSD) mostraram 81,1% (30/37) das leveduras com produção elevada a altamente elevada, enquanto as amostras de *Candida* pertencentes aos grupos controle (CCSD) e do grupo de P e/ou R apresentaram, respectivamente, 7,1% (1/14) e 11,1% (1/9) de *C. albicans* com similar produtividade enzimática (Tabela 7). Diferenças estatísticas foram encontradas em relação à quantidade de produção de ambas exoenzimas por *C. albicans* decorrentes do grupo teste (CCSD) em comparação com as do grupo controle (CSSD) e de P e/ou R ($p < 0,05$) (Tabelas 6 e 7). Cerca 8,1% (3/37), 7,1% (1/14) e 11,1% (1/9) dos isolados de *C. albicans* da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R, respectivamente, mostraram-se *in vitro* desprovidas da capacidade de produzir fosfolipases (Tabela 7). Na comparação entre CCSD, CSSD e P e/ou R, as colônias de *Candida* tem aproximadamente um mesmo índice percentual de isolados produtores de fosfolipases. No entanto, as amostras provenientes do grupo teste (CCSD) mostraram-se *in vitro*, na análise individual da levedura, maior capacidade produtora de fosfolipases, sugerindo que a colonização seria facilitada tornando as CCSD mais suscetíveis a candidíase. De acordo com Samaranayake et al., 1984 e Mardergan et al., 2006 a produção de fosfolipases por *C. albicans in vitro* decresce com elevada concentração de sacarose e galactose, enquanto é completamente inibida por altas concentrações de glicose. Uma concentração acentuada intrabucal de açúcares suprimiria a formação de fosfolipases, reduzindo o potencial patogênico desta levedura. Entretanto clinicamente, este efeito induziria por outro lado o aumento da proliferação de leveduras da boca, pois favorece a capacidade de aderência destas colônias microbianas (Mardegan et al., 2006).

Cândido et al, 2000 analisando 79 *Candida* isoladas da boca de pacientes com lesões características de candidíase e indivíduos com a boca clinicamente sadia constataram que 83,3% e 66,7% das leveduras de *C. albicans*, provenientes de lesões bucais, foram produtoras, respectivamente, de fosfolipases e aspartil proteínases. Todavia os isolados desta mesma levedura, oriundos da boca de indivíduos sem lesões, tiveram 71,9% das produtoras de fosfolipases e 68,7% de aspartil proteínases, sendo que em ambos os grupos, o enzimatipo 22 (fosfolipases positivas e aspartil proteínases fracamente positivas) o mais prevalente. Isto sugere que a capacidade fosfolipidolítica de cultivos de *C. albicans* da boca é o fator enzimático preponderante para o acometimento de candidíase (Quirino, 1990; Barreto de

Oliveira, 1993; Oliveira et al., 1998; Cândido et al., 2000; Menezes et al., 2004). Basu et al., 2003 verificaram a produtividade de exoenzimas presentes apenas em colônias de *C. albicans*, oriundas de espécimes clínicos coletados de unidades hospitalares, 48,7% (19/39) dos isolados de *C. albicans* foram produtores de ambas as enzimas e 17,9% (7/39) das leveduras de *Candida* secretaram aspartil proteinases. Menezes et al., 2004 avaliando quadro de mastite, detectaram somente a ocorrência de leveduras do gênero *Candida*, com o predomínio da espécie *albicans*. O perfil exoenzimático apresentado pelas *C. albicans* caracterizou-se somente pela produção de fosfolipases, com uma zona de precipitação enzimática (P_z) composta por 18,2% (2/11) das leveduras com produção de fosfolipases fraca, 63,6% (7/11) com produção intermediária e 18,2% (2/11) com produção alta.

Biodiversidade de cinco *killer*-tipos (111, 112, 121, 186 e 888) de sensibilidade a toxinas *killer* foi constatada em todas *C. albicans* tipificadas com predomínio do *killer*-tipo 111, independentemente dos grupos de estudo avaliados neste trabalho. Os isolados de *C. albicans* da boca de CCSD apresentaram maior diversidade de *killer*-tipos, sendo que os demais (111, 112) e (111, 112 e 121) foram identificados nas leveduras do gênero de *Candida* pertencentes aos grupos controle (CSSD) e P e/ou R, respectivamente, e encontravam-se incluídos dentro do elenco dos cinco *killer*-tipos presenciados no grupo teste (CCSD) (Tabela 8).

A análise de colônias de *C. albicans* da boca de gestantes, indivíduos adultos com boca íntegra, candidose, com bolsa periodontal e os com periodontite crônica caracterizou o *killer*-tipo 111 como significativo (Maffei, 1996; Jorge et al., 2000; Martins et al., 2002_a; Martins et al., 2002_b). Polonelli et al., 1983 identificaram 25 *killer*-tipos diferentes numa população de 100 amostras de diversas leveduras com a prevalência do *killer*-tipo 111 em 52,0% dos fungos analisados.

O *killer*-tipo 888 (leveduras não tipificáveis), ou seja, resistentes a todas as proteínas *killer* produzidas pelas leveduras-padrão, foi evidenciado em 2,7% (1/37) dos isolados de *C. albicans* da boca de CCSD (Tabela 11). Martins et al., 2002_b também detectaram este *killer*-tipo em uma única amostra de *Candida*, todavia pertencente à espécie *tropicalis*, dentre as 36 leveduras de *Candida* da boca de pacientes com periodontite crônica.

Demais estudos envolvendo a avaliação de *C. albicans* frente às toxinas *killer*, isoladas da mucosa da boca têm demonstrado alteração de perfil de sensibilidade das leveduras quando advindas de pacientes submetidos a outros tratamentos, como os

neoplásicos. Birman et al., 1997 evidenciaram os *killer*-tipos 211 e 611 em 33 isolados de *C. albicans* de indivíduos com carcinoma bucal. Oliveira et al., 1998 em 24 leveduras de *C. albicans* provenientes da boca de pacientes oncológicos, constataram os *killer*-tipos 511 e 811.

A classificação das *C. albicans* em diferentes *killer*-tipos, possibilitada pela sensibilidade às toxinas *killer*, facilita o delineamento epidemiológico de colônias em populações diversas, assegurando o conhecimento preciso das leveduras presentes nas infecções fúngicas.

5.3. Suscetibilidade *in vitro* a drogas antifúngicas

No grupo de CCSD, os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) oscilaram entre 0,08 e 1,00µg/mL para a anfotericina B e de 0,024 e 1,56µg/mL para 5-fluorocitosina. Nas CSSD foram observadas variação nos valores de CIM: para anfotericina B, entre 0,04 e 1,00µg/mL e para 5-fluorocitosina, entre 0,049 e 1,56 µg/mL. Os valores de CIM obtidos para *C. albicans* de P e/ou R por CCSD, variou de 0,125 a 1,00µg/mL para anfotericina B e de 0,024 a 0,78µg/mL para 5-fluorocitosina (Tabela 9). Paniagua et al., 2002 analisando 80 *C. albicans*, isoladas da garganta de pacientes do Hospital das Clínicas do México, encontraram valores de CIM variando entre 0,0156 e 0,125µg/mL para a anfotericina B e de 0,25 a 8,0µg/mL para a 5-fluorocitosina. Pinto, 2003 verificou que os resultados de CIM para as 120 amostras de *C. albicans* oriundas de vários espécimes clínicos, com predominância de saliva, de 11 pacientes imunossuprimidos com infecção por HIV variaram entre 0,5 e 2µg/mL para anfotericina B e para a 5-fluorocitosina, entre 0,012 e 3,12µg/mL. Quindós et al, 2004 observaram em hospitais espanhóis que nos 1.021 isolamentos de *Candida* e demais leveduras de importância médica dos pacientes internados, 445 (43,6%) *C. albicans* foram suscetíveis a 5-fluorocitosina com valores de CIM variando entre 0,25 e \geq 128µg/mL. Wingeter et al, 2007; analisando 54 *C. albicans* da boca de pacientes com infecção pelo HIV ou portadores de SIDA, verificaram variação nos valores de CIM: para a anfotericina B entre 0,03 e 16µg/mL. O espectro de variação de concentração inibitória mínima (CIM) do nosso estudo (CCSD, CSSD e P e/ou R) mostrou-se em relação à anfotericina B com valores maiores que os do trabalho de Paniagua et al., 2002 e menores em relação às demais investigações analisadas (Pinto, 2003; Wingeter et al., 2007). O espectro de

valores de CIM da 5-fluorocitosina foi maior na pesquisa de Quindós et al., 2004 que o obtido neste estudo e no de Pinto, 2003.

No presente estudo, no grupo de CCSD, os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) oscilaram entre 0,25 e 4,00µg/mL para o fluconazol e 0,08 a 1,00µg/mL para o itraconazol. Nas amostras do grupo de CSSD foram observadas variação nos valores de CIM para o fluconazol entre 0,05 e 4,00µg/mL e para o itraconazol, entre 0,04 e 1,00µg/mL. Os valores da CIM obtidos para *C. albicans* de P e/ou R por CCSD, variou de 0,50 a 4,00 µg/mL para fluconazol e de 0,08 a 1,00µg/mL para itraconazol (Tabela 9). Pinto, 2003; nos pacientes imunossuprimidos com infecção por HIV verificou resultados de CIM para as *C. albicans* com valores de 0,25 a 2µg/mL para o fluconazol e de 0,04 e 0,25µg/mL para o itraconazol. Wingeter et al., 2007 presenciaram resultados da variação de CIM de 0,125 a 64µg/mL para o fluconazol e de 0,03 a 16µg/mL para itraconazol nas amostras de *C. albicans* da boca de pacientes com HIV ou portadores de SIDA. A presente pesquisa encontrou uma variação maior no espectro de valores de CIM nos três grupos analisados em relação ao estudo de Pinto, 2003 e menor quanto à investigação de Wingeter et al, 2007.

Nas CCSD e P e/ou R, o valor de IC₅₀ para o fluconazol foi de 1,0 µg/mL, sendo que nas CSSD foi 2,0µg/mL. Os resultados de IC₅₀ para itraconazol foram iguais entre as crianças (0,50µg/mL) e nos P e/ou R de CCSD foi de 0,25µg/mL (Tabela 9). No trabalho de Pinto, 2003, os valores de IC₅₀ (fluconazol igual a 0,5µg/mL e itraconazol igual a 0,16µg/mL) foram menores aos encontrados no nosso estudo. Em relação à pesquisa de Wingeter et al., 2007, o valor de IC₅₀ foi igual a 1,0µg/mL para o fluconazol. Resultado idêntico ao presenciado no grupo de CCSD e P e/ou R e menor quanto ao grupo de CSSD. O itraconazol apresentou um valor igual a 0,06µg/mL, menor em relação aos valores de IC₅₀ presenciados no nosso trabalho.

Dentre as concentrações inibitórias mínimas capazes de inibir 50% dos isolados de *C. albicans* da boca de CCSD, CSSD e P e/ou R foram a anfotericina B (IC₅₀ = 0,25µg/mL) e 5-fluorocitosina (IC₅₀ = 0,19µg/mL) as drogas que apresentaram os melhores resultados. Nos grupos de crianças, a 5-fluorocitosina apresentou o valor de IC₅₀ igual a 0,39µg/mL (Tabela 9). Os resultados de Paniagua et al., 2002 foram IC₅₀ iguais a 0,038µg/mL e 0,73µg/mL para anfotericina B e 5-fluorocitosina, respectivamente. O valor de IC₅₀ para a anfotericina B foi igual a 1,0µg/mL e para a 5-fluorocitosina igual a 0,049µg/mL na pesquisa desenvolvida por

Pinto, 2003. Wingeter et al, 2007 encontraram para anfotericina B resultado de IC₅₀ igual a 0,06µg/mL e Quindós et al, 2004; 0,25µg/mL para a 5-fluorocitosina.

Os testes de suscetibilidade *in vitro* (variações de CIM e IC₅₀) permitiram verificar que todas *C. albicans* isoladas da boca das crianças e P e/ou R neste estudo foram sensíveis às drogas antifúngicas testadas. Díaz-López, 2004 e Sanchez-Vargas et al., 2005 investigando *C. albicans* da mucosa da boca de pacientes internados encontraram a maioria de colônias suscetíveis a anfotericina B, itraconazol e fluconazol. No entanto, estes autores não mencionaram a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração capaz de inibir 50% (IC₅₀) das leveduras.

5.4. Similaridade genética em *Candida*

A homologia genética dos pares 16-16RF e 37-37RF de *C. albicans* simultaneamente oriundos da boca de CCSD e P e/ou R analisados pela técnica de biologia molecular RAPD, fazendo uso dos *primers* RSD10 5'-CCGCAGCCA-3' e RSD12 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3' de emprego intra-específico para este fungo, comprovou a transmissão intrafamiliar (Figuras 7, 8 e 9). Samaranayake et al., 2003 fazendo uso dos mesmos *primers* mediante uso de RAPD em amostras de *C. albicans* de pacientes HIV com e sem candidíase bucal presenciaram polimorfismo intra-específica entre as leveduras desta mesma espécie de fungo analisada. Aspecto genético homólogo de *C. albicans* foi também evidenciado em transmissão horizontal de mãe e neonato acometidos de candidemia (Tiraboschi et al., 2007).

A dificuldade de encontrar *primers* de análise intra-específica de fungo leveduriforme constitui no presente momento um fator que interfere na detecção de homologia entre os pares de *C. albicans* analisados (Samaranayake et al., 2003).

A elevada similaridade genética entre os pares de *C. albicans* concomitantemente isolados da boca de CCSD e P e/ou R neste estudo (Figuras 7, 8 e 9) demonstrou que as amostras de *Candida* integrantes da microbiota bucal de cada par de indivíduos da relação intrafamiliar analisado podem ter no momento da coleta de secreção salivar da mucosa jugal origem microbiológica diversificada da *Candida* comumente detectada da relação de transmissão vaginal de microrganismos entre mãe e filho durante o parto (Ribeiro, 1997; Scherma et al., 2004; Carvalho et al., 2007). A necessidade de uma maior assistência médico-

laboratorial às CCSD, desde o momento do nascimento, as expõe a outras vias de transmissão de *Candida*, inclusive a advinda de profissionais de saúde (Amorim et al., 1999; Lacaz et al., 1998; Ribeiro et al., 2004; Carvalho et al., 2007). A microbiota da boca destas crianças fica exposta, portanto a contato com *Candida* de inúmeras fontes microbiológicas (Amorim et al., 1999; Pimenta et al., 2001; Linossier et al., 2002; Roncari et al., 2002; Menezes et al., 2004; Schardosimi & Cherubini, 2004; Scherma et al., 2004; Carvalho et al., 2007).

Maior frequência de similaridade do genoma de *Candida* tem sido presenciada na análise interespecífica de amostras de espécies de leveduras. Pinto et al., 2004; Resende et al., 2004 e Valério et al., 2006 analisando amostras de espécies de *Candida* de origem clínica e hospitalar, presenciaram diferenciação interespecífica do polimorfismo do genoma das espécies de leveduras através da técnica de RAPD mediante o emprego de vários *primers* interespecíficos (M13 (F/R), OPA, OPA01, OPA02, OPA03, OPA08, OPA09, RP1-4, RP-2, RP4-2 e SOY). A similaridade genética intra-específica entre amostras de *C. albicans* oriundas de diversos espécimes nosocomiais tem variado de 49,0 a 91,0% entre isolados analisados (Duran et al., 2006). Perfil de RAPD de até 85,0% de similaridade tem detectado entre *C. albicans* da cavidade bucal de indivíduos imunodeficientes (González et al., 2006), diabéticos, portadores de prótese dental e hemodializados (Pirez-Goncalvez et al., 2007). Resultados semelhantes aos presenciados neste trabalho onde a similaridade genética entre as leveduras de *C. albicans* bucais de CCSD e P e/ou R variou de 45,0 a 100,0% (Figura 7).

5.5. Imunoglobulinas séricas totais

A diversificação de concentrações séricas de IgA, IgM e IgG presenciadas nas CCSD está relacionada com comprometimento funcional apresentado pelo sistema imunológico dos indivíduos portadores dessa síndrome. Esta cromossomopatia interfere desde a origem, a quantificação e a qualificação dos linfócitos B e das demais células envolvidas na resposta imune (Rozone & Mustachi, 1990; Pastorini et al., 1994; Campos 2001; Soares et al., 2004; Cocchi et al., 2007).

Níveis normais e elevados de IgA e IgM no soro humano sofrem influência da interação do complexo antígeno – anticorpo (Parslow, 2000). A constituição glicoprotéica dos antígenos favorece uma melhor ativação de determinadas respostas humorais (Parslow, 2000). CCSD são constantemente expostas à presença de leveduras de *Candida* em mucosas (Rozone

& Mustachi, 1990; Pires et al., 1997; Linossier et al., 2002; América, 2005) e na parede celular do fungo, a presença de polissacarídeos (glucanas e mananas) que induzem a ativação linfocitária a produção de anticorpos específicos (IgA e/ou IgM) (Lacaz et al., 1991; Parslow, 2000; Sidrim & Rocha, 2004). Na regulação da resposta imune em infecções causadas por *Candida albicans*, os antígenos polissacarídicos geram uma série complexa de interações, que resultam na supressão das respostas das células T e B ao antígeno homólogo. Estes efeitos são mediados por um fator inibitório específico para o antígeno capaz de bloquear a síntese da IL-2 e do INF- γ normais e a expressão do receptor IL-2 pelas células T humanas (Paiva et al., 1999).

Infecções fúngicas, artrite reumatóide e doenças auto-imunes, como doença celíaca (inabilidade de digerir glúten), são processos infecciosos relacionados com o aumento de IgA sérico, inclusive em CCSD (Burgio et al., 1975; Srivastava et al., 1975; Seger et al., 1977; Nishida et al., 1978; Tricado et al., 1984; Sustrovás & Stribak, 1994; Ozkinay et al., 2003; Kallaur et al., 2007). Níveis normais a elevados de IgA sangüínea têm sido presenciados em pacientes com Síndrome de Down de dois a 30 anos de idade. (Burgio et al., 1975; Srivastava et al., 1975; Seger et al., 1977; Nishida et al., 1978; Tricado et al., 1984; Sustrovás & Stribak, 1994). Concentrações aumentadas de IgA específica ao agente etiológico e secretória também foram detectadas (Ozkinay et al., 2003; Hansson et al., 2005; Lee et al., 2005; Cogulu et al., 2006). As dosagens de IgA séricas de CCSD de zero a 11 anos de idade apresentaram em 14 (37,9%) crianças uma concentração imunoglobulínica normal (118,7mg/dL) e elevada (462,5mg/dL) em 23 (62,1%) (Tabela 10).

Alterações do nível de IgM sérica foram evidenciados em pacientes portadores de Síndrome de Down com uma tendência a elevação de concentração (Jacobs et al., 1978; Nishida et al., 1978; Tricado et al., 1984; Mahmoud et al., 2005). Resultados similares detectaram-se nas dosagens dessa imunoglobulina no soro sangüíneo de CCSD. Onze (11/22) (50,0%) crianças de quatro a sete anos, dentre as 22/37 (59,5%) na faixa etária de zero a 11 anos de idade, apresentaram maiores concentrações de IgM séricas (105,2 a 436,8mg/dL) e as demais outras 15/37 (40,5%) concentrações normais (94,7 a 121,0mg/dL) (Tabela 11). Em indivíduos portadores Síndrome de Down, Burgio et al., 1975 presenciaram decréscimo acentuado de IgM sérico em jovens adultos de 16 a 25 anos de idade. Srivastava et al., 1975 detectaram normoglobulemia de IgM em 69 casos. Jacobs et al., 1978 observaram baixas concentrações de imunoglobulinas no soro sangüíneo de crianças com infecções respiratórias

com exceção de IgM. Nishida et al., 1978 verificaram em 20 pacientes síndrômicos e 16 mentalmente retardado com paralisia cerebral níveis elevados de IgM e Tricado et al., 1984 constataram concentrações aumentadas de IgA e IgM séricos com uma dependência em relação a idade do paciente. Vinte e três (23/29) (79,3%) indivíduos com desordem cromossômica apresentaram valores muito elevados das dosagens de IgM e IgA séricas (Mahmoud et al., 2005).

A acentuada normoglobulemia de IgG presenciada em 27/37 (72,9%) CCSD (Tabela 12) pode ser decorrente da situação clínica (mucosa bucal íntegra, sem manifestação de doença, que não estivesse fazendo uso de antimicrobiano há um mês e que possuíam exame clínico-bucal sadio após avaliação odontológica) considerada como pré-requisito de inclusão destas crianças neste estudo. Kallaur et al., 2007 presenciaram nível normal de IgG sérica em 78,4% de 1.253 pacientes de zero a acima de 13 anos de idade, desprovidos de síndrome e atendidos no Hospital Universitário de Londrina. Dez (10/37) (27,1%) amostras de CCSD apresentaram aumentadas concentrações séricas de IgG. Este aspecto imunológico é comumente vinculado as constantes infecções recorrentes, como as pulmonares, associadas ou não às cardiopatias que esses indivíduos estão predispostos a sofrer (Pastorino et al., 1984; Rozone & Mustacchi, 1990; Soares et al., 2004; América, 2005).

O perfil imunológico de IgA, IgM e IgG sérico das CCSD apresentou-se compatível com os demais estudos analisados (Burgio et al., 1975; Srivastava et al., 1975; Seger et al., 1977; Jacobs et al., 1978; Nishida et al., 1978; Tricado et al., 1984; Sustrovás & Stribak, 1994; Ozkinay et al., 2003; Mahmoud et al., 2005).

A escassez de estudos envolvendo leveduras do gênero *Candida* na boca de CCSD e avaliando o comportamento das imunoglobulinas no soro humano em pacientes portadores de trissomia 21, mencionando apenas a faixa etária dos indivíduos sem a distribuição dos mesmos por grupos de idade, dificultou o correlacionamento dos resultados encontrados com outras pesquisas.

6. Conclusões

- Observou-se na saliva da boca de CCSD um número de colônias de *C. albicans* mais elevado do que as de CSSD e P e/ou R.
- As *C. albicans* isoladas da boca de CCSD formaram predominantemente colônias com periferia de franjas contínuas em leque, com comprimento de 6mm, textura intermediária e topografia lisa, enquanto que os isolados de CSSD e P e/ou R de CCSD formaram predominantemente colônias com periferia de franjas contínuas em leque, com comprimento de 2mm, textura fina e topografia lisa.
- Todos os isolados de *C. albicans* dos grupos analisados (CCSD e seus P e/ou R e CSSD) induziram a formação de tubos germinativos dentro de duas horas, sendo que a maior detecção em uma hora, foi do grupo de crianças com trissomia 21.
- A atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases mostraram zona de precipitação alta a muito alta na maioria das colônias de *C. albicans* em CCSD, entretanto os isolados de CSSD e P e/ou R de CCSD caracterizaram-se por uma atividade enzimática de fraca a intermediária.
- A maioria das leveduras de *C. albicans*, independentemente da origem da boca dos grupos de crianças e P e/ou R, mostrou-se sensível a todas as proteínas *killer* produzidas com predomínio do *killer*-tipo 111.

- As *C. albicans* mostraram-se sensíveis a todos os antifúngicos empregados (anfotericina B, fluconazol, itraconazol e 5-fluorocitosina) independentemente dos grupos de crianças e P e/ou R.
- A maioria das colônias de *C. albicans* de CCSD apresentou características fenotípicas diferentes quando comparadas as de CSSD e P e/ou R.
- Elevada similaridade genética foi presenciada entre os pares de *C. albicans* isoladas da boca simultaneamente de CCSD e P e/ou R, embora a relação intrafamiliar tenha sido detectada em dois pares conjugados de *C. albicans* 16-16RF e 37-37RF.
- As imunoglobulinas séricas totais de CCSD caracterizaram-se por maiores quantidades de concentrações elevadas de IgA e IgM e normais de IgG, principalmente em crianças de quatro a sete anos de idade.

Referências Bibliográficas

ALKUMRU, H.N.; BEYDEMIR, K. The prevalence of *C albicans* in complete denture and removable partial denture wearers a comparative study. **J. Marmara Univ. Dent. Fac.**, 13(3): 218-222, 1992.

ALONSO-VARGAS, R.; GARAIZAR, J.; PONTÓN, J.; QUINDÓS, G. Utilidad de la amplificación aleatória de ADN en la diferenciación de *C. albicans* y *C. dubliniensis*. **Rev. Iberoam. Micol.**, 17: 10-13, 2000.

AMÉRICA, D.A. Índice de exames. **Imunoglobulina Diagnóstica da América**. São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://www.diagnosticadaamerica.com.br>>. Acesso em: 02 outubro 2006.

AMMANN, A.J.; STIEHM, E.R. Mecanismos da imunodeficiência. In: **Imunologia Médica**. 9. ed. Stites, D.P. et al. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2000. P. 254-257.

AMORIM, S.T.S.P.; MOREIRA, H.; CARRARO, T.E. Amamentação em crianças com Síndrome de Down: A percepção das mães sobre a atuação dos profissionais de saúde. **Rev. Nutr.**, 12(1): 91-101. 1999.

BACHESHI, I.C.C. Síndrome de Down. In: **Neurologia Infantil**. 2. ed. Diament, A.; Cypel, S. Rio de Janeiro: Ateneu, 1990. P.254-257.

BARNUM, S.C.; SZALAI, A.J. Complement and demyelinating disease: No MACneeded? **Brain Res. Rev.**, 52: 58-68, 2006.

BARR-AGHOLME, M.; DAHLLÖF, G.; MODÉER, T.; ENGSTRÖM, P. E.; ENGSTRÖM, G.N. Periodontal conditions and salivary immunoglobulins in individuals with Down's syndrome. **J. Periodontol.**, 69(10): 1119-1123, 1998.

BARRETO DE OLIVEIRA, M.T. **Leveduras isoladas da mucosa bucal de portadores sadios, pacientes com SIDA e neoplasias. Produção de exoenzimas e tipagem das amostras de *C. albicans*.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1993. 107 p.

BARROS, E.; BITTENCOURT, H.; CAMAMORI, M.L.; MACHADO, A. **Antimicrobianos.** 3. ed. Porto Alegre: Artemed Editora, 2000. P.208-221.

BASU, S.; GUGNANI, H. C.; JOSHI, S.; GUPTA, N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *C. albicans* isolates. **Rev. Iberoam. Micol.**, 20: 137-140, 2003.

BENDOVA, O. The killer phenomenon in yeasts. **Folia Microbiol.**, 31: 422-423, 1986.

BENNETT, J.E.; HAY, R.J.; PETERSON, P.K. **New strategies in fungal disease.** London: Glaxo Group London, 1992. P.1-31.

BIRCK, L.F. Ferro e Infecções Atualização. **Pediat.**, 16(1): 34-43, 1994.

BIRMAN, E.G. Um breve retrospectivo sobre *Candida* e candidoses em relação à boca. **Rev. Vida Odontol.**, 42(6): 56-59, 1998.

BIRREN, B.; LAI, E.. Rapid pulsed field separation of DNA molecules up to 250 kb. **Nucleic Acids Res.**, 22(24): 5366-5370, 1994.

BORBA, I.G.; MENEZES, J.E.C.V. **Dinâmica da colonização da cavidade bucal de recém-nascidos.** Monografia de Especialização em Odontopediatria. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. 1996. 41 p.

BORG, M.; RUCHEL, R. Expression of extracellular proteins by proteolytic *Candida* spp during experimental infection of oral mucosa. **Infect. Immun.**, 56: 626-631, 1988.

BOWDEN, G.; LI, Y. Nutritional influence on biofilm development. **Adv. Dent. Res.**, 11: 81-99, 1997.

BRAMBILLA, E.; GARCIA-GODOY, F.; STRAHNENGER, L. Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects. **Pediatr. Dent.**, 44: 507-540, 2000.

BURGIO, G.R.; UGAZIO, A.G.; NESPOLI, L.; MARCIONI, A.F.; BOTTELLI, A M.; PASQUALI, F. Derangements of immunoglobulin levels, phytohemagglutinin responsiveness and T and B cell markers in Down's syndrome at different ages. **Eur. J. Immunol.**, 5(9): 600-603, 1975.

CALDERONE, R.A.; FONZIWA, W.A. Virulence factors of *C. albicans*. **Trends Microb.**, 9: 327-335; 2001.

CAMPOS, C.C. **Contagem de streptococos do grupo *mutans* em crianças com Síndrome de Down**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. 2001. 57 p.

CÂNDIDO, R.C. ***C. albicans*: marcadores epidemiológicos em amostras isoladas de diferentes materiais biológicos**. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. 1991. 167 p.

CÂNDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMEAU, M.C. Enzimotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas na mucosa bucal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(6): 437-442, 2000.

CARAMALAC, D.A. **Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidas: tipagem das amostras de *C. albicans***. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. 1995. 123 p.

CARDOSO, M.F.S.; CORREA, L.; MEDEIROS, A.C.T. A higienização dos brinquedos em ambiente hospitalar. **Prat. Hosp.**, 7(2): 42-63, 2005.

CARLSTEDT, K.; KREKMANOVA, L.; DAHLLOF, G.; ERICSSON, B.; BRAATHEN, G.; ODEER, T. Oral carriage of *Candida* species in children and adolescents with Down's syndrome. **Int. J. Pediatr. Dent.**, 6(2): 95-100, 1996.

CARTA, M.G.; SERRA, P.; GHIANI, A.; MANCA, E.; HARDOY, M.C.; DEL GIACCO, G. S.; DIAZ, G.; CARPINIELLO, B.; MARCONI, P.E. Chemokines and pro-inflammatory cytokines in Down's syndrome: an early marker for Alzheimer-type dementia? **Psychother. Psychosom.**, 71(4): 233-236, 2002.

CARVALHO, L.P.; BARCELLAR, O.; NEVES, N.A.; CARVALHO, E.M.; JESUS, A.R. Avaliação da resposta imune celular em pacientes com candidíase recorrente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36(5): 571-576, 2003.

CARVALHO, F.G.; PARISOTTO, T.M.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and its association with early childhood caries. **Braz. J. Oral. Sci.**, 6(20): 1249-1253, 2007.

CASALI, A.K.; GOULART, L.; SILVA, L.K.R.; RIBEIRO, A.M.; AMARAL, A.A.; ALVES, S.H.; SCHRANK, A.; MEYER, W.; VAINSTEIN, M.A. Molecular typing of clinical and environmental *C. neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul. **FEMS Yeast Research**, 33C: 405-415, 2003.

CAUFIELD, P.W., CUTTER, G.R., DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of *mutans* streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. Dent. Res.**, 72(1): 37-45, 1993.

CHAFFIN, W.L.; LÓPEZ-RIBOT, J.L.; CASANOVA, M.; GOZABOLO, D.; MARTINEZ, J.P. Cell wall and secreted protein of *C. albicans*: identification, function and expression. **Microbiol. Molec. Rev.**, 62: 130-180, 1998.

COCCHI, G.; MASTROCOLA, M.; CAPELLI, M.; BASTELLI A.; VITALI, F.; CORVAGLIA, L. 2007. Immunological patterns in young with Down Syndrome: is there a temporal trend? **Acta Paediatr.** 96: 1479-1482.

COELHO, C.R.Z., LOEVY, H.T. **Aspectos Odontológicos da Síndrome de Down.** São Paulo: ARS Cvrandi em Odontologia, 1982. p. 9-16.

COGULU, D.; SABAH, E.; KUTUKCULER, N.; OZKINAY, F. Evaluation of the relationship between caries indices and salivary secretory IgA, salivary pH, buffering capacity and flow rate in children with Down's syndrome. **Arch. Oral Biol.**; 51(1): 23-28, 2006.

COLOMBO, A.L. Atualizações em infecções fúngicas. **Prat. Hosp.**, 26: 33-38, 2003.

COLOMBO, A.L.; BARCHIESI, F.; McGOUGH, D.A.; RINALDI, M.G. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth Macrodilution Method for azole antifungal susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 535-570, 1995.

DANIELSKI, V. **Síndrome de Down.** São Paulo: Ave Maria. 2002. p. 156.

DE BERNARDIS, F.A.; CASSONE, J.S.; CALDERONE, R.A. Expression of *C. albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. **Infect. Immun.**, 63: 1887-1892, 1995.

DEL POETA, M.; TOFFALETTI, D.L.; RUDE, T.H.; DYKSTRA, C.C.; HEITMAN, J.; PERFECT, J.R. Topoisomerase I is essential in *C. neoformans*: role in pathology and as an antifungal target. **Genetics**, 152: 176-178, 1999.

DÍAZ-LÓPEZ, M.M.; OLIVEROS-GARAY, M.Y.; OROZCO-DIAZ, O. Análisis SSCP (ITS2, ERG11) de aislamientos clínicos de *Candida* spp. de cavidad oral pacientes oncológicos. **Rev. Iberoam. Micol.**, 21: 182-186, 2004.

DOMMER, J.E.; LEHRER, R.I. Introduction to *Candida* Systemic Candidiasis. In: **Fungal infections and immuneresponses**. Murphy, J.W., Friendman, H.; Rendingelli, M.M. New York: Plenum Press, 1993. p. 49-116.

DOUGLAS, L.J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 130-143, 2002.

DOUGLAS, S.D.; STOKER JR., J. Down's syndrome immunological and epidemiologic associations-enigmas remain. **J. Pediatr.**, 147: 723-725, 2005.

DURAN, E.L.; MUJICA, M.T.; JEWUCHOWICZ, V.M.; FINQUELIEVICH, J.L.; PINONI, M.V.; IOVANNITTI, C.A. Estudio de la variabilidad genética entre aislamientos clínicos de *C.albicans* formadores de biopelículas. **Rev. Iberoam. Micol.**, 24: 266-271, 2007.

EL-MAGHRABI, E.A.; DIXON, D.M.; BURNETT, J.W. Characterization of *C. albicans* epidermolytic protease and their role in yeast-cell adherence to keratinocytes. **Clin. Exp. Dermatol.**, 15: 183-191, 1990.

FLIERMAN, R.; DAHA, M.R. The clearance of apoptotic cells by complement. **Immunobiol.**, 10: 1016-1025, 2007.

FRANCIOTTA, D.; VERRI, A.; ZARDINI, E.; ANDREONI, L.; DE AMICI, M.; MORATTI, R.; NESPOLI, L. Interferon- γ -and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. **Neurosci. Letters**, 395: 67-70, 2006.

FRANCISCONI, C.F.; GOLDIM, J.R. Aspectos bioéticos da confidencialidade e privacidade. In: **Introdução à Bioética**. Costa, S.I.F.; Oselka, G.; Garrafa, V. Brasília: CFM, 1998. p.269-284.

FULURIJA, A., ASHMAN, R.B., PAPADIMITRIOU, J.M. Neutrophil depletion increases susceptibility to systemic in vaginal candidiasis in mice and reveals differences between brain and kidney in mechanisms of host resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, 142: 3487-3496, 1996.

GALE, C.A.; BENDEL, C.M.; McCLELLAN, M.; BECKER, J.M.; BERMAN, J.; HOSTETTER, M.K. Linkage of adhesion, filamentous growth and virulence in *C. albicans* to a single gene INTI. **Science**, 279: 1355-1358, 1998.

GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, 33(6): 265-282, 1990.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, 12: 501-517, 1999.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Potencial role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13: 122-144, 2000.

GIAMMANCO, G.M.; LOPES, M.M.; COIMBRA, R.S.; PIGNATO, S.; GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F.; FREITAS, G.; GIAMMANCO, G. Value of morphotyping for the characterization of *C. albicans* clinical isolates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 100(5): 483-490, 2005.

GLICOGENOSE. **Doença de Armazenamento de Glicogênio**. São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://members.tripod.com/medworks/bioquimica/glicogenose.htm>>. Acesso em 30 agosto 2005.

GONZÁLEZ, H.; SILVA, I.; REYES, E. Caracterización molecular de cepas de *C. albicans* aisladas de candidiasis oral em personas HIV positivo. **Ciencia & Trabajo**, 22: 172-176, 2006.

GOTTFREDSSON, M.G.; COX., G.M.; PERFECT, J.R.. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. **Pathology**, 30: 405-418, 1998.

GREENFIELD, R.A. Host defense system interactions with *Candida*. **J. Med. Vet. Mycol.**, 30: 89-104. 1992.

GUARÉ, R.O.; CIAMPONI, A.L. Prevalence of periodontal disease in the primary dentition of children with cerebral palsy. **J. Dent. Child (Chic)**, 71: 27-32, 2004.

GUEDES, A.C. **Odontopediatria**, São Paulo: Santos, 1997. p. 45-67.

HAMELIN, R.C. ; OULLETTE, G. B.; BERNIER L. Identification of *Gremmeniella albiginea* races with random amplified polymorphic DNA markers. **Appl. Env. Microbiol.**, 59(6): 1752-1755, 1993.

HANSSON, T.; DAHIBOM, I.; ROGBERG, S.; NYBERG, B. I.; DAHLSTROM, J.; ANNEREN, G.; KLARESKOG L.; DANNAEUS, A. Antitissue transglutaminase and antithyroid autoantibodies in children with Down síndrome and celiac disease. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 40(2): 170-174, 2005.

HENNING, M.M.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relacion a la ecologia de *C. albicans* en cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez.** Caracas, v. 39, n.2, 2001_a. Disponível em: <<http://www.actaodontologica.com>>. Acesso em: 05 agosto 2005.

HENNING, M. M., PERRONE, M. La prótesis odontológica en la ecología de *C. albicans* en cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez.** Caracas, v. 39, n. 3. 2001_b. Disponível em: <<http://www.actaodontologica.com>>. Acesso em 05 agosto 2005.

HOLMES, D.K.; BATES, N.; MURRAY, M.; LADUSANS, E. J.; MORABITO. A.; BOLTON-MAGGS, H.B.; JONSTON, T.A.; WALKENSHA, W.S.; WYNN. R.F.; BELLANTUONO, I. Hematopoietic progenitor cell deficiency in fetuses and children affected by Down's syndrome. **Exp. Hematol.**, 34: 1611-1615, 2006.

HUBE, B.; NAGLICK, J.C. *albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, 147: 1997-2005, 2001.

HUBE, B.; SANGLARD, D.; ODDS, F.C.; HESS, D.; MONOD. M.; SCHAFER, W., BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Disruption of each of the aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2 and SAP3 of *C. albicans* attenuates virulence. **Infect. Immune.**, 65: 3529-3587, 1997.

HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSENZ, M.; MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHAFER, W. Secreted lipases of *C. albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Arch. Microbiol.**, 174: 362-374, 2002.

HUNTER, P.R. A critical review of typing methods for *C. albicans* and their applications. **Crit. Rev. Microbiol.**, 17: 417-434, 1991.

HUNTER, P.R.; FRASER, C.A.M.; MACKENZE, D.W.R. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. **J. Med. Microbiol.**, 28: 85-89, 1989.

IBGE. Censo. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)**. Brasília. 2000. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 08 setembro 2005.

IBRAHIM, A.S.; MIRBOD, F.; FILLER, S.G.; BANDO, Y.; COLE, G.T.; KITAJIMA, X. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *C. albicans*. **Infect. Immun.**, 63: 1993-1998, 1995.

ITO, C.Y.K.; MARTINS, C.A.P.; LOBERTO, J.C.S.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C. *In vitro* antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from patients with chronic periodontitis and from control patients. **Braz. Oral Res.**, 18(1): 80-84, 2004.

IWATA, K. Fungal toxins and their role in the etiopathology of fungal infection. In: **Recent advances in medical and mycology**, Tokio: Japan University Park Press, 1975. p.15-34.

JABLONSKA, B.; FORD, D.; TRISLER, D.; PESSAC, B. The growth capacity of bone marrow CD34 positive cell in culture is drastically reduced in a murine model of Down's syndrome. **C. R. Biolog.**, 329: 726-732, 2006.

JACOBS, P. F.; BURDASH, N. M.; MANOS, J.P.; DUNCAN, R. C. Immunologic parameters in Down's syndrome. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, 8(1): 17-22, 1978.

JENKINSON, H.F.; LALA, H.C.; SHEPHERD, M.G. Coaggregation of *S. sanguis* and other streptococci with *C. albicans*. **Infect. Immun.**, 58: 1429-1436, 1990.

JORGE, A.O.C.; JUNQUEIRA, J.C.; ROMERO, M.M.; MARTINS, C.A.P. Sensibilidade às toxinas *killer* de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal de pacientes com candidose e de indivíduos normais. **Rev. Odontol.**, 29 (1/2): 71-80, 2000.

KAHAMA, M.; SEGAL, E.; SCHEWACH-MILLET, M.; GOU, Y. *In vitro* adherence of *C. albicans* to human corneocytes. **Acta Dermatol. Venereol.**, 68: 98-101, 1988.

KALLAUR, A. P.; BUQUI, G. A.; SABINO, G.C.; MASTELLARI, R. B.; MORIMOTO, H. K.; VOGLER, I. H.; REICHE, E. M. V. Frequência das alterações dos níveis de imunoglobulinas dos pacientes atendidos no Hospital Universitário de Londrina, Paraná. **Semina: C. Biolog. e da Saúde**, 28(1): 23-32, 2007.

KALO-KLEIN, A.; WITKIN, S.S. Prostaglandin E₂ enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *C. albicans*. **Infect. Immun.**, 58: 260-262, 1990.

KENNEDY, M.J.; ROGERS, A.L.; HANSELMAN, L.R.; SOLL, D.R.; YANCEY, R.J.; Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *C. albicans* white and opaque phenotypes. **Mycopathol.**, 102: 149-156, 1988.

KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Relationship between germination of *C. albicans* and increased adherence to human buccal epithelial cells. **Infect. Immun.**, 28: 464-468, 1980.

KLOTZ, S.A.; SMITH, R.L. A fibronectin receptor on *C. albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. **J. Infect. Dis.**, 163: 604-610, 1991.

KLOTZ, S.A.; SMITH, R.L. Gelatin fragments inhibit *C. albicans* yeast adherence to ECM. **Annual Meeting American Society of Microbiology**. 1990. p.100.

KOGAN, B.L. Mode de action of yeast killer toxin: channel formation in lipid membranes. **Nature**, 320: 709-711, 1983.

KREEGER-Van RIJ. **The yeast: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier. 1984. p. 1082.

LACAZ, C.S. **Candidíases**. São Paulo: EPU e EDUSP. 1980. p. 190.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação fungos actinomicetos algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier. 1998. p. 445.

LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. 8. ed. São Paulo: Sarvier 1991. p. 695.

LANCE, M.R.; WASHINGTON, C.; DAVIS, S.S. Structure and toxicity of amphotericin B/triglyceride emulsion formulations. **J. Antimicrob. Chemother.**, 36: 119-128, 1995.

LEE, S.R.; KWON, H.K.; SONG, KB, CHOI, Y.H. Dental caries and salivary immunoglobulin A in Down syndrome. **J. Paediatr. Child Health**, 40 (9-10): 530-533.

LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by RAP-DNA. **J. Clin. Microbiol.**, 30: 3249-3254, 1992.

LINOSSIER, A.; VARGAS, A.; VILLEGAS, R.; CHIMENOS, E. Quantitative relationship between salivary level of *S. mutans* and *C. albicans* in children with Down's syndrome. **Med. Oral**, 7: 284-292, 2002.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, 50: 353-380, 1986.

LONG, S.S. Down's syndrome, infections and immune function: a few pieces of the puzzle. **The J. Pediat.**, 3A: 748, 2005.

LÓPEZ, C.; GIRO, L.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Rev. Arg. Microbiol.**, 37: 16-21, 2005.

LORTHOLARY, O.; BALTIMORE, O.; BERK, A.; ZIPURSK, S.L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELI, D. **Molecular Cell Biology**. 3. ed.. New York: Scientific American Books. 1995. p. 360.

LUSVARGHI, A.S. **Estudos *in vitro* da atividade de exoenzimas, sensibilidade a toxinas killer e morfotipagem de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de pacientes HIV positivos sob tratamento com drogas inibidoras de proteinases.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia. 2002. 85 p.

MAFFEI, C.M.L. **Amostras de *C. albicans* isoladas de gestantes: fatores de virulência, sensibilidade a antifúngicos, tipagem fenotípica e genotípica.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas 1996. 183 p

MAHMOUD, S. A.; LOWERY-NORDBERG, M.; CHEN, H.; THURMON T.; URSIN, S.; BAHNA, S. L. Immune defects in subjects with dysmorphic disorders. **Allergy Asthma Proc.**, 26(5): 373-381, 2005.

MARCANTONI, M. Ecologia de la cavidad bucal. In: **Microbiología estomatológica**. Negroni, M. México: Médica Pan-Americana. 1999. p. 473-497.

MARDEGAN, R.C.; KLEIN, M.I.; GOLVEA, M.B.; RODRIGUES, J.A.O.; GONÇALVES, R.B.; HÖFLING, J. F. Biotyping and genotyping diversity oral *C. albicans* strains from caries-free and caries-actives healthy children. **Braz. J. Microbiol.**, 37: 26-32, 2006.

MARSH, P.D. Host defense and microbial homeostasis: role of microbial interections. **J. Dent. Res.**, 71: 1431-1438, 1989.

MARSH, P.D.; MARTIN, M. **Oral Microbiology**. 3. ed. London: Chapman & Hill. 1992. p. 256.

MARTINS, C.A.P.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Presence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the human oral cavity. **Braz. J. Microb.**, 33: 236-240, 2002_a.

MARTINS, C.A.P.; SANTOS, S.S.F.; LOBERTO, J.S.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, O.C. Presença *Candida* spp em pacientes com periodontite crônica. **Cienc. Odontol. Bras.**, 5(3): 75-85, 2002_b.

MATTHEWS, R.C. Pathogenicity determinants of *C. albicans*: potencial targets for immunotherapy? **Microbiol.**, 140: 505-511, 1994.

MEHTA, P.D.; DALTON, A.J.; MEHTA, S.P.; PERCY, M.E.; SERSEN, E.A.; WISNIEWSKI, H.M. Immunoglobulin G subclasses in older persons with Down's syndrome. **J. Neurol. Sci.**, 117(1-2): 186-191, 1993.

MELO, A.S.A.; SERAFIM, C.R.; BRIONES, M.R.S. Identification of genes differentially expressed in hiphae of *C. albicans*. **Braz. J. Microbiol.**, 34: 135-137, 2003.

MENEZES, E.A.; GUERRA, A.C.P.; RODRIGUES, R.C.B.; PEIXOTO, M.M.L.; LIMA, L.S.; CUNHA, F. A. Isolamento de *Candida* spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite

Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de suscetibilidade a antifúngicos. **J. Bras. Pat. Med. Lab.**, 40(5): 299-305, 2004.

MILLER, M.; JOHNSON, A. White-opaque switching in *C. albicans* is controlled by mating-type locus homodomain proteins and allows efficient mating. **Cell**, 3: 293-302, 2002.

MORACE, G.; ARCHIBUSACCI, C.; SESITO, M.; POLONELLI, L. Strain differentiation of pathogenic yeast by the killer system. **Mycopathologia**, 84: 81-85, 1984.

MORHART, R.; FITZGERALD, R. Composição e ecologia da flora bucal. In: **Cáries Dentárias (The Biology Basis of Dental Caries: in Oral Biology Textbook)**. 1. ed. Menaker, L.; Moraes, F.F. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1984. p. 232-344.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Meth. Enzimol.**, 155: 335-350, 1987.

MURRAY, H.M.; RUBIN, B.Y.; ROTHERMEL, C.D. Killing of intracellular *L. donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon -gamma is the activating lymphokine. **J. Clin. Invest.**, 72: 1506-1510, 1983.

NAGLICK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *C. albicans* secreted aspartyl proteinase in virulence and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 67: 400-428, 2003.

NAGLICK, J.R.; NEWPORT, G.; WHITE, T.; FERNANDES-NAGLIK, L.; GREENSPAN, J.S.; GREENSPAN, D.; SWEET, S.P.; CHALLACOMBE, S.J.; AGABIAN, N. *In vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. **Infect. Immun.**, 67: 2482-2490, 1999.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard. Wayne, NCCLS, 18, M27-A. 1997.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratorial.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard. Wayne, NCCLS, 18, M38-P. 1998.

NISHIDA, Y.; SANO, Y.; AKAOKA, I.; MARUKI, M.; SUZUKI, T.; MARUKI, K. Abnormal serum immunoglobulin levels in Down's syndrome patients. **Am. J. Ment. Defic.**, 83(1): 16-20, 1978.

ODDS, F.C. Pathogenesis of *Candida* infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 31/2: 2-5, 1994.

ODDS, F.C.; WEBSTER, C.E.; MAYURANATHAN, P.; SIMMONS, P.D. *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, 26: 277-283, 1988.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, E.E.; SILVA, S.C.; SOARES, A.J.; ATTUX, C.; CRUVINEL, B.; SILVA, M.R.R. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31(5): 523-527, 1998.

OLLER, M.W.; SOHNCHEN, R.; KORTING, H.C.; OLLERT, U.; BRAUTIGAM, S.; BRAUTIGAM, W. Mechanism of adherence of *C. albicans* to cultures human epidermal keratinocytes. **Infect. Immun.**, 61: 4560-4568, 1994.

ORPHANET. Doenças raras. **Homocistinúria por Deficiência de Cistationina Beta-Sintetase.** São Paulo. 2005. Disponível em: <<http://www.orphanet.com.br>>. Acesso em 30 agosto 2005.

OZKINAY, F.; COGULO, O.; GUNDUZ, C.; CANKAYA, T.; AYDOGDU, S.; OZGENC F.; KUTUKCELER, N.; OZKINAY, C. Celiac disease in children with Down syndrome: importance of follow-up and serologic screening. **Pediatr. Int.**, 45(4): 395-399, 2003.

PAIVA, T.C.B.; GELLER, M.; OVOSKY. Imunologia na candidíase. **JBM**, 76(5): 12-28.

PANIAGUA, C.G.L.; MONROY, P.E.; NEGRETE, A.E.; VACA, P.S. Susceptibility to 5-fluorocytosine, miconazole and amphotericin B of *C. albicans* strains isolated from throat of non-AIDS patients. **Rev. Latinoameric. Microbiol.**, 44(2): 65-68, 2002.

PANIZO, M. M.; REVIAKINA, V. *C. albicans* y su efeito patógeno sobre las mucosas. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, 21(2): 15-31. 2001.

PARDI, G.; CARDOZO, E.I. Algumas consideraciones sobre *C. albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. **Acta Odontol. Venez.** Caracas, v. 40, n. 1, 2002. Disponível em : <<http://www.actaodontologica.com>>. Acesso em 05 agosto 2005.

PARDI, G.; CARDOZO, E.I.; PERRONE, M.; SALAZAR, E. Deteccion de espécies de *Candida* en pacientes com estomatitis sub-protésica. **Acta Odontol. Venez.** Caracas, v. 39, n. 2, 2001. Caracas. Disponível em: <<http://www.actaodontologica.com>>. Acesso em 05 agosto 2005.

PARSLOW, T.G. Imunoglobulinas e genes das imunoglobulinas In: **Imunologia médica** Stites, D.P. et al. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. S. A. 2000. p. 73-88 .

PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.A.; GRUMACH, A.S. Subclasse de IgG e sua importância em pediatria. **Pediatria**, 16: 60-64, 1994.

PHONGPAICHIT, S., MACKENZIE, D.W.R., FRASER, C. Strain differentiation of *C. albicans* by morphotyping. **Epiderm. Inf.**, 99: 421-428, 1987.

PIMENTA, F.C.; MARIN, J.M.; UZEDA, M.; ITO, I.Y. Prevalência de estreptococos do grupo *mutans* e leveduras na saliva de 93 membros de seis famílias. **Rev. Pat. Trop.**, 30(1): 15-22, 2001.

PINTO, M.P. **Caracterização fenotípica e análise da variabilidade de genética de espécies do gênero *Candida* isoladas de pacientes portadores e não portadores de doença de base.**

Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. 2003. 148 p.

PINTO, P.M.; RESENDE, M.A.; KOGA-ITO, C.Y.; FERREIRA, J.A.G.; TENDER, M. Restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, 2002. (being submitted).

PIRES, M.F.C.; CORRÊA, B.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Experimental model of *C. albicans* (serotypes A and B) adherence *in vitro*. **Braz. J. Microbiol.**, 32: 163-169, 2001.

PIRES, C.C.; SILVA, F.A.; NETTO, J.V. Síndrome de Down - Implicações odontológicas e possibilidades terapêuticas. **Anais do II Cong. Bras. e I Enc. Lat. Americ. sobre Sínd. de Down**: 59-62. 1997.

PIRES-GONÇALVES, R.H.; MIRANDA, E.T.; BAEZA, L.C.; MATSUMOTO, M.T.; ZAIA, J.E.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Genetic relatedness of commensal strains of *C. albicans* carried in the oral cavity of patients dental prosthesis users in Brazil. **Mycopathologia**, 164: 255-263, 2007.

POLONELLI, L.; ARCHIBUSSACCI, C.; SESTITO, M.; MORACE G. Killer system: a simple method for differentiating *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 15-20, 1983.

POLONELLI, L.; CONTI, S.; GERLONI, M.; CAMPANI, L.; MANTOVANI, M.P.; MORACE, G. Production of yeast killer toxin in experimentally infected animals. **Micopathologia**, 110: 169-175, 1990.

PRINCE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate methods for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 15-20, 1982.

PUC CETTI, P.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; MOSCI, P.; ENSSLE, K.H.; ROMANI, L.; BISTONI, F. Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin – 4 receptor. **J. Infect. Dis.**, 169: 1325-1331, 1994.

QUINDÓS, G.; RUESGA, M.T.; MARTIN-MAZUELOS, E., SALESA, R.; ALONSO-VARGAS, R.; CARRILLO-MUNOZ, A.J.; BRENA, S.; MILLAN, R.S.; PONTÓN, J. *In vitro* activity of 5-fluorocytosine against 1.021 Spanish clinical isolates of *Candida* and other medically important yeasts. **Rev. Iberoam. Micol.**, 21: 63-69, 2004.

QUIRINO, M.R.S. **Estudo clínico e microbiota fúngica da cavidade bucal de diabéticos controlados e não controlados**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Taubaté. Faculdade de Odontologia. 1990. 54 p.

RAY, R.L.; PAYNE, C.D. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. **Infect. Immun.**, 58: 508-514, 1990.

RESENDE, J.C.P.; FRANCO, G.R.; ROSA, C.A.; HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. Phenotypic and genotypic identification of *Candida* spp. isolated from hospitalized patients. **Rev. Iberoam. Micol.**, 21: 24-28, 2004.

RIBEIRO, E.L. **Aspectos biológicos das leveduras do gênero *Candida* isoladas de candidíase vaginal**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. 1997. 127 p.

RIBEIRO, E.L.; CAMPOS, C.C.; CRESPO, A.M.C.; CASTRO, J.S.; ROCHA, F.C.; ALVES, M.P.; GOULART, M.S.; CARDOSO, C.G.; FERREIRA, W.M.; NAVES, P.L.F.; SOARES, A.J.; MIRANDA, S.R.; PIMENTA, F.C. Detecção de *C. albicans* fosfolipidolíticas isoladas da saliva de crianças com Síndrome de Down. **Acta Med. Portug.**, 14(3): 33-42, 2002.

RIBEIRO, E.L.; GUIMARÃES, R.I.; INÁCIO, M.C.C.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S.; NAVES, P.L.F. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. **NewsLab**, 64: 106-128, 2004.

RIBEIRO, E.L.; SCROFERNEKER, M.L.; CAVALHAES, M.S.; CAMPOS, C.C.; NAGATO, G.M.; SOUZA, N.A.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S.;

PIMENTA, F.C.; TOLEDO, O.A. Phenotypic aspects of oral strains of *C. albicans* in children with Down's syndrome. **Braz. J. Biol.**, 66(3): 939-944, 2006.

RIBEIRO, L.M.A.; JACOB, C.M.A.; PASTORINO, A.C.; FOMIN, A.B.F.; CASTRO, A.P.B.M.; LIMA, K.I.M.; PEREIRA, C.A.E. Avaliação dos fatores associados a infecções recorrentes e/ou graves em pacientes com Síndrome de Down. **J. Pediat.** 79(2): 141-148, 2003.

RIBEIRO, M.A. **Exoenzimas e mecanismos moleculares de resistência ao fluconazol de *C. albicans* isoladas de mulheres HIV positivas.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. 2002. 156 p.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **Fungal infections diagnosis and management.** London: Blackweell. 1999. p.164.

ROMANI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; SPACCAPELO, R.; GROHMANN, U.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Gamma interferon modifies CD₄⁺ subset expression in murine candidiasis. **Infect. and Immun.**, 60: 4950-4952, 1992_a.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; GROHMANN, U.; MOCCI, P.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper 1- associated immunity in murine candidiasis. **J. Experim. Med.**, 178: 19-25, 1992_b.

ROMANI, L.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; MOSCI, P.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. CD₄⁺ subset expression in murine candidiasis, Th responses correlate directly

with genetically determined susceptibility of vaccine - induced resistance. **J. Immunol.**, 150: 925-931, 1993.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P.; MENCACCI, A.; CENCI, E.; SPACCAPELO, R.; TONNELLI, L.; GROHMANN, U.; BISTONI, F. Neutralizing of IL-10 upregulation nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *C. albicans*. **J. Immunol.**, 152: 3514-3521, 1994.

RONCARI, A.M.; RODRIGUES, A.B.; ELIAS, M.S. Síndrome de Down. **Investigação**, 6: 70-74, 2002.

ROZONE, G.; MUSTACCHI, Z. **Síndrome de Down Aspectos Clínicos e Odontológicos**, São Paulo: CID. 1990. p. 248.

RUCHEL, R.; TESELLER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *C. albicans*. **Sabouraudia**, 20: 233-244, 1982.

RUCHEL, R.; UHLEMANN, K.; BÖNING, B. Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A**, 255: 537-548, 1983.

RUCHEL, R.; ZIMMERMANN, F.; BONING-STUTZER, B.; HELMCHEN, U. Candidiasis visualized by proteinase-directed immunofluorescence. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, 419: 199-202, 1991.

SAMARANAYAKE, L.P.; MacFARLANE, T.W. **Oral candidosis**. Boston: Wright. 1990. p. 265.

SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J. M.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *C. albicans in vitro*. **Sabouraudia**, 22(3): 201-207, 1984.

SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P.; DASSANAYAKE, R.S.; YAN, J.Y.Y.; TSANG, W.K.; CHEUNG, B.P.K.; YENNG, K.W.S. Genotypic shuffling of

sequential clones of *C. albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. **J. Med. Microbiol.**, 52: 349-359, 2003.

SÁNCHEZ-VARGAS, L.O.; ORTIZ-LÓPEZ, N.G.; VILLAR, M.; MORAGUES, M.D.; AGUIRRE, J.M.; CASHAT-CRUZ, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; GAITÁN-CEPEDA, L.A.; QUINDÓS, G. Point prevalence, microbiology and antifungal susceptibility patterns of oral *Candida* isolates colonizing or infecting Mexican HIV/AIDS patients and healthy persons. **Rev. Iberoam. Micol.**, 22: 83-92, 2005.

SANGLARD, D.; HUBE, B.; MONOD, M.; ODDS, F.C.; GOW, N.A.R. A triple detection of the aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5 and SAP6 of *C. albicans* attenuates virulence. **Infect. Immunol.**, 65: 3539-3546, 1997.

SCHALLER, M.; JAMUSCHKE, J.; SCHACKERT, C.; WOERLE, B.; KORTING, H.C. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *C. albicans* during oral and cutaneous candidosis *in vivo*. **J. Med. Microbiol.**, 50: 743-747, 2001.

SCHARDOSIMI, L.R.; CHERUBINI, K. Quantificação de *C. albicans* na cavidade bucal de crianças. **Rev. Bras. Patol. Oral**, 3: 155-158, 2004.

SCHERMA, A.P.; SANTOS, D.V.O.; JORGE, A.O.C.; ROCHA, F.C. Presença de *Candida* spp na cavidade bucal de lactantes durante os primeiros quatro meses de vida. **Cienc. Odontol. Bras.**, 7(3): 79-86, 2004.

SEGER, R.; BUCHINGER, G.; STRÖDER, J. On the influence of age on immunity in Down's syndrome. **Eur. J. Pediatr.**, 124(2): 77-87, 1977.

SENET, J-M. Risk factors and physiopathology of candidiasis. **Rev. Iberoam. Micol.**, 14: 6-13, 1977.

SHAW, W. Função da sensibilidade a alimentos e anormalidades microbiais em pessoas com Síndrome de Down. **Laboratório Great Plains, Inc.** São Paulo. 2001. Disponível em: <<http://www.greatplains.com/portuguese/immune>>. Acesso em 08 agosto 2002.

SHIMADA, A.; HAYASHI, Y.; OGASAWARA, M.; PARK, M.; KATOH, M.; MINAKAMI, H.; KITOH, T.; KOJIMA, S.; KAWA, K.; KIMURA, H. Pro-inflammatory cytokinemia is frequently found in Down's syndrome patients with hematological disorders. **Leukemia Res.**, 10: 1016-1021, 2006.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. p. 388.

SILVEIRA, F.R.X.; BIRMAN, E.G.; PAULA, C.R.; BATISTA, J.M. Proteinase and phospholipase activity of *C. albicans* isolated from oral mucosa of healthy carriers (smokers and non smokers). **Rev. Iber. Micol.**, 10: 105-108, 1993.

SIMMONDS, R.S.; TOMPKINS, G.R.; GEORGE, R.J. Dental caries and the microbial ecology of dental plaque: review of recent advances. **N. Z. Den. J.**, 96: 44-49, 2002.

SIQUEIRA, W.L.; BERMEJO, P.R.; MUSTACCHI, ZAN.; NICOLAU, J. Buffer capacity, pH, and flow rate in saliva of children aged 2-60 months with Down syndrome. **Clin. Oral Invest.**, 9: 26-29, 2005.

SOARES, J.A.; BARBOZA, M.A.I.; CROTI, U.A.; FOSS, M.H.D.A.; MOSCARDINI, A.C. Distúrbios respiratórios em crianças com Síndrome de Down. **Arq. Ciênc. Saúde**, 11: 230-233, 2004.

SOLL, D.R. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. **Clin. Microbiol. Rev.**, 13: 332-370, 2000.

SOUZA, B.E.M.; PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; CURY, A.E. Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de

amostras de *C. albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. **Rev. Microbiol.**, 21: 247-253, 1990.

SPACCAPELO, R.; ROMANI, L.; TONNETTI, L.; CENCI, E.; MENCACCI, A.; DEL SERO, G.; TOGNELLINI, R.; REED, S.G.; MOSCI, P.; PUC CETTI, P.; BISTONI, F. TGF – Beta is important in determining the *in vivo* patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *C. albicans*. **J. Immunol.**, 155: 1349-1360, 1995.

SRIVASTAVA, L.M.; AGARWAL, D.P.; GOEDDE, H.W. The serum immunoglobulin levels in Down's syndrome and other diseases associated with mental disorder. **Z. Immunitätsforsch Exp. Klin. Immunol.**, 150(3): 277-280, 1975.

STAIB, F. Serum proteins as nitrogen source for yeast-like fungi. **Sabouraudia**, 4: 187-193, 1965.

STARR, J.R.; WHITE, T.C.; LEROUX, B. G.; LUÍS, H. S.; BERNARDO, M.; LEITÃO, J.; ROBERTS, M.C. Persistence of oral *C. albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. **Oral Microbiol. and Immunol.**, 17(5): 304-310, 2002.

STEFFAN, P.; VAZQUEZ, J.H.; BOLKOV, D.; XU, C.; SOBEL, J.D.; ALKINS, R.A. Identification of *Candida* species by RAP-DNA fingerprinting of colony lysates. **J. Clin. Microbiol.**, 35: 2031-2039, 1997.

STEHR, F.; FELF, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHALLER, M.; SCHAFER, W.; HUBE, B. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *C. albicans* infections. **Mycoses**, 43 (suppl): S17-S21, 2002.

STEVENS, D.A.; ODDS, F.C.; SHERER, S. Application of DNA typing methods to *C.albicans* epidemiology and correlations with phenotype. **Rev. Infect. Dis.**, 12: 258-266, 1990.

STITES, D.P.; TERR, A.I.; PARSLOW, T.G. **Imunologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2000. p. 689.

STOLTZNER, S.E.; GRENFELL, T. J.; MORI, C.; WISNIEWSKI, K. E.; WISNIEWSKI, T.M.; SELKOE, D.J.; LEMERE, C. A. Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. **Am. J. Pathol.**, 156(2): 489-499, 2000.

SULLIVAN, D.J.; WESTERNENG, T.J.; HAYNES, K.A.; BENNETT, D.E.; COLEMAN, D.C. *C. dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV – infected individuals. **Microbiology**, 141: 1507-1521, 1995.

SUSTROVÁ, M.; STRIBAK, V. Thyroid function and plasma immunoglobulins in subjects with Down's syndrome during ontogenesis and zinc therapy. **J. Endocrinol. Invest.**, 17(6): 385-390, 1994.

TENOVOU, J. Antimicrobial function of human saliva – how important is it for oral health? **Acta Odontol. Scand.**, 56: 250-256, 1998.

TIRABOSCHI, I.N.; CARNOVALE, S.; BENETUCCI, A.; FERNÁNDEZ, N.; KURLAT, I.; FOCOLLI, M.Y.; LASALA, M.B. Brote de candidemia por *C. albicans* em neonatología. **Rev. Iberoameric. Micol.**, 24: 263-267, 2007.

TOMERUP, I.C.; BARTON, J. E.; O'BRIEN, A. Reliability of RAPD fingerprint of three basidiomycete fungi, *Laccaria*, *Hydnangium* & *Rhizoctonia*. **Microbiol. Res.**, 99: 179-186, 1995.

TOMMASO, A.M.A. Glicogenose. **Hepcentro Laboratório**. São Paulo. 2004. Disponível em: <<http://www.hepcentro.com.br/glicogenoses.htm>>. Acesso em 30 agosto 2005.

TRINCADO, M.V.R.; TOLEDANO, F.,L.; RAMOS, M.M.M.; CORINA, A.R.; VILLALOBOS, V.S. Evaluation of the immune system in Down's syndrome patients. **Allergol. Immunopathol. (Madr)**, 12(1): 45-52, 1984.

URIZAR, J.M.A. Candidiasis orales. **Rev. Iberoam. Micol.**, 19: 17-21, 2002.

VALÉRIO, H.M.; WEIKERT-OLIVEIRA, R.C.B; RESENDE, M.A. Differentiation of *Candida* obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39: 174-178, 2006.

VATIVARIAN, S.; SMITH, C.B. Pathogenesis, host resistance and predisposing factors. In: **Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment**. Bodey, G.P. 2. ed. USA: Reaven Press. p. 59-84. 1993.

VAZQUEZ, J.A.; BECKELEY, A.; SOBEL, J.D.; ZERVOS, M.J. Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed-field gradient gel electrophoresis as typing systems for *C. albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 962-967, 1991.

VIDOTTO, V.; PONTÓN, J.; AOKI, S.; QUINDÓS, G.; MANTOAN, B.; PUGLIESE, A.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, K. Differences in extracellular enzymatic activity between *C. dubliniensis* and *C. albicans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, 21: 70-74, 2002.

VIEIRA, J.D.G.; RIBEIRO, E.L.; CAMPOS, C.C.; PIMENTA, F.C.; TOLEDO, O.A.; NAGATO, G.M.; SOUZA, N.A.; FERREIRA, W.M.; CARDOSO, C.G.; DIAS, S.M.S.; JÚNIOR, C.A.A.; ZATTA, D.T.; SANTOS, J.S. *C. albicans* isoladas da cavidade bucal de crianças com Síndrome de Down: ocorrência e inibição de crescimento por *Streptomyces* sp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38(5): 383-386, 2005.

WEBB, B.C.; THOMAS, C.J.; WILLCOX, M.D.P.; HARRY, D.W.S.; KNOX, K.W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Aust. Dent. J.**, 43: 45-50, 1998.

WELSH, J., McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, 18: 7213-7218, 1990.

WERNER, H. Untersuchungen über die Lipase-Aktivität bei Hefen und Hefehäutlichen Pilzen. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. A.**, 200: 113-116, 1966.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, 11: 382-402, 1998.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. **Meth. Enzymol.**, 218: 704-740, 1993.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, 18: 6531-6535, 1990.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETT, E.; SHINOBU, C.S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T.I.E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 40(3): 272-276, 2007.

WRIGTH, R.J.; CARNE, A.D.; LAMONT, L.L.; EMERSON, G.W.; SULLIVAN, P.A. A second gene for a secreted aspartate proteinase in *C. albicans*. **J. Bacteriol.**, 174: 7848-7853, 1992.

XU, J.; BOYD, C.M.; LIVINGSTON, E.; MEYER, W.; MADDEN, J.F.; MITCHELL, T.G. Specific and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 3835-3843, 1999.

XU, J.; RAMOS, A.R.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T.G. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *C. albicans*. **J. Clin. Microbiol.**, 38(3): 1214-1220, 2000.

ZAIT, C., MARQUES, S.A., RUIZ, L.R., SOUZA, V.M. **Compêndio de micologia médica.** Rio de Janeiro: Medsi. 1998. p. 434.

ZEPELIN, M.B.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WURZNER, R.; SANGLARD, D. HIV - protease inhibitors reduce cell adherence of *C. albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. **J. Inv. Dermatol.**, 113: 747-751, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

PROCOLO CEPMHA/HC/UFG N.º 035/2002

Em, 27/03/2002

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Prof. Evandro Leão Ribeiro

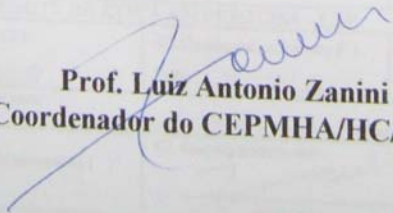
TÍTULO: "Leveduras de Candida isoladas da boca de crianças com e sem Síndrome de Down: Aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas".

Área Temática: Grupo III.

Patrocinador:

Número do Estudo do Patrocinador:

Comunicamos- lhe (s) que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal/HC/UFG, analisou e aprovou o projeto de pesquisa protocolado neste CEPMHA/HC/UFG sob o n.º 035/2002, bem como o Termo de Consentimento e estes foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.


Prof. Luiz Antonio Zanini
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Informação ao Paciente e/ou Responsável

Levedura de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem síndrome de Down: Aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas.

Prezado Paciente

Você (pai,mãe ou responsável) através de sua criança, seus irmãos e pais estão sendo convidados a participar de uma pesquisa que visa compreender como ocorre o sapinho na boca de crianças (candídiase bucal) com a síndrome de Down através do comportamento que esse micorganismo apresenta, sabendo que essa doença é freqüente nessas crianças. Este documento irá lhe fornecer informações importantes sobre o estudo. Por favor, leia as instruções abaixo atentamente e esclareça suas dúvidas junto ao dentista e biomédico para decidir a própria criança em si, através de seus responsáveis (pais), demais filhos e os próprios pais se desejam ou não participar do estudo.

Objetivo do Estudo

Este trabalho tem por objetivo verificar em testes laboratoriais que estudam as características do fungo, se esse micorganismo apresentar maior capacidade de causar doença na criança com síndrome de Down que as crianças sem a síndrome, pois a quantidade desse micorganismo na boca das portadoras dessa síndrome é maior. O número de casos de sapinho bucal é grande como uma micose que se aproveita de outras doenças para se manifestar e/ou causando doença sozinha.

Condução do Estudo

A criança com síndrome de Down, seus irmãos ou na ausência desses, os pais serão submetidos a uma única coleta de secreção salivar a partir da mucosa jugal da boca com swab pelo dentista na Clínica-Escola da Faculdade de Odontologia/UFG, após avaliação odontológica, e a criança com síndrome de Down aceitando, com consentimento de seus pais ou responsável e acompanhamento ao Laboratório de Coleta de Material do IPTSP/UFG, através de um biomédico, será coletado também uma única vez, amostra de sangue.

Crianças participativas do Estudo

Este estudo será incluído todas as crianças com síndrome de Down, irmãos quando houver e pais, além do grupo controle (outras crianças sem síndrome) que apresentarem a faixa etária de 0 (zero) a 10 (dez) anos as crianças em questão de estudo e aceitarem espontaneamente ambas coletas de saliva e sangue.

Riscos

Estas coletas são freqüentes a todos os indivíduos humanos e serão realizados por profissionais habilitados e em centros de referência em estudos odontológicos e com micoses de meio acadêmico-científico. Deste modo acreditamos que os riscos serão mínimos.

Benefícios

Estes advirão desde o momento da coleta de saliva pois todos os participantes serão inclusos em tratamento odontológico pela clínica-escola da Faculdade de Odontologia/UFG. Posteriormente os resultados do trabalho que servirão de dados para tese de doutorado permitirá o delineamento de uma conduta odontológica que diminua ou reduza ao máximo a ocorrência de sapinho na boca dessas crianças inclusive com um asseio bucal de melhor qualidade.

Participação Voluntária

Participar deste estudo será uma decisão voluntária e você (criança, irmão, pais e/o responsável) poderá se recusar a participar ou desistir deste estudo a qualquer momento, sem explicar o por quê, mesmo se tratando de uma única coleta de ambos materiais biológicos. A recusa em participar do estudo não implicará na descontinuidade da assistência odontológica.

Confidencialidade

Os dados a serem utilizados deste estudo terão como princípio básico a manutenção do sigilo e da integridade moral e física de quaisquer participantes, ficando o coordenador do projeto, responsável pelo cumprimento dessa conduta profissional.

Responsabilidade técnica

Biomédico :Prof. Assistente de Micologia IPTSP/UFG

Evandro Leão Ribeiro fone(s): (62) 224-4664 e 9973-2646

Odontóloga Prof^a Assistente de Clínica Odontológica FO/UFG

Cerise de Castro Campos fones(s): (62) 223-0433 e 9979 - 3412

Consentimento

Levedura de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem síndrome de Down: Aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas.

Termo de consentimento livre e esclarecido

O projeto “Levedura de *Candida* isoladas da boca de crianças com e sem síndrome de Down: Aspectos feno-genotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas.”, tem como objetivo verificar se as leveduras colhidas da saliva jugal provenientes da boca de crianças com síndrome de Down apresentam-se como microrganismo mais infecciosos ao sapinho da boca dessas crianças que as de crianças sem síndrome. Verificando ainda como o sistema imune da criança, através de coleta de sangue se apresenta quanto a produção de anticorpos.

Estas avaliações laboratoriais tanto de saliva de cada criança, irmão (se houver) e pais como de sangue apenas de crianças com síndrome de Down permitirá definir a linha de conduta da terapia odontológica para reduzir o número de casos de sapinho na boca dessa crianças e como as mesmas poderiam chegar a boca a partir da comparação se são as mesmas que se encontram na boca dos irmãos, se houverem e pais e/ou responsável.

As informações clínicas e laboratoriais serão utilizadas confidencialmente para este estudo.

Declaro ter explicado em detalhes os procedimentos acima descritos no texto “Informação ao Paciente, Pais e/ou Responsável” e a estes concedidos a oportunidade de fazer demais perguntas que julgarem necessárias ao melhor esclarecimento.

 Prof. Evandro Leão Ribeiro
 (INVESTIGADOR/COORDENADOR)

 Prof^a Cerise de Castro Campos
 (ODONTÓLOGA)

Declaro ter entendido as explicações recebidas e concordo livremente em participar do estudo , podendo desistir em qualquer momento.

Nome da Criança _____ Nº do Paciente _____

Data: ____/____/____

 Assinatura dos Pais e/ou Responsável

 Testemunha

ANEXO 2



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA E UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, FACULDADE DE ODONTOLOGIA &
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA



CENTRO ODONTO-MICROBIOLÓGICO EM SÍNDROME DE DOWN

Setor de Odontopediatria

FICHA DO PACIENTE

01. Paciente _____ 02. Idade _____
03. Prontuário nº _____ 04. Filiação _____
05. Gênero _____ 06. Cor _____ 07. Peso _____
08. Endereço _____

ODONTOLOGIA

09. Avaliação clínico-odontológica _____
10. Antecedentes odontológicos _____
11. Antecedentes clínicos _____
12. Uso de medicamentos _____ 13. Enfermidades Congênicas _____
14. OBS complementares _____

COLETA ODONTOLÓGICA

15. Saliva () *Candida sp* (swabs e tubos de ensaio com salina)
16. Relação Intrafamiliar: () Pai () Mãe () Responsável _____
() Irmãos: (01) (02) (03) (04) (05) (+)

Nome(s): Pai _____	Idade _____
Mãe _____	Idade _____
Responsável _____	Idade _____
Irmãos: 01 _____	Idade _____
02 _____	Idade _____
03 _____	Idade _____
04 _____	Idade _____
05 _____	Idade _____
(+) _____	Idade _____

17. OBS complementares _____

18. Responsável _____ 19. Data _____ 20. Horário _____

SETOR DE COLETA/IMUNOLOGIA – IPTSP/UFG

(Paciente em Estudo – Criança com síndrome de Down)

19. Coleta () sangue 20. Identificação nº _____
21. Responsável _____
22. Data _____ 23. Horário _____
24. OBS complementares _____

Obs: Ficha elaborada de acordo com o procedimento micológico e de coleta de sangue de pacientes com Síndrome de Down encaminhados ao Laboratório de Fungos Patogênicos do IPTSP/UFG

ANEXO 3

Meios de cultura, soluções, reagentes e leveduras-padrão

Solução de salina Kreegen-Van Rij, 1984; Lacaz et al., 1991

Cloreto de sódio (Reagen).....	0,85g
Água destilada.q.s.p.	1000,0mL

A solução foi esterilizada em balão volumétrico de fundo chato de 2L, fechado com tampão de algodão hidrófobo, autoclavada a 121°C por 15 minutos e armazenada em geladeira.

Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol Kreegen-Van Rij, 1984; Lacaz et al., 1991

Ágar (Difco).....	15,0g
Peptona bacteriológica (Difco).....	10,0g
Glicose (Sigma).....	40,0g
Extrato de levedura (Merck)	5,0g
Infusão de cérebro-coração (<i>Brain Heart Infusion – BHI</i>) (Sigma)	1,0g
Cloranfenicol (Farmitalia/Carlo Erba).....	0,1g
Água destilada. q.s.p.....	1000,0mL

O meio de cultura Sabouraud foi adicionado à água destilada e a solução foi aquecida até a completa dissolução, juntando-se o cloranfenicol. Após homogeneização, o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e distribuído 5mL em tubos de ensaio de 15x160mm esterilizados, fechados com tampão de algodão hidrófobo, inclinados e mantidos sob refrigeração.

Ágar corn-meal - Tween 80 Kreegen-Van Rij, 1984; Lacaz et al., 1991

Ágar <i>corn-meal</i> (Merck).....	17,0g
Tween 80 (Bacto).....	2,8mL
Água destilada q.s.p.	1000,0mL

O meio foi adicionado à água destilada e aquecido até a sua completa fusão. Após acrescentar o *tween 80*, o meio foi autoclavado, em tubos de ensaio de 15x160mm em volumes de 10mL fechados com tampão de algodão hidrófobo, a 121°C por 15 minutos e

armazenados sob refrigeração. No momento do uso, foi fundindo e 3mL, ainda líquido do meio, foram colocados com pipeta esterilizada sobre a superfície de uma lâmina. Após

103

solidificação foi preparado, em condição asséptica, o microcultivo das amostras do fungo em estudo.

Ágar para assimilação de fonte de carbono (Auxanograma) Kregen-Van Rij, 1984;

Lacaz et al., 1991

Sulfato de amônio (Reagen)	5,0g
Fosfato de potássio monobásico (Reagen)	1,0g
Sulfato de magnésio 7H ₂ O (Reagen).....	0,5g
Ágar (Difco)	20,0g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

Dissolver o ágar em água destilada e aquecer para solubilização. Adicionar os sais, homogeneizar e autoclavar a 121°C por 15 minutos em balão volumétrico de fundo chato de 2L. Em seguida distribuir 18 mL do meio em tubos de ensaio esterilizados de 30x200mm, fechados com tampão de algodão hidrófobo e armazenar sob refrigeração.

Açúcares empregados no auxonograma

Glicose, maltose, galactose, lactose, sacarose, rafinose e celbiose (Merck)

Caldo para fermentação de fonte de carbono (Zimograma) Kregen-Van Rij, 1984;

Lacaz et al., 1991

Extrato de leveduras (Merck).....	0,5g
Peptona bacteriológica (Difco).....	0,5g
Água destilada q.s.p.	100,0mL
Açúcar (maltose, glicose, sacarose ou lactose) (Merck)	1,0g
Azul de bromocresol (1,6g em 100mL álcool)	0,1mL

Distribuir alíquotas de 5mL em tubos ensaio de 12x120mm, com tubo de Durham invertido, fechados com tampão de algodão hidrófobo. Esterilizar o meio em autoclave a 121°C por 15 minutos e armazenar em geladeira até o momento de uso.

Ágar extrato de malte Pongpaichit et al., 1987 e Hunter et al., 1989

Ágar extrato de malte (Oxoid).....	6,0g
------------------------------------	------

Ágar (Difco).....	20,0g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

104

Dissolver o ágar em água destilada acrescentar extrato de malte e aquecer para total solubilização. Em seguida o meio foi esterilizado em autoclave, num balão volumétrico de fundo chato de 2L, a 121°C por 15 minutos e distribuído 20mL em placas de Petri 20x100mm esterilizadas. Este meio foi armazenado sob refrigeração.

Solução para formação de tubo germinativo Kreegen-Van Rij, 1984; Odds, 1988

Soro fetal bovino (LGCBio).....	0,5mL
---------------------------------	-------

A solução de soro fetal bovino foi adicionada a tubos de ensaio de 15x60mm acrescido de 0,5% de glicose e mantido em banho-mantido a 37°C no momento de uso.

Ágar de albumina (Rüchel et al., 1982)

Meio A

Base de carbono para leveduras (<i>Yeast Carbon Base</i>) (Difco).....	11,7g
Albumina bovina fração V (Sigma).....	2,0g
Protovit (Roche).....	2,5mL
Água destilada q.s.p.....	100,0mL

O meio foi esterilizado por filtração (membrana Miliporre de 0,22µm).

Meio B

Ágar (Difco).....	18,0g
Água destilada q.s.p.....	900,0mL

O meio foi totalmente dissolvido em água destilada mediante aquecimento. Posteriormente, foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Quando o meio B foi resfriado a 45°C, o meio A foi adicionado e após homogeneização, distribuído em placas de Petri de 20x100mm esterilizadas e mantidas em geladeira até o momento de uso.

Ágar Sabouraud acrescido de emulsão de ovo (Prince et al., 1982)

Meio A

Gema e ovo.....	80,0g
-----------------	-------

Solução fisiológica a 0,85% 80,0mL

105

O meio foi adicionado a um erlenmeyer de 250mL com pérolas de vidro esterilizadas e homogeneizado até a formação de solução de emulsão de ovo.

Meio B

Peptona bacteriológica (Difco)..... 10,0g
Glicose (Sigma)..... 20,0g
Cloreto de sódio (Reagen)..... 57,3g
Cloreto de cálcio (Reagen)..... 0,55g
Ágar (Difco)..... 20,0g
Água destilada q.s.p.....1000,0mL

Após aquecimento para dissolução dos ingredientes, o meio B foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Depois de resfriado a 45°C, foi adicionado ao mesmo, o meio A e homogeneizado. O meio B foi em seguida, distribuído em placas de Petri de 20x100mm esterilizadas e mantido sob refrigeração até o emprego.

Ágar Sabouraud dextrose modificado Polonelli et al., 1990

Glicose (Sigma)..... 20,0g
Peptona bacteriológica (Difco)..... 10,0g
Azul de metileno (Merck) 0,03g
Ácido cítrico (Merck)..... 19,2g
Fosfato de potássio dibásico (Reagen)..... 34,8g
Ágar (Difco)..... 20,0g
Água destilada q.s.p.....1000,0mL

O pH do meio foi ajustado em $4,7 \pm 0,2$ a 25°C, o ágar fundido e volumes de 20mL foram distribuídos em tubos de ensaio de 30x200mL, fechados com algodão hidrófobo, esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e armazenados em geladeira.

Leveduras produtoras das toxinas *killer* Polonelli et al., 1990

As nove leveduras padrão produtoras de toxinas *killer*, abaixo relacionadas, procedentes da Universidade de Parma – Itália, cedidas pelo Instituto de Ciências de Biomédicas da Universidade de São Paulo, e mantidas por repiques sucessivos no Laboratório de Fungos

106

Patogênicos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Leveduras-padrão	Coleção original	Prof. Polonelli (Parma/Itália)
<i>Hansenula</i> sp	Stumm-1034	K ₁
<i>Pichia</i> sp	Stumm-1035	K ₂
<i>Hansenula anomala</i>	Um-Milano	K ₃
<i>Hansenula anomala</i>	CBS-5759	K ₄
<i>Hansenula anomala</i>	Ahearn-UN866	K ₅
<i>Hansenula californica</i>	Ahearn-WC40	K ₆
<i>Hansenula canadensis</i>	Ahearn-WC41	K ₇
<i>Hansenula dimennae</i>	Ahearn-WC44	K ₈
<i>Hansenula mrakii</i>	Ahearn-WC51	K ₉

RPMI-MOPS (NCCLS, 1997)

RPMI 1640 (com glutamina e sem bicarbonato de sódio) (Sigma)..... 10,5g

MOPS (ácido 2-[N-morfolino]-propanossulfônico) (Sigma)..... 34,5g

Cloranfenicol (Farmitalia/Carlo Erba)..... 0,5g

Água destilada q.s.p..... 1000,0g

Dissolver os componentes em água destilada. Ajustar o pH final para 7,0 (com solução de hidróxido de sódio 10N). Homogeneizar e esterilizar o meio por filtração (membrana Milipore de 0,22µm). Manter em balão volumétrico de fundo chato de 2L, fechado com algodão hidrófobo, sob refrigeração, até o momento de uso.

Caldo YEPD

Peptona Extrato de levedura (Merck).....	10,0g
Glicose (Sigma).....	20,0g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

107

Os componentes foram misturados e distribuídos em tubos de ensaio de 15x160mm em volumes de 5mL, fechados com tampão de algodão hidrófobo, e a seguir esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, mantidos sob refrigeração, até o momento de uso.

Tampão fosfato de potássio 50nM

Dihidrogenofosfato de potássio (Reagen).....	0,29g
Monohidrogenofosfato de potássio (Reagen).....	0,46g
Água destilada q.s.p.....	100,0mL

pH = 7,5 acertado com NaOH ou HCl 1N e correção das concentrações das substâncias em uso em 0,002g.

A solução foi autoclavada em erlenmeyer de 250mL, fechado com tampão de algodão hidrófobo, a 121°C por 15 minutos e estocada em geladeira.

EDTA 500mM (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

Ácido sódio etilenodiamino tetra-acético (Na ₂ EDTA) (Merck).....	186,1g
Hidróxido de sódio (Reagen).....	20,0g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

pH = 8,0 acertado com NaOH 1N

O EDTA foi dissolvido, por agitação, em balão volumétrico de 2L, em 700mL de água destilada, mantido em agitador mecânico e acertando-se o pH. O volume é completado para 1L. A solução foi autoclavada a 121°C durante 15 minutos e estocada à temperatura ambiente.

Solução de lise

EDTA 500mM.....	10,0mL
Duodecil sulfato de sódio (Sigma) 10%	2,0mL

O meio foi feito, no momento de uso, em erlenmeyer de 250mL esterilizado.

Acetato de potássio 5M

Acetato de potássio (Merck).....	49,07g
Água destilada q.s.p.....	100,0mL

108

O meio foi feito e mantido em erlenmeyer de 250mL esterilizado, fechado com tampão de algodão hidrófobo à temperatura ambiente

Tris-EDTA (TE)

Tris-base (Sigma).....	0,12g
EDTA 500mM.....	0,2mL
Água destilada q.s.p.....	100,0mL

pH = 7,5 acertado com HCl 1N

O meio foi autoclavado a 121°C por 15 minutos em erlenmeyer de 250mL, fechado com tampão de algodão hidrófobo e mantido a temperatura ambiente.

Tampão TE

Trizma base (Gilbco BRL).....	54,0g
EDTA 500mM pH 8,0.....	10,0mL
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

Após dissolução do trizma base em água destilada no agitador mecânico, o EDTA foi adicionado. A solução foi autoclavada em balão volumétrico de fundo chato de 2L, durante 15 minutos e estocada à temperatura ambiente.

Tris-HCL 1M pH 7,4

Trizma base (Gilbo BRL).....	121,1g
Água destilada q.s.p.....	1000,0mL

O trizma base foi dissolvido em 500mL de água destilada, no agitador magnético, em balão volumétrico de 2L, fechado com tampão de algodão hidrófobo. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e o pH foi ajustado para 7,4, adicionando-se HCl. O volume foi completado para 1L, esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 minutos e estocado à temperatura ambiente.

Tampão TEB 5X

Ácido bórico (Sigma).....	27,5g
Trizma base (Gibco BRL).....	54,0g
EDTA 500mM pH 8,4.....	10,0mL

109

Água destilada q.s.p..... 1000,0mL

O ácido bórico e o trizma base foram dissolvidos em água destilada, no agitador magnético, e o EDTA foi adicionado. A solução foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos, em balão volumétrico de fundo chato de 2L, fechado com tampão de algodão hidrófobo e mantida à temperatura ambiente.

TENTS

Tris HCl 10mM, pH 7,5.....	2,0mL de Tris HCl
EDTA 1mM, pH 8,0.....	200,0µL de EDTA
Cloreto de sódio 0,2M (Reagen).....	11,6g
Triton (BioAgency).....	2,0g
Dodecil sulfato de sódio (Pharmacia).....	1,0g

O meio foi adicionado a um elermeyer de 250mL, fechado com um tampão de algodão hidrófobo, esterilizado a 121°C por 15 minutos e conservado sob refrigeração, sendo os dois primeiros elementos desse meio utilizados na concentração de 0,5M.

Solução de brometo de etídio 10mg/mL

Brometo de etídio (Pharmacia).....	0,2g
Água destilada e autoclavada q.s.p.....	19,8mL

O brometo de etídio foi dissolvido em água destilada e autoclavada em um balão de 250mL esterilizado e estocado à temperatura ambiente em frasco escuro asséptico.

