



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ANDRESSA BOZZA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Candida
albicans* ISOLADOS DE CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA
SEVERA**

ANDRESSA BOZZA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE
FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Candida
albicans* ISOLADOS DE CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA
SEVERA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Odontologia, Mestrado em Odontologia, da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B793i Bozza, Andressa.
Identificação molecular e avaliação de fatores de virulência de amostras de *Candida albicans* isolados de cárie precoce da infância severa / Andressa Bozza. – Londrina, 2014.
46 f.: il.

Orientador: Ricardo Sérgio Couto de Almeida.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Cáries dentárias em crianças – Teses. 2. *Candida albicans* – Teses. 3. Proteinase – Teses. 4. Polissacarídeos – Teses. I. Almeida, Ricardo Sérgio Couto de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-053.2

ANDRESSA BOZZA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE FATORES DE
VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE
CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA SEVERA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Odontologia, Mestrado em Odontologia, da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Cássia Cilene Dezan Garbelini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Cristiane Duque
Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Londrina, 28 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, que foram os principais incentivadores para a realização deste curso.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria Salete, que me fez acreditar ser possível, e fez do seu sonho o meu sonho.

Ao meu pai, Sandoval, que sempre me apoiou independente das minhas decisões.

Aos meus irmãos, Alex e Alessandra, que sempre cuidaram de mim e por todo o incentivo a irmãzinha.

Ao meu namorado, Fernando, por ter suportado a distância, e por todo o amor que sempre teve comigo.

Aos professores do Mestrado, Prof. Cássia Garbelini, Edwin Contreras, Fábio Ito, Hedelson Borges, Márcio Hoepfner, Solange Ramos e Wilson Trevisan, pela paciência e pelo aprimoramento do conhecimento a partir de experiências compartilhadas.

Aos amigos do Mestrado, Daniel Poletto, Fernanda Sanches, Karen Archangelo, Kelly Ainda, Lígia Sturion, Simone Valenga e Sônia Gomes, pela amizade construída, a qual levarei para sempre.

Aos colaboradores do projeto, Loana Oliveira, Gabriel Marcondes, Alexandre Morey, que sem eles não seria possível a concretização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela convivência harmônica, e por qualquer ajuda que de alguma forma contribuiu para o trabalho.

Aos pacientes da pesquisa e responsáveis legais, pela contribuição com a realização do projeto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida, pela paciência e por todo ensinamento a mim dado, fazendo com que eu mudasse a minha concepção sobre a microbiologia, agregando mais valor a tal.

À CAPES, pelo apoio financeiro, que foi fundamental para o andamento do projeto.

BOZZA, Andressa. **Identificação molecular e avaliação de fatores de virulência de amostras de *Candida albicans* isoladas de cárie precoce da infância severa.** 2014. 46 f. Trabalho de Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A cárie precoce da infância severa (CPI-S) é uma manifestação rápida, aguda e progressiva da cárie dentária que afeta crianças na dentição decídua, afetando inicialmente os incisivos superiores. Sua etiologia está relacionada com o consumo noturno de carboidratos sem a devida higienização dos dentes, antes de dormir. Devido a relatos na literatura de que a alta prevalência da levedura *Candida albicans* foi detectada nessa forma de cárie, o objetivo deste estudo foi investigar sua presença no biofilme e tecido cariado de crianças com CPI-S, em comparação com crianças livres de cárie (LC) e cárie-ativos (CA). Além disso, foi avaliada a capacidade de produzir polissacarídeos, característica diretamente relacionada com a adesão e formação de biofilme dental e a atividade proteolítica de cepas de *C. albicans* isoladas do tecido cariado de crianças CA e CPI-S. Os resultados mostraram prevalência de 100% de *C. albicans* na dentina cariada de crianças CPI-S e 66,7% em crianças CA. Adicionalmente, cepas de *C. albicans* produziram similar quantidade de polissacarídeos em comparação com cepa padrão comprovadamente virulenta e maior quantidade que *C. albicans* isoladas de crianças CA ($p < 0,05$). Considerando a atividade proteolítica, os isolados CPI-S apresentaram resultados estatisticamente superiores comparados aos isolados CA e cepa padrão de *C. albicans*. Conclui-se que a presença de *C. albicans* poderia contribuir para a progressão e severidade da cárie precoce da infância severa.

Palavras-chave: *Candida albicans*. cárie precoce da infância severa. Proteases. polissacarídeos.

BOZZA, Andressa. **Molecular identification and evaluation of virulence of samples of *Candida albicans* isolated from severe early childhood caries factors**. 2014. 46 p. Trabalho de Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Early childhood caries severe (CPI - S) is a rampant, acute and progressive manifestation of that tooth decay affects children in the primary dentition, initially affecting maxillary incisors. Its etiology is related to nocturnal carbohydrate intake without proper cleaning of teeth before bed. Due to reports of the high prevalence of the yeast *Candida albicans* was detected in this form of decay, the aim of this study was to investigate its presence in biofilms and caries in children with CPI-S, compared with caries-free children (LC) and caries-active (CA). Furthermore, we evaluated the ability to produce polysaccharides, characteristic directly related to adhesion and biofilm formation and proteolytic activity of strains of *C. albicans* isolated from decayed tissue of CA and CPI-S children. The results showed a prevalence of 100% of *C. albicans* in carious dentine children CPI- S and 66.7 % in children CA. Additionally, the *C. albicans* strains produced similar amounts of polysaccharide compared to standard strain demonstrated higher amount virulent and *C. albicans* isolated CA children ($p < 0.05$). Whereas that proteolytic activity, the isolated CPI-S had statistically superior outcomes compared to isolated CA and standard strain of *C. albicans*. We conclude that the presence of *C. albicans* could contribute to the progression and severity of early childhood caries severe.

Key words: *Candida albicans*. Severe early childhood caries. Proteases. Polysaccharides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da sn-PCR a partir de DNA genômico de *C. albicans* (1), *C. parapsilosis* (2), *C. tropicalis* (3), e *C. glabrata* (4) [Oliveira NC et al., 2006].....16
- Figura 2 -** Quantificação de polissacarídeos da parede celular. A cepa padrão SC5314 foi utilizada como controle. (*) difere estatisticamente do controle (SC5314) com $p < 0,05$. (&) difere estatisticamente do Grupo CPI-S com $p < 0,001$ 22
- Figura 3 -** Teste de atividade proteolítica, utilizando albumina como única fonte de nitrogênio. A Zona de Degradação (ZD) é a razão entre o diâmetro do halo de degradação proteica (linha branca) e o diâmetro da colônia (linha preta). A cepa padrão SC5314 foi utilizada como controle. Abaixo do gráfico seguem figuras representativas de cada grupo. (*) difere estatisticamente do controle (SC5314) com $p < 0,001$. (&) difere estatisticamente do Grupo CA com $p < 0,001$23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para reações de amplificação em cadeia pela polimerase	17
Tabela 2 -	Análise descritiva dos grupos, avaliando <i>Candida spp</i>	21
Tabela 3 -	Frequência de <i>C. albicans</i> de acordo com o tipo de cárie e o local da amostragem.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain Heart Infusion
C	<i>albicans</i> - <i>Candida albicans</i>
C	<i>glabrata</i> - <i>Candida glabrata</i>
C	<i>krusei</i> - <i>Candida krusei</i>
C	<i>parapsilosis</i> – <i>Candida parapsilosis</i>
C	<i>tropicalis</i> – <i>Candida tropicalis</i>
CADET	Oligonucleotídeo espécie-específico de <i>C. albicans</i>
CGDET	Oligonucleotídeo espécie-específico de <i>C. glabrata</i>
CPDET	Oligonucleotídeo espécie-específico de <i>C. parapsilosis</i>
CPI	Cárie precoce da infância
CPI-S	Cárie precoce da infância severa
CTDET	Oligonucleotídeo espécie-específico de <i>C. tropicalis</i>
CTSF	Oligonucleotídeo direto universal
CTSR	Oligonucleotídeo reverso
Grupo CPI	grupo cárie precoce da infância
Grupo CPI-S	grupo cárie precoce da infância severa
Min	Minuto
mL	mililitro
pb	Pares de Base
PBS	tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
rDNA	DNA ribossomo
Rpm	Rotações por minuto
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococos mutans</i>
U/L	unidade por litro
YPD	Yeast, Peptone, Dextrose
ZD	Zona de degradação
µl	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
MATERIAIS E MÉTODOS	14
<i>AMOSTRAGEM</i>	14
<i>COLETA DE BIOFILME E TECIDO CARIOSO</i>	14
<i>ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS</i>	15
<i>SEMINESTED PCR (SN-PCR)</i>	15
<i>AMPLIFICAÇÃO DO GENE CHS1 (QUITINA SINTETASE) (CHS1-PCR)</i>	16
<i>ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE</i>	18
<i>QUANTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR</i>	18
<i>AValiação DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA</i>	19
<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	19
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	24
REFERÊNCIAS	27
APÊNDICES	32
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	33
APÊNDICE B – Histórico da criança	35
APÊNDICE C – Exemplificação quantificação dos polissacarídeos da parede celular	36
ANEXOS	37
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos	38
ANEXO B – Normas do período “Caries Research”	39

Artigo formatado nas normas do periódico Caries Research

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS DE *Candida albicans* ISOLADAS DE CÁRIE PRECOCE DA INFÂNCIA SEVERA

Andressa Bozza¹, Loana Paula de Oliveira¹, Alexandre Tadashi Morey¹, Kelly Limi Aida², Lucy Megumi Yamauchi Lioni¹, Sueli Fumie Yamada Ogatta¹, Cássia Cilene Dezan Garbelini³, Solange de Paula Ramos², Luciano Aparecido Panagio¹, Ricardo Sergio Couto de Almeida¹

¹ Departamento de Microbiologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina.

² Departamento de Histologia – Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina.

³ Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Estadual de Londrina.

Endereço para correspondência:

Andressa Bozza

Rua Sérgio D´jalma de Holanda, 1190, CEP: 85802-230

E-mail: andressabozza1@gmail.com

INTRODUÇÃO

A cárie precoce da infância severa (CPI-S) é um indicativo de qualquer sinal de superfície lisa cariada antes dos 36 meses de idade, com ou sem cavidade [AAPD]. Também é considerada CPI-S se, dos 3 aos 5 anos de idade, a criança apresenta mais de quatro, cinco e seis superfícies afetadas em dentes anteriores decíduos aos 3, 4 e 5 anos, respectivamente [Drury et al., 1999; AAPD, 2011/A]. A CPI-S substituiu o termo anteriormente conhecido como “cárie de mamadeira” [Tinanoff, 1998]. No Brasil, respectivamente, 26,85% e 53,4% das crianças de 18 a 36 meses [SB Brasil, 2004] e 5 anos [SB-Brasil, 2010] tem ao menos 1 lesão cariada.

A CPI-S possui características próprias e é reconhecida pela sua agressividade [AAPD, 2011/B]. Sua natureza é rampante, aguda e progressiva, envolve inicialmente os incisivos superiores e afeta os dentes sequencialmente à medida que começam a erupcionar [Bercowitz, 2003; Poureslami e Amerongen, 2009; Ng e Chase, 2013]. Seu desenvolvimento está relacionado com o consumo noturno de carboidratos líquidos, por meio de amamentação natural ou artificial Além disso, a ausência ou insuficiência da escovação noturna (acúmulo de biofilme dental) e a diminuição da secreção salivar durante o sono aceleram a atividade cariogênica dos ácidos derivados do metabolismo dos carboidratos [Holley et al., 2012; Krzyściak et al., 2013].

As consequências da CPI-S são graves e incluem dificuldades de mastigação, má oclusão, impacto negativo na qualidade de vida da criança e seus pais/cuidadores [Ramos-Jorge et al., 2013], dor, absenteísmo e baixo desempenho escolar [Jackson et al., 2011]. O custo estimado de seu tratamento por criança é de U\$ 2009,00 [Kanellis, Damiano, Monamy, 2000]. Os relatos sobre a prevalência de CPI-S no Brasil indicam um média de 33% [Ribeiro et al., 2005].

Os microrganismos acidúricos e acidogênicos estão associados com o processo patogênico da cárie dentária, sendo a bactéria *Streptococcus mutans* considerada seu principal agente etiológico [Ng e Chase, 2013]. No início da progressão da doença, lactobacilos também estão associados com a doença [Badet & Thebaud, 2008], os quais são ótimos produtores de ácido láctico e possuem uma excelente tolerância a ambientes ácidos [Klinke et al., 2009]. Além destas bactérias, outros microrganismos já foram isolados de lesões cariosas, como por exemplo

fungos do gênero *Candida* [Chagas et al., 2009; Carvalho et al., 2006]. Dentre as espécies, *Candida albicans* é o patógeno oportunista mais comum entre os seres humanos e existe uma relação entre este fungo com o biofilme e a cárie dentária [Klinke et al., 2011]. Há evidência de sua associação com a experiência de cárie em crianças [Beighton et al., 2004], adolescentes [Gabris et al., 1999] e adultos jovens [Moalic et al., 2001].

C. albicans apresenta características relacionadas à cariogenicidade similares a *S. mutans*, tais como a capacidade de sintetizar matriz polissacarídica extracelular, além de produzir e tolerar ambientes ácidos [Kreulen et al., 1997, Koga-Ito et al., 2003, Odds, 1988]. Cravalho et al. (2006), encontraram que *S. mutans* e *C. albicans* foram os microrganismos altamente prevalentes na dentina cariada de crianças com CPI. No entanto, a frequência de *C. albicans* foi destacadamente maior quando comparada aos grupos livres de cárie e cárie-ativos [Carvalho et al., 2006].

No entanto, ainda não se sabe se *C. albicans* é um verdadeiro patógeno envolvido no processo cariioso [Carvalho et al., 2006]. Se este fungo está realmente relacionado com o desenvolvimento do processo cariioso, cepas isoladas de lesões de CPI-S poderiam ter uma maior expressão de fatores envolvidos na patogenia da cárie quando comparadas a uma cepa padrão e a cepas provenientes de crianças cárie-ativas. Os objetivos deste estudo foram detectar, por biologia molecular, cepas de *C. albicans* de amostras de biofilme e dentina cariada de crianças com CPI-S, livres de cárie (LC) e cárie-ativos (CA) e comparar a capacidade de produção de polissacarídeos e de degradação proteica entre as cepas. Baseando-se na hipótese de que *C. albicans* seria um agente etiológico da cárie precoce da infância severa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (parecer 10247) (anexo1). Plataforma Brasil, CAAE: 01543012.0.0000.5231. Os responsáveis legais pelas crianças avaliadas neste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice A), autorizando o exame clínico e a coleta das amostras biológicas.

Amostra

A amostra envolveu crianças selecionadas aleatoriamente, com idade entre 1 a 5 anos, de ambos os gêneros. As coletas foram realizadas na Clínica de Bebês da Universidade Estadual de Londrina e na Unidade Básica de Saúde – Itapoã. Os participantes do estudo foram divididos em 3 grupos de acordo com as características abaixo relacionadas:

1. Grupo Cárie-Ativos (CA) (n=18): apresentavam pelo menos um dente/face com lesão cariada não tratada (cavitada).
2. Grupo Cárie Precoce da Infância Severa (CPI-S) (n=11): apresentavam uma ou mais superfícies lisas, nos incisivos superiores, com cavitação não tratada, restauração ou, ainda, perda do elemento dentário [Drury et al., 1999].
3. Grupo Livres de Cárie (LC) (n=20): não apresentavam cárie dentária.

Coleta de Biofilme e Tecido Cariado

O biofilme dental do dente 51 de crianças livres de cáries e da superfície de dentes cariados foi utilizado como controle na avaliação dos microrganismos (*Candida* spp.) presentes no tecido cariado. Nos grupos CA e CPI-S foram coletados fragmentos de dentina cariada (com o uso de colheres de dentina estéril) e biofilme dental (por meio de palito de dente estéril) adjacente à lesão cariada de onde se obteve amostras [Carvalho et al., 2006]. As amostras de dentina cariada foram coletadas no centro da lesão do dente mais destruído pela CPI-S, priorizando incisivos centrais superiores. Já para o CA priorizou-se o dente mais destruído pela lesão cariada, também coletando no centro da lesão.

O material coletado foi introduzido em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL contendo 1,0 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) para manter a amostra viva até ser levado ao laboratório para cultivo. Apenas o tubo utilizado para coleta de fragmentos de tecido cariado continha três pérolas de vidro (4,5 mm de diâmetro).

Isolamento e Identificação dos Microrganismos

Os tubos com fragmentos de tecido cariado e biofilme foram agitados por 30 segundos para ocorrer ruptura do tecido antes dos procedimentos de cultivo. Uma alíquota de 0,1 mL da amostra foi removida de cada tubo e plaqueada em meio de cultura sólido setelivo - CHROMagar *Candida* (Difco) para isolamento de espécies de *Candida*.

Segundo o fabricante, o meio CHROMagar *Candida* identifica até 5 espécies diferentes de acordo com a cor da colônia. Assim, colônias de *C. albicans* são verdes; de *C. tropicalis* são azuis; de *C. parapsilosis* são roxas; de *C. krusei* são rosas com bordas irregulares; e de *C. glabrata* são rosas com halo claro e bordas regulares.

Após plaqueamento as placas de CHROMagar foram incubadas a 37°C em aerobiose por 48 horas. Uma colônia de cada amostra foi cultivada overnight em 10mL de caldo YPD, posteriormente em um tubo para microcentrifugas adicionamos 500µl da cultura overnight mais 500µl de glicerol 80% e as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

Seminested PCR (snPCR)

A identificação molecular das leveduras por PCR foi realizada como descrito por Ahmad et al. [2002] e Milde et al. [2000]. Para a identificação dos isolados de *Candida* spp. foram utilizados os seguintes iniciadores: oligonucleotídeo direto universal, CTSF, oligonucleotídeo reverso CTSR, capazes de amplificar o final da extremidade 3' do DNA ribossomal (rDNA) 5.8 S e a extremidade 5' inicial do rDNA 28 S e a região espaçadora interna. Para realização do segundo ciclo de amplificação foram utilizados oligonucleotídeos espécie-específicos que derivam da região ITS2 de *C. albicans* (CADET), *C. parapsilosis* (CPDET), *C. tropicalis* (CTDET) e *C. glabrata* (CGDET), (Tabela 1) [Ahmad et al., 2002], *C. dubliniensis* (DUBR, DUBS) (Tabela 1) [Donnelly et al., 1999].

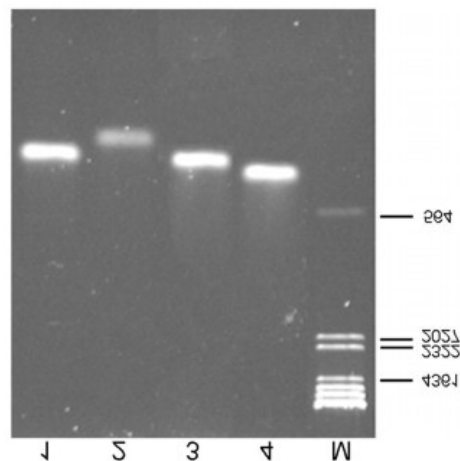


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação da sn-PCR a partir de DNA genômico de *C. albicans* (1), *C. parapsilosis* (2), *C. tropicalis* (3), e *C. glabrata* (4) [Oliveira NC et al., 2006].

Amplificação do Gene CHS1 (quitina sintetase) (CHS1 – PCR)

Durante a realização da técnica de semi-nested PCR, duas amostras identificadas como *C. glabrata* produziram resultados duvidosos. Assim, para confirmar os resultados, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores complementares a uma sequência do gene que codifica quitina sintetase, denominados GLAB 1 e GLAB2 (Tabela 1) descrito por Milde et al. [2000].

Tabela 1 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para reações de amplificação em cadeia pela polimerase.

Oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	Referência
CTSF	TCGCATCGAT GAAGAACGCAGC	Ahmad et al., 2002
CTSR	TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC	Ahmad et al., 2002
CADET	ATTGCTTGCGGCGGTAACGTCC	Ahmad et al., 2002
CPDET	TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC	Ahmad et al., 2002
CGDET	TAGGTTTTACCAAC TCGGTGTT	Ahmad et al., 2002
CTDET	ATTTTGCTAGTGGCC	Ahmad et al., 2002
GLAB 1	GTGCAGATATGTCGCTATTACCTTTGG	Milde et al., 2000
GLAB 2	CGACTGGTTGACGATAATCAGAGGAGATGGG	Milde et al., 2000
DUBF	GTATTTGTCGTTCCCCTTTC	Donnelly et al., 1999
DUBR	GTGTTGTGTGCACTAACGTC	Donnelly et al., 1999

Amplificação do DNA

A reação de amplificação de DNA foi realizada em tubos de 0,2 mL, com volume total de 20 µL contendo 1X de diluição tampão para PCR (200 mM Tris HCl pH 8,4, 500 mM KCl, MgCl 2 mM), 1 U Taq DNA polimerase, 5 pmol dos iniciadores, 1 µL do DNA extraído da cultura (cerca de 10 ng), 0,1 mM desoxirribonucleotídeos trifosfatos.

No primeiro ciclo de amplificação do snPCR foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais CTSF e CTSR nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94°C seguidos de 30 ciclos a 94°C por 1 min, hibridação a

60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 min e finalmente um ciclo a 72°C por 10 min.

Após o primeiro ciclo de amplificação, 1 µL do produto (cerca de 10 ng) foi utilizado como substrato para o segundo ciclo de amplificação utilizando a combinação do iniciador reverso universal (CTSR) e um oligonucleotídeo espécie-específico. A reação de amplificação foi realizada nas mesmas condições anteriores.

Para *CHS1*-PCR foram utilizadas as seguintes condições: 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, hibridação a 60°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos.

Eletroforese em Gel de Agarose

A migração eletroforética do DNA em géis de agarose foi realizada em sistema de gel submerso em tampão TBE (89 mM Tris base; 89 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA; pH 8,3). O gel, em diferentes concentrações (0,8 a 2,5%) foi preparado em TBE. As amostras e um padrão de peso molecular (100 pb Ladder - Invitrogen) foram aplicados em tampão de amostra para DNA 1X (Ficoll 400 2,5%; Azul de bromofenol 0,025%; Xileno cianol FF 0,025%). O sistema foi submetido a uma diferença de potencial (70 a 100V) com amperagem constante. As moléculas de DNA foram visualizadas após coloração do gel com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 30 minutos e observação em comprimento de onda ultravioleta (260 nm).

Quantificação de Polissacarídeos da Parede Celular

A quantificação de polissacarídeos da parede celular dos isolados foi feita pelo método de Ligação de Alcian Blue [Mora-Monte et al., 2007]. Assim, todas as cepas foram cultivadas overnight em 10 mL de caldo YPD (2% de glicose, 1% de peptona de caseína e 1% de extrato de levedura), posteriormente foram centrifugadas por cinco minutos a 4.000 rpm e ressuspensas em salina tamponada com fosfato (PBS), 1,0 mL deste conteúdo foi introduzido em tubo para microcentrífugas de 1,5 mL. Em um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60s, UV-Visible Spectrophotometer), foi medida a absorbância das amostras, e as mesmas foram ressuspensas até atingirem a densidade óptica de 0,2. Após, foram centrifugadas por três minutos a 12.000 rpm, descartando o sobrenadante e ressuspendendo em 1,0 mL do tampão de Alcian Blue. Após incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm

por 3 minutos formação do pellet. Os açúcares da parede celular do fungo ligam-se ao Alcian Blue, diminuindo no sobrenadante a quantidade adicionada inicialmente na suspensão (30 µg). Após a leitura do sobrenadante em Leitor de ELISA (BIOTEK – Synergy HT) a 620 nm, a quantidade de Alcian Blue foi calculada por uma curva padrão e subtraída da quantidade adicionada na suspensão (30 µg). Deste modo, a quantidade de polissacarídeos da parede celular fúngica foi calculada pela razão entre a quantidade de Alcian Blue retida no pellet (em µg) e a densidade ótica das leveduras contidas na reação (DO) (apêndice C). Os testes foram repetidos três vezes.

Avaliação da Atividade Proteolítica

Todos os procedimentos foram feitos de acordo com Price et al. [1982] com algumas modificações. Assim, para os testes de produção de proteases, utilizamos como controle positivo a cepa padrão SC5314 gentilmente doada pelo Dr. Bernhard Hube (Jena, Alemanha). Esta cepa foi utilizada para o sequenciamento do genoma de *C. albicans* e é amplamente utilizada na literatura como controle positivo dos experimentos por ser considerada muito virulenta [Almeida et al., 2008; Gillum et al., 1984]. Todos os isolados obtidos foram cultivados overnight em 10 mL de caldo YPD, posteriormente foram centrifugados por cinco minutos a 4.000 rpm, e descartado o sobrenadante. A lavagem foi feita com salina PBS, ressuspendendo o pellet. Esse procedimento de centrifugação foi repetido três vezes. Após foi realizado a contagem das leveduras em uma câmara de Neubauer, e montada uma suspensão de 2×10^8 . Utilizamos uma placa de 6 poços, onde cada poço continha 5 mL de meio YNB sólido (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate - Difco) com albumina (2,0 g/L, Initial Fractionation by Heat Shock - SIGMA) como única fonte de nitrogênio, e na superfície de cada poço 10^6 leveduras de cada cepa foram depositadas (gota de 10 µL). A zona de degradação (ZD) foi avaliada após incubação a 37°C por 7 dias. DZ é a razão entre o diâmetro do halo de digestão e o diâmetro da colônia. Os testes foram repetidos 3 vezes e realizados em duplicata.

Análise Estatística

Foi realizada a análise descritiva das espécies de *Candida*, de acordo com cada grupo. Para verificar as associações analisadas no levantamento dos micro-

organismos e tipos de cárie foi utilizado o teste Exato de Fischer ou Qui Quadrado, no software estatístico SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), em nível de significância de 5%. Para comparação das médias da atividade proteolítica e quantificação de polissacarídeos da parede celular foi utilizado o teste t de Student, no software Excel (Office 2010, Microsoft). Os variados níveis de significância obtidos estão indicados nas legendas dos respectivos resultados.

RESULTADOS

Todos os isolados identificados como *C. albicans* e *C. tropicalis* no meio seletivo, foram confirmados por sn PCR. Dois isolados de *C. glabrata* e um de *C. parapsilosis* foram confirmados dentro do gênero *Candida*, mas não puderam ser identificados pelos primers utilizados nesse estudo e por isso foram classificados como *Candida* sp.

Não foi constatada a presença de *Candida* spp. no biofilme dos indivíduos livres de cárie, enquanto que em CPI-S e CA constatou-se que, respectivamente, 18,2% e 11,1% das amostras coletadas continham *C. albicans*. Foi verificada a ocorrência de *C. albicans* em todas as amostras de dentina de CPI-S e em 66,7% das de CA. Em 2 indivíduos de CA constatou-se a coexistência de *C. albicans* com espécies não-*albicans* (1 *Candida* sp. e 1 *C. tropicalis*) na dentina. Em CPI-S, 3 indivíduos apresentaram a mesma condição: no primeiro ocorreu o isolamento de 3 espécies (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *Candida* sp.) no mesmo tecido carioso, no segundo constatou-se a coexistência com *C. Tropicalis*, e no terceiro com *Candida* sp., respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise descritiva dos grupos, avaliando *Candida* spp.

Tipo de microrganismo	LC		CPI-S		CA	
	Biofilme n (%)	Dentina n (%)	Biofilme n (%)	Dentina n (%)	Biofilme n (%)	Dentina n (%)
<i>C. albicans</i>	0 (0,0)	-	2 (18,2)	11 (100,0)	2 (11,1)	12 (66,7)
Não-<i>albicans</i>*	0 (0,0)	-	0 (-.-)	3 (-.-)	1 (-.-)	2 (-.-)
<i>Candida</i> spp. ausente	0 (0,0)	-	9 (81,8)	0 (0,0)	16 (88,9)	6 (33,3)

(-) não foi avaliado em dentina. (*) todas as espécies não-*albicans* foram co-isoladas com *C. albicans*. Portanto, a porcentagem está ausente neste grupo.

Foi constatada associação estatisticamente significativa entre a presença de *C. albicans* e CPI-S, em dentina ($p < 0,05$). No biofilme não foram constatadas associações (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de *C. albicans* de acordo com o tipo de cárie.

<i>C. albicans</i>	Biofilme			Dentina*	
	LC n (%)	CPI-S n (%)	CA n (%)	CPI-S n (%)	CA n (%)
Não	20 (100,0)	9 (81,8)	16 (88,9)	0 (0,0)	6 (33,3)
Sim	0 (0,0)	2 (18,2)	2 (11,1)	11 (100,0)	12 (66,7)

(*Teste Exato de Fischer; $p < 0,05$)

Como demonstrado na Figura 2, *C. albicans* proveniente de CPI-S/dentina possui a quantidade de polissacarídeos da parede celular que uma cepa padrão virulenta (SC5314). Entretanto, isolados de CA apresentaram significativamente menos carboidratos que os outros isolados avaliados aqui (Figura 2).

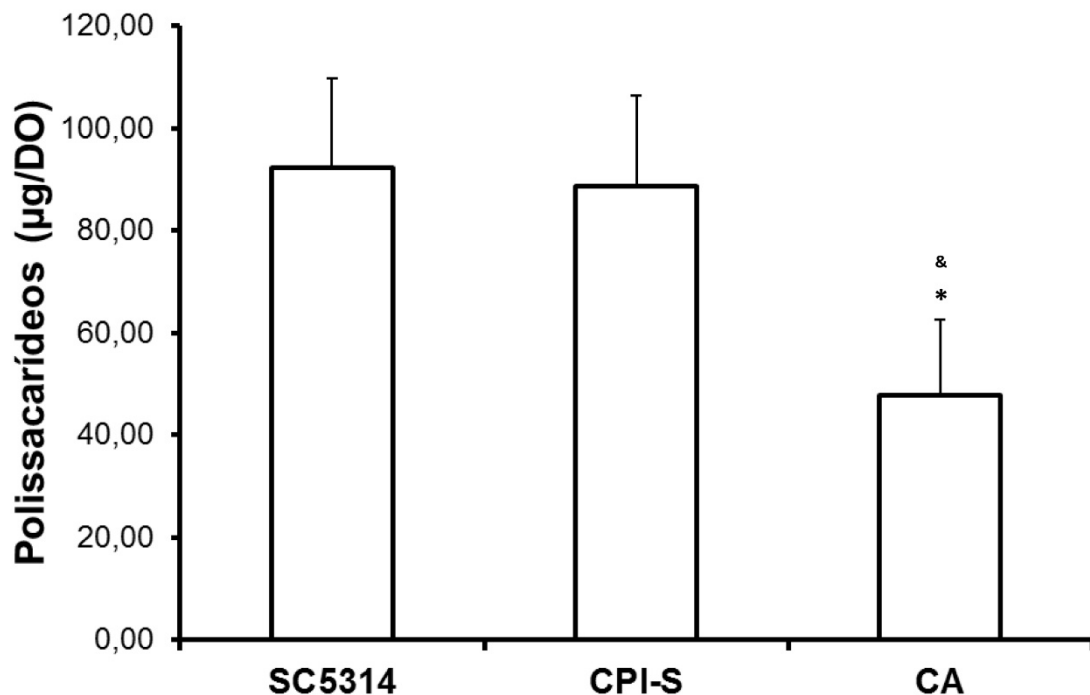


Figura 2 - Quantificação de polissacarídeos da parede celular. A cepa padrão SC5314 foi utilizada como controle. (*) difere estatisticamente do controle (SC5314) com $p < 0,05$. (&) difere estatisticamente de CPI-S com $p < 0,001$.

Em relação a atividade proteolítica, os isolados provenientes da dentina de CPI-S apresentaram valores significativamente maiores da zona de degradação em comparação com aqueles do CA e da cepa padrão ($p < 0,05$), uma cepa boa

produtora de aspartil proteases (SC5314) [Price et al., 1982]. Em contraste, cepas provenientes do grupo cárie-ativos apresentaram uma atividade proteolítica inferior quando comparadas a cepa padrão e a cepas do grupo CPI-S (Figura 3).

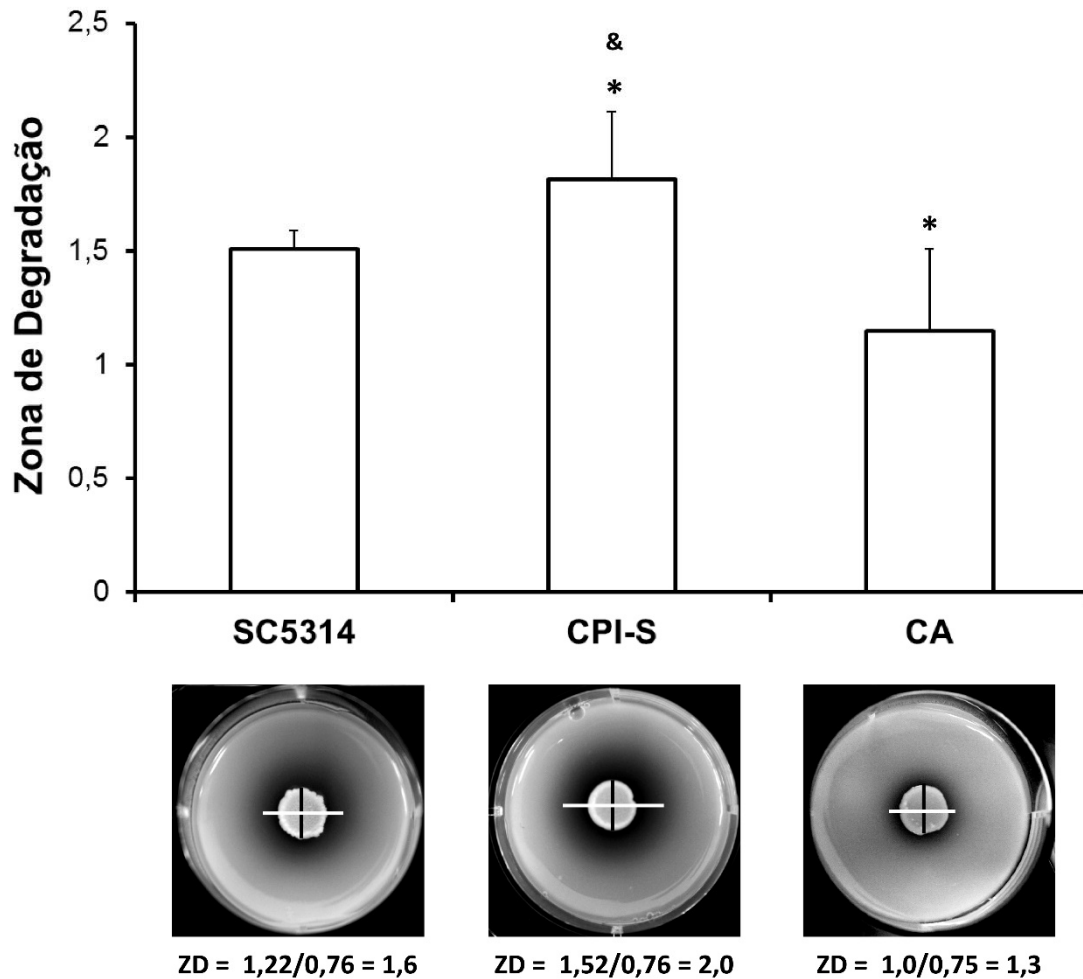


Figura 3 - Teste de atividade proteolítica, utilizando albumina como única fonte de nitrogênio. A Zona de Degradação (ZD) é a razão entre o diâmetro do halo de degradação proteica (linha branca) e o diâmetro da colônia (linha preta). A cepa padrão SC5314 foi utilizada como controle. Abaixo do gráfico seguem figuras representativas de cada grupo. (*) difere estatisticamente do controle (SC5314) com $p < 0,001$. (&) difere estatisticamente do Grupo CA com $p < 0,001$.

DISCUSSÃO

Candida spp. são capazes de colonizar várias superfícies da cavidade oral, incluindo a língua, o palato, superfícies dentárias, além da saliva [Signoretto et al., 2009]. A presença de lesões de cárie em dentina pode promover a colonização e a proliferação de espécies de *Candida* [Chagas et al., 2009]. Uma das espécies mais comuns, *C. albicans* possui versatilidade como patógeno, tendo a capacidade para sobreviver como um comensal em vários sítios distintos [Calderoni et al., 2001] e um de seus locais preferidos em indivíduos saudáveis é a cavidade oral [Klinke et al., 2011].

Embora a maioria dos estudos sobre a etiologia da cárie dentária investiguem o papel desempenhado por bactérias no desenvolvimento da doença, a levedura *C. albicans* já foi relacionada com o desenvolvimento desta doença em modelos animais [Klinke et al., 2011]. Esta levedura tem sido mostrada como frequentemente relacionada a experiência de lesões de cárie, especialmente a CPI; Klinke et al. [2014] observaram uma elevada prevalência de *C. albicans* (97%) nas cavidades orais de crianças com CPI. Os resultados deste estudo corroboram o descrito por Carvalho et al. [2006], o qual, *C. albicans* foi o microrganismo mais isolado em dentina de crianças com CPI (60,4%). No presente estudo, foi constatada uma associação significativa entre a presença de *C. albicans* e CPI-S; 100% das amostras de dentina cariada de CPI-S apresentavam o fungo, enquanto que em CA 66,7% o apresentavam. Das amostras de biofilme adjacente a cárie, foi possível isolar *C. albicans* em apenas 2 pacientes com CPI (18,2 %) e em 2 pacientes cárie-ativos (11,1%), sugerindo que esse fungo pode estar adaptado especificamente ao processo carioso.

Pode-se relacionar a presença de *C. albicans* com consumo de líquidos contendo carboidratos fermentáveis, devido a maior disponibilidade de fontes destes açúcares neste tipo de cárie. Corroborando este fato, Klinke et al. [2009] demonstraram que a produção abundante de ácidos por *C. albicans in vitro* necessita de uma concentração de glicose 50 vezes maior do que a necessária para *S. mutans* e lactobacilos, sugerindo que a produção de ácidos por este fungo desempenha um papel importante no biofilme dentário quando a disponibilidade de açúcar na boca é alta [Klinke et al., 2009]. Ainda, estes autores demonstraram que

alta concentração de glicose inibe a produção de ácidos por *S. mutans* e lactobacilos, sugerindo que *C. albicans* possa ser o responsável pela maior parte da acidificação do biofilme quando há altas concentrações de glicose na boca.

Deste modo, se esta levedura está relacionada ao desenvolvimento da CPI-S e não à cárie-ativos, esperava-se que cepas isoladas da dentina de lesões de CPI-S poderiam ter uma maior expressão de fatores cariogênicos. Assim, avaliou-se a quantidade de polissacarídeos da parede celular e a atividade proteolítica de todos os isolados obtidos dos tecidos cariosos.

Os principais componentes da parede celular de *C. albicans* são polissacarídeos fibrilares e proteínas [Chaffin, 2008]. Esses carboidratos da superfície celular participam na adesão a células epiteliais, formação de biofilmes, reconhecimento por receptores da imunidade inata e desenvolvimento de patogenicidade [Li et al., 2007; Shibata et al., 2012]. O presente estudo constatou que há uma maior quantidade de polissacarídeos na parede celular de *C. albicans* provenientes de dentina cariada de lesões de CPI-S quando comparada aquelas de lesões cariosas simples. Assim, esses fungos provenientes de lesões CPI-S, por possuírem uma maior capacidade de adesão e formação de biofilmes, estariam mais adaptados ao processo carioso do que as leveduras presentes em outros tipos de cárie.

Além disso, as aspartil proteases podem degradar o colágeno, especialmente do tipo I, que representa mais de 90% da matriz orgânica da dentina [Makihira et al., 2002]. Por isso, estas enzimas poderiam estar relacionadas à degradação de proteínas da matriz dentinária e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do processo carioso. Corroborando esta hipótese, os isolados de dentina de lesões CPI-S apresentaram zona de degradação superior a qualquer outro isolado testado aqui, incluindo uma cepa padrão com alta atividade proteolítica [Price et al., 1982]. Em contraste, cepas provenientes de dentina de lesões de cárie simples apresentaram uma atividade proteolítica inferior quando comparadas a cepa padrão e as cepas de CPI-S.

Apesar da *C. albicans* ser um potente agente etiológico da doença cárie, este microrganismo está em baixa frequência na microbiota oral, porém sua biomassa é muito maior do que o *S. mutans* [Yang et al., 2012], a coassociação entre *S. mutans* e *C. albicans*, faz com que diminua a quantidade das bactérias e eleve a quantidade de leveduras [Klinke et al., 2011]. Tem sido relevante a hipótese de que *C. albicans*

é um patógeno envolvido na progressão da doença cárie, por ela ser capaz de colonizar superfícies dentais e invadir os túbulos dentinários [Signoretto et al., 2009].

Embora 66,7%, seja um valor relativamente alto da prevalência de *C. albicans* na dentina das crianças do grupo cárie simples, esta levedura parece não estar tão preparada para o ambiente cariogênico quanto as originárias de CPI-S. Em CPI-S além de ter-se obtido prevalência de 100% de *C. albicans*, houve maior expressão dos fatores de virulência, sugerindo que esta levedura participa ativamente na progressão deste tipo de cárie.

Portanto, as evidências apresentadas neste estudo sugerem que cepas de *Candida albicans* presentes em lesões cariosas em dentina de crianças com CPI-S podem estar ativamente envolvidas na progressão da doença, por serem capazes de auxiliar na adesão e formação de biofilmes, bem como na degradação proteica, indicando potencial cariogênico nessas cepas. Assim, nossos resultados reforçam a hipótese de que *C. albicans* participa ativamente na formação e desenvolvimento da cárie precoce da infância severa abrindo novos caminhos para investigação desta doença e o desenvolvimento de novos tratamento.

REFERÊNCIAS

AAPD. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Classifications, Consequences, and Preventive Strategies. 2011. http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/P_ECCClassifications.pdf. Acesso em 01/02/2014.

AAPD. American Academy of Pediatric Dentistry. Policy on Early Childhood Caries (ECC): Unique Challenges and Treatment Options. 2011. http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/P_ECCUniqueChallenges.pdf. Acesso em 03/02/2014.

Ahmad, S, Khan, Z, Mustafa SA, Khan UZ: Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection and biochemical methods for species identification. J. Clin. Microbiol. 2002;40:2483-2489.

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

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

Berkowitz RJ: Causes, Treatment and Prevention of Early Childhood Caries: A Microbiologic Perspective. J Can Dent Assoc 2003;69:304–307.

Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003 - Resultados Principais. Brasília, 2004. http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/05_0053_M.pdf. Acesso em 03/02/2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: Resultados Principais. Brasília, 2011.

http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf.
Acesso em 03/02/2014.

Calderone RZ, Fonzi WA: Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology. 2001;9:327-335.

Carvalho FG, Silva DS, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP: Presence of *mutans streptococci* and *Candida* spp. in dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. Archives of Oral Biology 2006;51:1024—1028.

Chaffin WL: *Candida albicans* cell wall proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2008;72:495-544.

Chagas MS, Portela MB, Cerqueira DF, Souza IPR, Soares RM, Castro GF: Reduction of *Candida* species colonization in the oral cavity of children infected with human immunodeficiency virus after dental treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:383-388.

Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC: Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of *ACT7* intron and exon sequences. Microbiology 1999;145:1871-1882.

Drury TF, Horowitz AM, Ismail AI, et al.: Diagnosing and reporting early childhood caries for research purposes. J Public Health Dent 1999;59(3):192-7.

Gabris K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, et al: Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. Caries Research 1999;33(3):191–195.

Hooley M, Skouteris H, Boganin C, Satur J, Kilpatrick N: Parental influence and the development of dental caries in children aged 0–6 years: A systematic review of the literature. Journal of dentistry 2012;40:873-885.

Jackson SL, Vann WF Jr, Kotch JB, Pahel BT, Lee JY: Impact of poor oral health on children's school attendance and performance. *Am J Public Health*. 2011 Oct;101(10):1900-1906.

Kanellis MJ, Damiano PC, Monamy ET: Medicaid costs associated with the hospitalization of young children for restorative dental treatment under general anesthesia. *J Public Health Dent* 2000;60(1):28-32.

Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T: Dental Caries in Rats Associated with *Candida albicans*. *Caries Res* 2011;45:100–106.

Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W: Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res* 2009; 43: 83–91.

Klinke T, Urban M, Lück C, Hannig C, Kuhn M, Krämer N: Changes in *Candida* spp., *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli* following Treatment of Early Childhood Caries: A 1-Year Follow-Up. *Caries Res* 2014;48:24–31.

Koga-Ito CY, Unterkirchera CS, Watanabeb H, Martinsa CAP, V Vidottoe, Jorge AOC: Caries Risk Tests and Salivary Levels of Immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in Mouthbreathing Syndrome Patients. *Caries Res* 2003;37:38–43.

Kreulen CM, De Soet HJ, Hogeveen R, Weerkamp JS: *Streptococcus mutans* in Children Using Nursing Bottles. *J Dent Child* 1997;64:107-111.

Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A: The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013.

Li F, Svarovsky MJ, Karlsson AJ, Wagner JP, Marchillo K, Oshel P, Andes D, Palecek SP: Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell* 2007;6:931-939.

Makihira S, Nikawa H, Tamagami M, Hamada T, Nishimura H, Ishida K, Yamashiro H: Bacterial and *Candida* adhesion to intact and denatured collagen in vitro. *Mycoses* 2002;45:389–392.

Milde K, Kostakaa V, Kaletaa EF, Willems H, Jager C: Multiplex-PCR-based differentiation and characterization of *Candida*-isolates derived from tortoises (Testudinidae). *Vet. Microbiol.* 2000;76:395-402.

Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le-Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Research* 2001;35:149–155.

Mora-Montes HM, Bates S, Netea MG, Díaz-Jiménez DF, López-Romero E, Zinker S, Ponce-Noyola P, Kullberg BJ, Brown AJP, Odds FC, Flores-Carreón A, Gow NAR: Endoplasmic Reticulum α -Glycosidases of *Candida albicans* Are Required for N Glycosylation, Cell Wall Integrity, and Normal Host-Fungus Interaction. *Eukaryotic cell* 2007;6: 2184–2193.

Ng MW, Chase I: Early Childhood Caries Risk-Based Disease Prevention and Management. *Dent Clin N Am* 2013;57:1–16.

Odds FC: *Candida* and Candidiasis. London Bailliere Tindal 1998.

Oliveira ND, Rampazzo RCP, Minari MC, Corrêa PRC, Bizerra FC, Carneiro M, Svidzinsk TIE, Furlaneto L, Yamada-Ogatta SF: Use of a chromogenic médium and semi-nested PCR-based assay to identify *Candida* species. *Semina. Ciências Biológicas e da Saúde* 2006;27:30-34.

Poureslami HR, Amerongen WEV: Early Childhood Caries (ECC) An Infectious Transmissible Oral Disease. *Indian Journal of Pediatrics* 2009;76:191-194.

Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO: Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982;20:7-14.

Ramos-Jorge J, Pordeus IA, Ramos-Jorge ML, Marques LS, Paiva SM: Impact of untreated dental caries on quality of life of preschool children: different stages and activity. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013.

Ribeiro AG, Oliveira AF, Rosenblatt A; Early childhood caries: prevalence and risk factors in 4-year-old preschoolers in João Pessoa, Paraíba, Brasil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 2005;21:1695-1700.

Shibata N, Kobayashi H, Suzuki S: Immunochemistry of pathogenic yeast, *Candida* species, focusing on mannan. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012;88:250-65.

Signoretto C, Burlacchini G, Faccioni F, Zanderigo M, Bozzola N, Canepari P: Support for the role of *Candida* spp. in extensive caries lesions of children. *New microbiologica* 2009;32:101-107.

Tinanoff N. Introduction to the early childhood caries conference: initial description and current understanding. *Community Dent Oral Epidemiol* 1998;26:5–7.

Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou Z: Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Archives oral biology* 2012;10:1048-1053.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

“Caracterização molecular e biológica de fatores que participam na formação de biofilmes bucais e cáries *in vitro*: interações entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo(a) a participar da pesquisa” **Caracterização molecular e biológica de fatores que participam na formação de biofilmes bucais e cáries *in vitro*: interações entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*”**. O objetivo da pesquisa é avaliar a presença de fungos e bactérias na cárie de crianças de 1 a 5 anos e comparar com crianças sem cárie da mesma idade. A sua participação é muito importante e ela se daria através da sua autorização para remoção (de forma indolor) de fragmentos de cárie dos dentes de seu filho(a) ou criança pelo qual o senhor(a) é responsável. Essa remoção se dará por raspagem leve da região do dente que está cariado. Além, coletaremos, com um palito de dentes, a placa dental do mesmo dente para fins de comparação. Para crianças sem cárie, será realizada apenas a coleta de placa dos dentes, utilizando um palito de dentes.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo vocês recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a identidade de seu filho(a) ou criança pelo qual o senhor(a) é responsável.

O material coletado será cultivado em laboratório e os fungos e bactérias (*Candida spp.* e *Streptococcus mutans*) presentes nele serão identificados. Essa identificação será necessária para realizar uma avaliação da presença desses microrganismos na cárie, principalmente em relação ao fungo. Esses resultados servirão de base para pesquisas futuras que estabelecerão qual o verdadeiro papel deste fungo na cárie. Os resultados desta pesquisa serão publicados em uma revista científica para divulgação sem rever a identidade dos participantes.

Os benefícios esperados são: através da comprovação de que um fungo esteja envolvido em algum tipo de cárie, principalmente cáries de mamadeira, poderemos sugerir desenvolver novos métodos de tratamento. Embora a coleta seja um procedimento adicional ao tratamento da criança, ela é um procedimento indolor e de rápida execução.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado pela participação de seu filho(a) ou criança pelo qual o senhor(a) é responsável. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (**Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid – Pr 445 – Km 380, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal, telefone (043) 3371-4975, almeidar@uel.br**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, n60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, 21 de Março de 2012.

Pesquisador responsável

RG: 25.540.555-8

_____ (nome por extenso do pai ou responsável), tem sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em autorizar **voluntariamente** a participação de _____ (nome por extenso da criança na pesquisa descrita acima.

Assinatura do Responsável (ou impressão dactiloscópica)

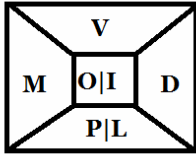
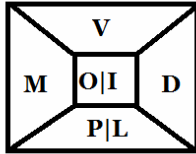
Assinatura do menor (ou impressão dactiloscópica)

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

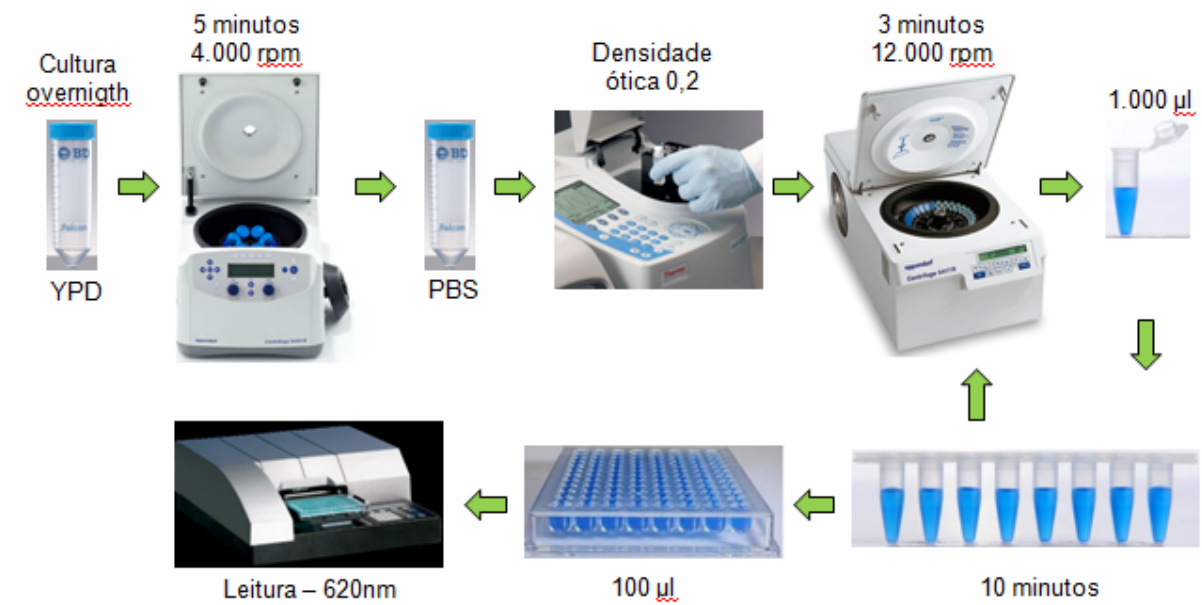
APÊNDICE B

Ficha Clínica

NOME:					
IDADE:		COR		SEXO	
DOENÇA SISTÊMICA		SIM		NÃO	
				QUAL?	
FEZ OU FAZ USO DE ANTIBIÓTICO RECENTEMENTE?		SIM		NÃO	
				SE SIM, HÁ QUANTO TEMPO?	
DENTE		SEM CÁRIE		CÁRIE DE MAMADEIRA	
				CÁRIE GERAL	
EXPERIÊNCIA DE CÁRIE ANTERIOR?					
ESCOVA OS DENTES ANTES DE DURMIR?			DEPOIS DA ESCOVAÇÃO, TOMA OU COME ALGO? (SUCO, LEITE, BOLACHA...)		
LOCALIZAÇÃO COLETA DE CÁRIE			LOCALIZAÇÃO COLETA DE BIOFILME (PREF. CERVICAL VESTIBULAR)		
					
HORÁRIO DE COLETA					

APÊNDICE C

Exemplificação da Quantificação de Polissacarídeos da Parede Celular



ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	029/2012
CAAE:	01543012.0.0000.5231
Processo:	7644/2012
Pesquisador(a):	Ricardo Sérgio Couto de Almeida
Unidade/Órgão:	CCB – Departamento de Microbiologia

Prezado(a) Senhor(a):

O “**Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina**” (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

“CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E BIOLÓGICA DE FATORES QUE PARTICIPAM NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES BUCAIS E CÁRIES IN VITRO: INTERAÇÕES ENTRE CANDIDA ALBICANS E STREPTOCOCCUS MUTANS”

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá ser encaminhado ao CEP/UEL relatório final da pesquisa, conforme prevê a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares.

Londrina, 16 de abril de 2012.

Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
 Universidade Estadual de Londrina

ANEXO B

Normas do Periódico 'Caries Research'

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages and all lines must be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes. Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous. Lines in the manuscript must be numbered consecutively from the title page until the last page. Submissions which do not conform to these simple guidelines will be returned to the author.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address,

telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or if an author or their employer holds patent(s) on a product used in the study, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares, travel grant). Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the

material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489–93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Information detailing the power and sample size calculations must be included in the manuscript. Randomized clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

Randomized clinical trials must be registered at clinicaltrials.gov or similar national authority and the trial number included in the manuscript.

Trials beginning after 1 July 2012 must be registered before recruitment of the first patient. Caries Research will accept 'retrospective registration' of trials that began before 1 July 2012 (retrospective meaning registration occurs after patient enrolment begins). When submitting a paper on a clinical trial, the trial registration number should be stated at the end of the abstract in the following format: Trial registration: [name of the trial registry, the registry URL and the trial registration number]. In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be -cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

In any manuscript involving microradiography, the following information must be included: the radiation source and filters used and the kV used (this determines the wavelength of radiation and hence the validity of using Angmar's equation). Manuscripts on experimental enamel caries should show that the lesions retain a relatively well-preserved surface layer, i.e. are not surfacesoftened lesions. Proof of surface integrity can be provided either as illustrations in the paper or as supplementary material for the reviewers. Transverse microradiography, polarized light microscopy of a section immersed in water or backscattered scanning electron microscopy of a polished cross-section can be used to provide the necessary proof.

To allow the nature of experimental changes to be assessed, microradiographs or micrographs should be provided to show part of the experimental lesion and the adjacent control (e.g. figure 2 of Zaura et al.: *Caries Res* 2007;41:489–492). Again, these images can be provided as part of the paper or as supplementary material for review purposes.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and provide the position(s) of author(s) employed by commercial firms. This section should describe the source(s) of funding that have supported the work including relevant grant numbers. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the

sentence as needed. Additionally, the roles of all authors must be described (For example: Conceived and designed the experiments: AA, BB. Performed the clinical examination: AA, CC. Performed the experiments: DD, FF. Analyzed the data: BB, FF. Wrote the paper: AA, CC, FF, EE).

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page.

References Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive. Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where

the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].

Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].

More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when it was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers. *Examples (a) Papers published in periodicals:* Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. *Caries Res* 2005;39:284-286.