

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Departamento de Biologia Básica e Oral

THAINÁ NASATO FIORAVANTI

**Prevalência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose e sua relação com as
proteínas antifúngicas salivares**

**Ribeirão Preto SP
2022**

THAINÁ NASATO FIORAVANTI

Prevalência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose e sua relação com as proteínas antifúngicas salivares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Alan Grupioni Lourenço

**Ribeirão Preto SP
2022**

Nome: FIORAVANTI, Thainá Nasato

Título: Prevalência de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose e sua relação com as proteínas antifúngicas salivares

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por ter se tornado minha segunda casa nos últimos cinco anos e me proporcionar tantos momentos inesquecíveis.

Ao corpo docente, pelo compartilhamento de tanto conhecimento e experiências essenciais para minha formação acadêmica.

Ao meu orientador, pela oportunidade, apoio, dedicação e paciência com a minha pessoa.

Aos meus pais e irmã que me incentivaram durante todos esses anos e não mediram esforços para que eu pudesse concluir meus estudos.

Aos meus amigos Barbara do Bem Balbino, Gabriela Hikari Miranda Nakahara, Rodolfo Maestrelo Zerbato e Rodrigo Reiff Campanelli por toda parceria durante a graduação, e a tantos outros amigos que foram essenciais nessa jornada.

RESUMO

A patogênese da tuberculose (TB) associada ao seu tratamento antimicrobiano de longa duração tornam-se fatores preditivos para infecções fúngicas. No entanto, poucos trabalhos avaliaram a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência e carga fúngica das espécies de *Candida* isoladas da cavidade oral desses pacientes. O estudo dessas influências é importante, pois a TB é mais prevalente em pacientes imunodeprimidos que são mais vulneráveis às infecções oportunistas.

Para o desenvolvimento deste estudo, coletamos saliva e enxaguado bucal de 30 participantes com diagnóstico clínico de TB em duas diferentes ocasiões: com menos de 45 dias de tratamento e quando completaram mais de 120 dias de tratamento anti-TB, sendo avaliadas em cada ocasião a influência do diagnóstico clínico da TB e do tempo de tratamento anti-TB sobre quantificação e prevalência das diferentes espécies de *Candida* spp. Além disso, analisamos a correlação destes fatores com a concentração de proteínas antifúngicas salivares, lactoferrina e histatina 5. Como controle, foram incluídos no estudo 60 participantes sem diagnóstico clínico de TB que foram avaliados, uma única vez, com a mesma metodologia.

O diagnóstico clínico de TB e seu tempo de tratamento estiveram associados a maior carga fúngica e maior prevalência de *Candida não-albicans* na cavidade oral. Os níveis salivares de Lf estiveram em maiores concentrações em pacientes com TB e se correlacionaram positivamente com a quantificação de *Candida* spp. O aumento da prevalência e quantificação de *Candida* isolada de paciente com TB atenta para o maior risco de lesões orais e disseminações sistêmicas nesses pacientes, uma vez que a *Candida* comensal da cavidade oral se torna patogênica quando ocorre mudança na interação entre a levedura e o hospedeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivos gerais	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 População	11
3.2 Controle de vieses	11
3.3 Métodos Clínicos	12
3.4 Análise da prevalência e quantificação de <i>Candida</i> spp. Em pacientes saudáveis e em pacientes com TB	13
3.4.1 Isolamento das cepas de <i>Candida</i> spp.	14
3.4.2 Extração do DNA das leveduras	14
3.4.3 Reação de PCR	15
3.5 Mensuração da Lf salivar	16
3.6 Dosagem histatina 5 salivar	16
3.7 Análise estatística	17
4. RESULTADOS	18
4.1 Características da população	18
4.2 Estudo da frequência de <i>Candida</i> spp isoladas na cavidade oral de pacientes com TB e em pacientes sistemicamente saudáveis	20
4.3 Estudo da quantificação das Unidades Formadoras de Colônia de <i>Candida</i> spp isoladas da cavidade oral de pacientes com TB e sistemicamente saudáveis	23
4.4 Estudo dos níveis salivares das proteínas antifúngicas salivares: Lf e Hist5	24
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Recentes estudos têm verificado um aumento nas comorbidades relacionadas à *Candida* spp. em pacientes com tuberculose (TB)^{1,2}. Estudos observacionais transversais constataram um maior número de casos de candidíase e maior carreamento de espécies de *Candida* na cavidade oral de pacientes com TB^{3,4}. Muito possivelmente, essas alterações estejam relacionadas ao tratamento antibiótico de longa duração ministrado para o enfrentamento da doença^{5,6}. De nosso conhecimento, não existem estudos longitudinais que verifiquem a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência de diferentes espécies de *Candida* na cavidade bucal, tampouco sobre a influência do diagnóstico clínico da TB e de seu tratamento sobre a virulência de espécies de *Candida*.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 10 milhões de pessoas tiveram TB em todo o mundo no ano de 2018, sendo em sua maioria homens, com os casos registrados praticamente em todos os países e em diversas faixas etárias. Cerca de 1,5 milhão de pessoas morreram em decorrência da TB neste mesmo ano e estima-se que 25% da população mundial possua o *Mycobacterium tuberculosis* em latência⁷. No Brasil, em 2019, foram diagnosticados 73.864 casos, que representam um coeficiente de incidência de 35,0 casos/100 mil habitantes. Os óbitos em 2018 proporcionaram um coeficiente de mortalidade de 2,2 óbitos/ 100 mil habitantes, sendo registrados 4.490 óbitos em decorrência da TB⁸.

O tratamento da TB envolve o uso de antimicrobianos por tempo prolongado, podendo durar mais de dois anos, e algumas vezes associados ao uso de corticosteroides. O tratamento da TB requer associação antimicrobiana e supervisionamento da administração das drogas, devido sua longa duração e baixa adesão. O esquema terapêutico mais comum, denominado de esquema básico, é dividido em duas fases. Na primeira fase, fase intensiva, faz-se o uso de rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (RIPE). Esta fase tem duração média de dois meses e visa reduzir a transmissão, a morbidade e a resistência microbiana. A segunda fase, denominada de fase de manutenção, é aquela em que o bacilo está em crescimento lento. Essa fase tem o objetivo de eliminar os bacilos persistentes proporcionando uma cura efetiva e duradoura da TB. O número de antimicrobiano é reduzido, sendo geralmente utilizado a rifampicina e isoniazida (RI) com duração média de quatro meses⁹.

A patogênese da TB, associada ao longo uso de antibióticos tornam-se fatores preditivos para superinfecções fúngicas e não raramente encontramos relatos de infecções fúngicas associadas à TB pulmonar ativa^{2,4,10,11,12,13}. Os antimicrobianos de uso prolongado podem

promover disbiose¹⁴, inclusive na cavidade bucal, alterando a microbiota comensal e tornando-as patógenos oportunistas¹⁵.

A *Candida* é um microrganismo saprofítico, oportunista, do filo dos Deuteromycota, presente na microflora intestinal, cavidade oral e vagina, comportando-se como microrganismo comensal em hospedeiro com função normal do sistema imunológico inato, no entanto, rompido o equilíbrio parasita-hospedeiro a *Candida* é responsável por vários processos patológicos que podem variar de doenças mucocutâneas não fatais a doenças invasivas graves^{16,17}.

Alguns estudos analisaram fatores de risco para o aparecimento de *Candida* spp, sendo que entre os principais está o uso de antibióticos de amplo espectro por um tempo prolongado, devido à imunossupressão causada no organismo e eliminação de microrganismos diversos do corpo humano, que são comensais. Isso possibilita o desenvolvimento de microrganismos oportunistas, já que o indivíduo está mais suscetível a infecções. Assim, a candidíase oral está associada a pacientes com alterações na resposta imunológica local ou sistêmica, podendo estar relacionada a esse uso de antibióticos^{18,19,20}.

Candida spp e *M. tuberculosis* são colonizadores exclusivos dos seres humanos e 30% da população mundial está co-infectada por esses microrganismos²¹. Embora presente de maneira comensal no trato gastrointestinal e, sobretudo, na cavidade oral, estudos mostraram que a colonização oral assintomática pode levar à lesão oral ou tornar-se fonte de infecções fúngicas disseminadas^{22,23,24}. A colonização oral pela *Candida* pode contribuir com um aumento de três vezes no risco de desenvolvimento de candidemia¹⁷ e a carga fúngica dessa colonização em unidades formadoras de colônias (UFC) também é um importante fator de risco para a candidíase invasiva²⁵.

A cavidade bucal é continuamente exposta a um grande número de patógenos e antígenos, e, portanto, considerada em constante reação inflamatória, embora muitas vezes, de forma subclínica. Apenas quando as defesas são vencidas, os microrganismos conseguem penetrar à mucosa e levar ao aparecimento das doenças bucais. É importante considerar o importante papel da saliva na defesa e na proteção dos tecidos bucais, já que pacientes com redução do fluxo salivar apresentam maiores índices de alterações bucais^{26,27}. Muitos fatores antimicrobianos endógenos são encontrados na saliva, dentre eles destacamos a lactoferrina (Lf) e a histatina 5 (Hist5).

Tanto a Lf quanto a Hist5 possuem grande atividade inibitória de crescimento e de promoção de lise celular de espécies de fungos e bactérias orais^{28,29,30}. O fluxo e a composição salivar estabelecem um equilíbrio dinâmico entre *Candida* spp. e outros membros da microbiota

comensal, prevenindo o estabelecimento de candidíase no hospedeiro imunocompetente^{31,32,33}, no entanto, alguns estudos tem relacionado as variações das concentrações salivares de Lf e Hist com a maior colonização por espécies de *Candida*^{34,35}.

A Lf é armazenada em grânulos específicos dos neutrófilos e é liberada em situações de quimiotaxia e adesão desses granulócitos. A Lf tem sido proposta como um importante marcador inflamatório^{36,37} e também possui papel importante na inibição da adesão microbiana ao biofilme dental³⁸. A Lf atua na imunidade inata por ser uma queladora de ferro com importante ação antifúngica, já que restringe a disponibilidade de ferro, necessária para o crescimento microbiano³⁹.

Têm-se observado que além do sequestro de ferro, a Lf interage diretamente com a superfície celular da levedura, causando a formação de bolhas superficiais e extravasamento de proteínas para o meio extracelular. No entanto, esse efeito antifúngico da Lf é dependente de fatores locais como pH, temperatura e período de incubação⁴⁰. Além dessas propriedades, a Lf é capaz de reduzir a atividade metabólica dos biofilmes de *C. albicans*, in vitro. Essa redução na atividade de biofilme também é explicada pelo sequestro de ferro, fundamental para o crescimento microbiano⁴¹.

A histatina é um grupo de peptídeos antimicrobianos secretados pelas glândulas salivares humanas com poderosa ação antifúngica, principalmente contra *C. albicans*³⁴. As principais proteínas da família das histatinas são as histatinas 1, 3 e 5, com a histatina-1 (Hist1) e a histatina-3 (Hist3) codificadas por dois genes distintos, enquanto a histatina-5 (Hist5) é um produto proteolítico de Hist3⁴².

Dentre as histatinas, a Hist5 apresenta a maior capacidade antifúngica. Helmerhorst e colaboradores, em 2001, observaram que a Hist5 induz a morte fúngica por inibição da respiração mitocondrial de maneira dose-dependente, com o seguinte mecanismo de ação: primeiramente a Hist5 se liga a receptores da membrana fúngica e são translocadas para dentro da célula onde vão ter como alvo as mitocôndrias energizadas, causando o efluxo de ATP, íons cálcio e magnésio, promovendo a morte celular^{34,43}. Devido ao relatado aumento na prevalência de *Candida* spp. em pacientes com TB e devido ao risco de *Candida* spp. comensais serem fontes para sua disseminação sistêmica, sobretudo em paciente imunocomprometidos, nosso estudo hipotetizou que o diagnóstico clínico da TB e seu tratamento antimicrobiano pudesse aumentar a carga fúngica e a prevalência de espécies de *Candida* spp. na cavidade oral desses pacientes. Para explicar esse possível aumento, hipotetizamos que ele pudesse decorrer do aumento da virulência das espécies de *Candida* spp. ou por um desequilíbrio das secreções salivares de proteínas antifúngicas salivares endógenas Lf e Hist5.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a prevalência e quantificação de *Candida* spp. em indivíduos com tuberculose em diferentes fases do tratamento anti-TB, comparando-os aos indivíduos sistemicamente saudáveis.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar a influência do diagnóstico clínico da TB e do tempo de tratamento anti-TB sobre a quantificação e prevalência das diferentes espécies de *Candida* spp. na cavidade bucal.

2.2.2 Determinar a concentração de proteínas antifúngicas salivares, Lf e histatina 5 e sua correlação com a prevalência e quantificação da *Candida* spp., assim como sua possível correlação com o diagnóstico clínico de TB e tempo de tratamento anti-TB.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 População

Pacientes em seguimento no ambulatório de moléstias infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), no Centro de Saúde Escola Cuiabá (CSE-FMRP-USP) ou na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) foram convidados a participar deste estudo, sendo incluídos 30 participantes com diagnóstico clínico de TB e 60 participantes sem diagnóstico clínico de TB. Todos os participantes foram informados dos objetivos da pesquisa e deram seu consentimento livre e esclarecido.

3.2 Controle de vieses

Além dos objetivos dessa pesquisa, outros fatores podem influenciar a prevalência de *Candida spp.* na cavidade oral, como exemplificados na Figura 1.

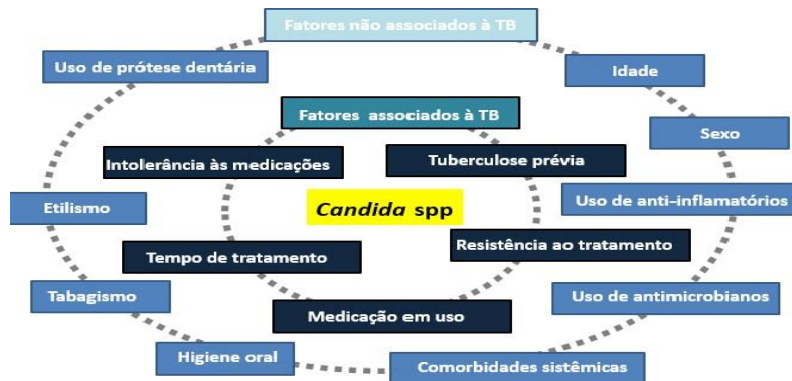


Figura 1 – Diagrama de causalidade

Fonte: Lourenço AG

A fim de diminuirmos os possíveis fatores de confusão, os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes fatores de inclusão: 1. *Pacientes sistemicamente saudáveis*: não apresentar envolvimento sistêmico que possa interferir na prevalência e na contagem de *Candida spp.*, como diabetes mellitus, tratamento antineoplásico ou estado de imunossupressão; não ter feito uso de medicação antimicrobiana e anti-inflamatória nos últimos 3 meses; não apresentar envoltimentos protéticos extensos, como uso de prótese total ou uso

de prótese parcial removível com cobertura palatina. 2. *Pacientes com TB*: além de seguirem os mesmos critérios descritos para os pacientes sistemicamente saudáveis, os pacientes apresentaram TB confirmada por exame de cultura do escarro, teste rápido molecular e/ou baciloscopia.

Para diminuirmos a influência de outros fatores, o grupo de pacientes sistemicamente saudáveis e o grupo de pacientes com TB foram pareados por idade, sexo e número de tabagistas. E para diminuir a influência da condição oral no estudo, os dois grupos foram pareados pelo índice de CPO-D (número médio de Dentes Permanentes Cariados, Perdidos e Obturados) e de PSR (Periodontal Screening Index). Para tanto, os participantes sistemicamente saudáveis foram selecionados com base no índice de CPO-D e PSR encontrados nos participantes com TB.

Os participantes inclusos nesta pesquisa foram divididos em dois grupos de acordo com a presença de diagnóstico clínico de TB.

- Grupo TB: composto de 30 participantes com diagnóstico clínico de TB.
- Grupo controle: composto por 60 pacientes sem diagnóstico clínico de TB.

A fim de verificarmos a influência do tratamento anti-TB sobre a prevalência, quantificação, virulência de *Candida spp.*, os participantes foram avaliados duas vezes em tempos distintos.

- Tempo 1 (1T): foram coletadas amostras de enxaguado bucal e saliva de pacientes diagnosticado com TB em tratamento antibiótico há menos de 45 dias, ou seja, em fase intensiva de tratamento anti-TB.
- Tempo 2 (2T): foram coletadas amostras de enxaguado bucal e saliva dos mesmos pacientes do 1T, quando esses tiverem sob tratamento antibiótico por mais de 120 dias, ou seja, em fase de manutenção do tratamento anti-TB.

3.3 Métodos Clínicos

Os participantes foram submetidos a exame clínico-anamnésico e coleta das amostras, como se segue:

Anamnese: os participantes foram submetidos a um questionário sobre suas condições médico-odontológicas. Algumas questões foram dirigidas diretamente ao entrevistado, como: dados pessoais, automedicação e história odontológica. Informações sobre tempo de TB, tempo de tratamento, ganho ou perda recente de peso, medicamentos em uso e sintomatologia persistente foram obtidas por meio de consulta ao prontuário médico.

Exame físico: os participantes foram avaliados em relação a linfonodos, alterações cutâneas faciais e alterações perilabiais. No exame intrabucal foi avaliado: língua, assoalho bucal, gengiva, mucosa jugal, palato duro, palato mole e tonsilas. Número de dentes cariados, perdidos e obturados compuseram o índice CPO-D. Avaliação periodontal simplificada PSR foi realizada utilizando sonda periodontal modelo 621 determinada pela Organização Mundial da Saúde (WHO-621), seguindo os critérios estabelecidos pela American Dental Association e a American Academy of Periodontology, 1992⁴⁴.

Coleta de enxágue bucal: a contagem de *Candida* spp. foi realizada nas amostras de enxágue bucal com tampão fosfato-salino (PBS) pela técnica descrita por Samaranayake, em 1986. Um dia antes da coleta, foram preparados frascos contendo 10mL de PBS (pH 7,3, 0,1M) e esterilizados em autoclave. Esses frascos contendo PBS estéril foram acondicionados em temperatura de 4°C até seu uso. O participante foi convidado a realizar bochecho com 10mL de PBS por 60 segundos e expectorar dentro de um coletor universal. O coletor universal foi acondicionado a 4°C e conduzido imediatamente ao laboratório, onde foi centrifugado (2000g por 10 minutos). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido depositado no fundo do tubo falcon ressuspendido em PBS até que atingisse 1mL de solução. A partir desse 1mL de solução realizou-se a análise da prevalência e quantificação de *Candida* spp.⁴⁵

Coleta da saliva: os participantes foram instruídos a não se alimentar, não beber e não escovar os dentes uma hora antes da coleta, de forma a minimizar os riscos de contaminação da amostra. Os participantes foram orientados a ficar sentados, com a cabeça levemente inclinada para frente, e deixar salivar normalmente por cinco minutos, em um frasco colocado abaixo do lábio inferior. Todas as amostras foram coletadas preferencialmente, entre oito e onze horas da manhã. O fluxo salivar foi avaliado as amostras foram levadas ao laboratório e centrifugadas a 800G por 30 minutos a 4°C. A saliva foi alicotada em criotubos e congelada imediatamente a -80°C até as análises necessárias²⁹.

3.4 Análise da prevalência e quantificação de *Candida* spp. em pacientes saudáveis e em pacientes com TB.

A análise micológica para *Candida* spp. foi realizada no enxaguado bucal. Para tanto, 100µL de amostra pura do enxaguado e diluições seriadas de 10⁻¹ e 10⁻² foram semeadas em duplicata em placas de Petri de cultura com Ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (*Difco, Detroit, USA*) e incubadas em estufa de cultura a 37°C por 48 horas. As culturas positivas foram

contadas e obtidas as médias das duplicatas para a determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). A UFC foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $UFC = (\text{colônias encontradas} \times 10^n) / \text{quantidade em mL da solução utilizada}$, sendo n o valor absoluto da diluição.

Para a identificação das espécies de *Candida* 100 μ L de amostras de enxaguado bucal e de suas diluições foram semeadas em placa de Petri contendo CHROMagar *Candida*TM, a 37°C por 48 horas. O meio CHROMagarTM identifica de maneira presuntiva as espécies de *Candida* baseadas nas diferentes tonalidades que essas adquirem. Uma colônia de cada cor foi expandida em caldo Sabouraud Dextrose e armazenada com 15 % de glicerol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) em freezer -80 °C, para posterior confirmação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3.4.1 Isolamento das cepas de *Candida* spp.

As cepas foram isoladas a partir de uma colônia da cultura do CHROMagarTM separadas com auxílio de uma alça de semeadura estéril de 10 μ l e ressuspendido em 5 mL de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB – Difco, Detroit, USA) colocados na estufa em 37 °C por 24 horas para o crescimento das cepas. Após as 24 horas as cepas foram aliquotadas em 300 μ L de glicerol a 40%.

3.4.2 Extração do DNA das leveduras.

Para o PCR, realizamos a extração do DNA de todas as espécies isoladas dos pacientes e dos DNAs das seguintes cepas comerciais da ATCC (ATCC, Virginia, USA) *C. albicans* (90028), *C. glabrata* (2001), *C. parapsilosis* (90018), *C. tropicalis* (750) e *C. dubliniensis* (7987) para comparação do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição. A alíquota das *Candida* isoladas de pacientes e das cepas comerciais foram semeadas em estrias múltiplas em placa de Petri com Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA). Após 24 horas de crescimento, uma colônia foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose. Após 24 horas, os respectivos tubos foram submetidos à centrifugação por 5 minutos a 3200 g. O *pellet* resultante foi ressuspendido em 500 μ L de tampão de lise (200 mM de Tris-HCl; 250 mM de NaCl; 25 mM de EDTA; 0,5% de Solução de Dodecil Sulfato de Sódio), associados a 500 μ g de pérolas de vidro (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) de 425-600 μ m de diâmetro, lavadas previamente com ácido clorídrico. As amostras foram levadas ao agitador

e homogeneizadas por 10 minutos. Todo o lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL com 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). Em seguida, os microtubos foram novamente agitados, por 10 minutos e centrifugados a 2000 g (centrifuga 5430R, *Eppendorf, Hamburgo, Alemanha*) por 10 min. A fase aquosa obtida desta centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e a ela foi adicionado 1 mL de isopropanol (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). Uma nova centrifugação foi realizada e o pellet resultante foi lavado com 500 µL de etanol a 70 % (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). Após nova centrifugação por 5 minutos, o pellet foi seco à temperatura ambiente. As amostras foram ressuspendidas em 50 µL de água ultra pura e submetidas a um tratamento com 20 µg/mL de RNase (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*) em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Após o tratamento, 1 µL de cada amostra foi diluída em 49 µL de água e quantificada em espectrofotômetro (*BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Nagaokakyo, Quioto, Japão*). A medida da absorbância foi realizada em 260 nm e 280 nm e a razão 260/280 determinou a pureza da amostra. A integridade do DNA foi avaliada aplicando-se as amostras em gel de agarose (*Agargen, Torrejon de Ardoz, Espanha*). Após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas a -20 °C.

3.4.3 Reação de PCR.

A reação de PCR foi conduzida pela amplificação parcial (IGS2) e total do IGS através de primers descritos por Cornet e colaboradores, em 2011. Utilizamos os primers para a amplificação parcial do IGS (IGS2): 5'-TTAACTACAGTTGATCGGAC-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) para as espécies de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A amplificação total do IGS: 5'-CGATCTGCTGAGATTAAG-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) foi realizada para a identificação da *C. parapsilosis*. Para amplificação utilizamos uma mistura contendo 10 pmol de cada primer (*forward e reverse*), 5 nmol de dNTP (*Qiagen, Hilden, Alemanha*), 1,5 U de *Taq polymerase* (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*), 10 % de tampão da *Taq Polymerase* (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*), e 50 ng de DNA, em um volume final de 25µL, que foi submetido à ciclagem térmica com desnaturação inicial a 94 °C por 4 minutos, seguida por 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 48 °C, 2 minutos e 30 segundos a 72 °C e um passo de elongação final de 5 minutos a 72 °C.

O produto da amplificação foi submetido à digestão por meio de enzimas de restrição para determinação do polimorfismo dos fragmentos de restrição necessários para a identificação

das espécies de *Candida*. Para tanto utilizamos: enzima NlaIII (*New England BioLabs, Massachusetts, USA*) para o IGS2 e enzima AluI (*Invitrogen, Waltham, MA*) para o IGS. A análise de cada matriz de gel foi realizada por meio de comparação visual dos padrões de bandas das cepas que foram identificadas com as cepas referências e com o padrão de peso molecular (*Invitrogen, Waltham, MA*).

3.5 Mensuração da Lf salivar.

A mensuração da Lf salivar foi determinada por ELISA. Inicialmente, realizamos diluições seriadas de Lf (*Lactoferrin from human Milk – Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*), em concentração inicial de 5µg/mL adicionando 100µL de cada concentração de Lf por poço, em duplicata. Amostras salivares foram diluídas dez vezes em PBS e adicionadas à placa de ELISA, em duplicata (100µL por poço). As diferentes concentrações de Lf e as amostras dispensadas sobre a placa foram incubadas durante uma hora em banho-maria a 37°C. Após a incubação e posterior lavagem com PBS realizamos o bloqueio da placa com ovalbumina a 10% (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*), 200µL por poço, *overnight*, a 4°C. Após o bloqueio adicionamos o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Lf humana (*Rabbit anti-human lactoferrin L3262, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) que foi incubado durante uma hora, em banho-maria a 37°C. Após lavagens com PBS adicionamos o anticorpo secundário oriundo de ovelha anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase (*CAPPEL – Peroxidase conjugated goat IgG fraction to rabbit IgG – MP Biomedicals, Illkirch, França*), que foi incubada por 45 minutos, e após nova lavagem com PBS realizamos a revelação com o *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) segundo as recomendações do fabricante. Para a leitura empregamos absorvância, realizada em leitor de ELISA (*TP Reader ThermoPlate, São Paulo, Brasil*) a 492nm.

3.6 Dosagem histatina 5 salivar.

A determinação dos níveis salivares da Hist5 foi mensurada através do *Human Histatin 5 ELISA kit* (*Cusabio Biotech Co. LLD*), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente realizamos diluições seriadas do padrão de Hist5, em concentração inicial de 800ng/mL. Cem mililitros de saliva e das diluições do padrão foram adicionados por poço e incubados por 2 horas a 37°C. Posteriormente, foi adicionado 100µL da Biotin-antibody, incubado por 1 hora a 37°C. Após a incubação e posterior lavagem com tampão, foi adicionado 100µL do HRP-ativin

por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem, adicionou-se 90µL do substrato 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) que foi incubado por 30 minutos, protegido da luz. Finalmente, foi adicionado 50µL de stop solution e a leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (*Espectrofotômetro de Microplacas Epoch – BioTek, Winooski, VT, USA*) a 450nm, com correção de comprimento de onda de 570nm.

3.7 Análise estatística.

As análises dos resultados estão se realizando com o auxílio do software GraphPad Prism 5. A análise estatística está considerando testes bicaudais e nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$).

As análises descritivas incluirão estimadores pontuais como medianas e quartis (primeiro quartil – Q1 e terceiro quartil – Q3), assim como média e desvio padrão, quando necessário. Para verificar a normalidade de distribuição dos dados está se utilizando teste de Shaipro Wilk, destacando que apenas as mensurações salivares de Lf apresentaram distribuição normal. Para as análises bivariadas de comparação entre os grupos (sem dependência dos dados) se utiliza o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher para os desfechos categóricos, já para as comparações bivariadas categóricas dependentes ou pareadas estamos utilizando o teste de McNemar. Para as comparações das análises bivariadas contínuas se utiliza o teste t, para os dados paramétricos, e teste de Mann Whitney, para os dados não paramétricos. As análises bivariadas contínuas dependentes estão sendo analisadas pelo teste t pareado, para os dados paramétricos, e teste de Wilcoxon, para os dados não paramétricos.

Para a comparação de três médias utiliza-se o teste de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn, para os dados não paramétricos e a análise de variância ANOVA, com pós teste de Tukey, para os dados paramétricos. Para a comparação de correlações entre duas variáveis, emprega-se a correlação não paramétrica de Spearman.

4. RESULTADOS

4.1 Características da população.

O presente estudo foi realizado no município de Ribeirão Preto, interior do estado de São Paulo, entre agosto de 2018 e dezembro de 2019. Em 2018, o município de Ribeirão Preto contabilizou 175 casos de TB, com taxa de incidência de 25 casos por 100 mil habitantes, acometendo 2,2 vezes mais homens, principalmente com idade entre 20-39 anos, com taxa de mortalidade de 7%⁴⁶.

Foram inclusos no estudo 90 indivíduos, 60 participantes sistemicamente saudáveis e 30 participantes com diagnóstico clínico de TB. A pesquisa foi baseada na coleta de enxaguado bucal e saliva dos 30 participantes com diagnóstico clínico de TB em dois tempos: quando estavam com menos de 45 dias de tratamento (1T) e quando completaram mais de 120 dias de tratamento anti-TB (2T). Já entre os participantes sem diagnóstico clínico de TB as análises foram realizadas em uma única coleta de enxaguado bucal e saliva. O fluxograma de inclusão dos participantes está detalhado na Figura 2.

As análises dos dados demográficos e clínicos demonstram homogeneidade entre os participantes do grupo TB e os participantes do grupo controle. Os homens foram maioria nos dois grupos de estudo, 70% no grupo TB e 60% no grupo controle, a mediana de idade dos participantes também se mostrou homogênea no grupo TB, 30,5 (25,5 – 50) anos, e controle, 36,5 (28,5 – 45,5) anos. Os dados clínicos da condição bucal, como o CPO-D e o PSR, também foram semelhantes entre os grupos estudados, no entanto, o grupo TB apresentou menor fluxo salivar, 1,3 (0,77 – 2) mL/min, quando comparado ao grupo controle, 2 (2-3) mL/min ($p < 0,0001$, teste de Mann-Whitney).

A frequência de comorbidades cardíacas, hepáticas e psiquiátricas também foi semelhante entre os grupos de estudo, como mostrado na Tabela 2. Todos os participantes com TB apresentaram a forma pulmonar da doença, no entanto, em 2 participantes coexistia a TB pleural, em 2 participantes a TB miliar, em 1 participante coexistia a TB abdominal e em 1 participante a TB neural. Apenas dois participantes do grupo TB eram multidrogas resistentes. Ainda entre os participantes com TB, 27 faziam uso do esquema básico do tratamento anti-TB, tanto na fase intensiva (1T), quanto na fase de manutenção (2T) como pode ser observado na Tabela 1.

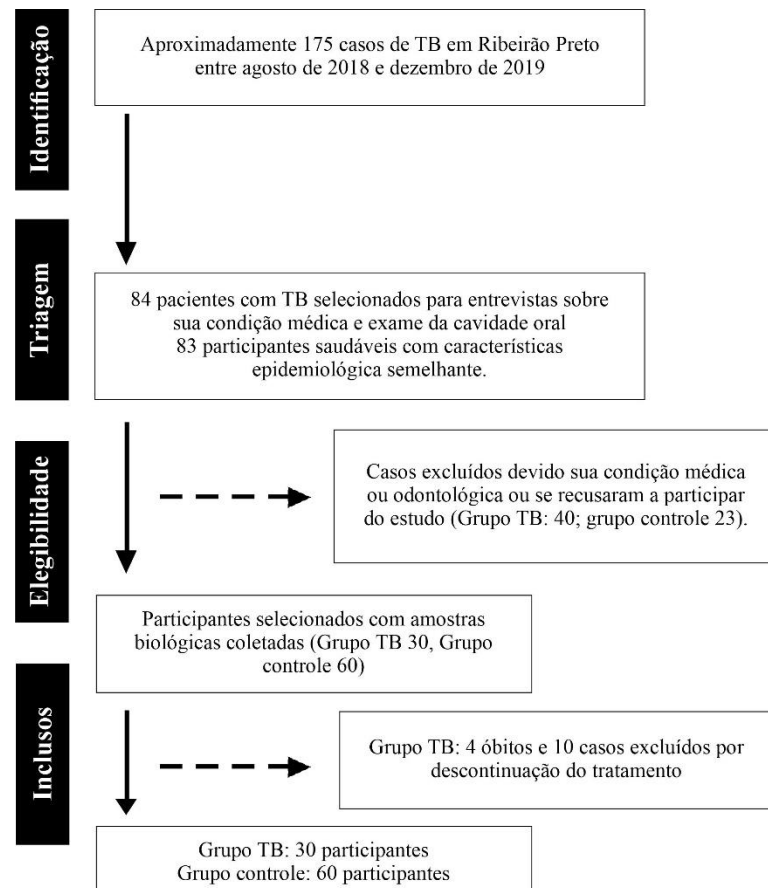


Figura 2 - Fluxograma do delineamento do estudo. Pacientes com tuberculose (grupo TB) e paciente sistemicamente saudáveis (grupo controle).

Fonte: Autora.

Tabela 1 – Esquemas do tratamento anti-TB durante a fase de intensiva, TB (1T), e de manutenção, TB (2T).

Esquemas	TB (1T)	TB (2T)
R+I+P+E	27	1
R+I+P+E+Lev	1	0
R+E+Lev	2	1
R+I	0	27
E+Lev+Ami	0	1

R: rifampicina; I: isoniazida; P: pirazinamida; E: etambutol; Lev: levofloxacina; Ami: amicacina

Fonte: Autora.

Tabela 2 – Características sócio demográficas dos participantes com e sem tuberculose.

Variáveis		Grupo TB	Grupo controle	P valor	
Número de participantes		30	60		
Sexo	Homens	21 (70%)	36 (60%)	0,3585	
	Mulheres	9 (30%)	24 (40%)		
Idade		30,5 (25,5-50)	36,5 (28,5-45,5)	0,3102	
Etnia	Branco	13 (43,3%)	36 (60%)	0,1787	
	Não Branco	17 (56,7%)	24 (40%)		
Tabagismo	Fumante	9 (30%)	15 (25%)	0,6217	
	Não fumante	21 (70%)	45 (75%)		
Drogadição	Sim	5 (16,7%)	5 (8,3%)	0,2915	
	Não	25 (83,3%)	55 (91,7%)		
Bebidas alcoólicas	Sim	8 (26,7%)	15 (25%)	1,000	
	Não	22 (73,3%)	45 (75%)		
CPOD (DP)		7,9 (7,39)	6,18 (7,37)	0,1149	
PSR	0	5	19	0,7079	
	1	12	21		
	2	10	14		
	3	1	2		
	4	1	1		
	Edêntulo	1	3		
Fluxo salivar ml/min		1,3 (0,77-2)	2 (2-3)	<0,0001	
Comorbidades	Hipertensão	1	8	0,2624	
	Cardiopatia	1	0	0,3333	
	Acidente vascular cerebral	1	0	0,3333	
	Hiperplasia prostática benigna	1	0	0,3333	
	Hipertireoidismo	1	0	0,3333	
	Hepatotoxicidade	1	0	0,3333	
	Herpes Zoster	1	0	0,3333	
	Distúrbios psiquiátricos	1	2	1,00	
	Formas de TB				
		TB pulmonar	24 (80%)		
	TB pulmonar e TB pleural	2 (6,7%)			
	TB pulmonar e TB miliar	2 (6,7%)			
	TB pulmonar e TB abdominal	1 (3,3%)			
	TB pulmonar e TB neural	1 (3,3%)			
Tratamento					
	Multidroga resistente	2 (6,6%)			
	Sensível	28 (93,3%)			

Teste exato de Fisher e Teste de Mann-Whitney. Os dados são apresentados como número e porcentagem, exceto quando indicado. Os dados contínuos são apresentados como mediana (Q1 – Q3).

Fonte: Autora.

4.2 Estudo da frequência de *Candida* spp. isoladas na cavidade oral de pacientes com TB e em pacientes sistemicamente saudáveis.

De maneira geral, a *Candida* spp. foi mais isolada nos pacientes com TB, quando comparada ao grupo controle ($p=0,0006$, teste Qui-quadrado), isso ocorreu principalmente pelo maior isolamento de *C. não-albicans* entre os pacientes com TB ($p=0,0003$, teste Qui-

quadrado). Diferentemente das *C. não-albicans*, a *C. albicans* foi isolada na mesma proporção entre o Grupo TB e controle ($p=0,7386$, teste Qui-quadrado). No grupo controle a *C. albicans* foi isolada em 41,7% dos participantes e no grupo TB a *C. albicans* foi isolada em 50% dos pacientes no 1T e 46,7% no 2T, como demonstrado na Tabela 3 e na Figura 3. Não houve qualquer influência do tempo de tratamento anti-TB sobre a frequência de *C. albicans* isolada na cavidade oral desses pacientes, como demonstrado pelo teste de McNemar na Tabela 4 ($p=1,000$).

A *C. não-albicans* foi isolada em 26,7 % dos participantes do grupo controle, no entanto, seu isolamento foi aumentado para 50% dos participantes do grupo TB no 1T e para 70% no 2T ($p=0,0003$ teste Qui-quadrado). Nosso estudo observou que o tempo de tratamento anti-TB foi responsável pelo aumento de isolamento de *C. não-albicans* na cavidade oral de pacientes com TB, como detalhado na Tabela 4 e pelo teste de McNemar ($p=0,0233$).

Dentre as *C. não-albicans*, a *C. tropicalis* foi a mais prevalente no grupo TB no tempo 2 (43,3%) quando comparado ao 1T (26,7%) e ao grupo controle (6,7%) ($p=0,0002$; teste Qui-quadrado). E, embora sem significância estatística, a *C. dubliniensis* também esteve mais presente no grupo TB no 2T (26,7%) quando comparado ao 1T (13%) e ao grupo controle (10%) ($p= 0,1084$; teste Qui-quadrado), da mesma maneira, a *C. glabrata* foi mais prevalente no grupo TB no 2T (6,7%) quando comparado ao 1T (3,3%) e ao grupo controle (3,3%) ($p=0,626$; teste Qui-quadrado). A *C. nivariensis* foi isolada em apenas 1 (3,3%) paciente com TB, tanto no 1T quanto no 2T e a *C. guilliermondii* foi isolada em apenas 1 paciente do grupo TB no 2T.

Tabela 3 – Frequência de isolados de espécies de *Candida* em 60 pacientes sistemicamente saudáveis (grupo controle) e em 30 pacientes com tuberculose (TB), com menos de 45 dias de tratamento anti-TB (1T) e com mais de 120 dias de tratamento anti-TB (2T).

	Controle	TB (1T)	TB (2T)	p valor*
<i>Candida spp</i>	55%	83,30%	90%	0,0006
<i>C. albicans</i>	41,7%	50%	46,70%	0,7386
<i>C. não-albicans</i>	26,70%	50%	70%	0,0003
<i>C. tropicalis</i>	6,70%	26,7%	43,30%	0,0002
<i>C. dubliniensis</i>	10%	13%	26,70%	0,1084
<i>C. glabrata</i>	3,3%	3,3%	6,7%	0,6261
<i>C. famata</i>	6,70%	0%	3,30%	0,3173
<i>C. nivariensis</i>	0%	3,30%	3,30%	0,3617
<i>C. guilliermondii</i>	0%	0%	3,30%	0,2203

* teste qui-quadrado.

Fonte: Autora.

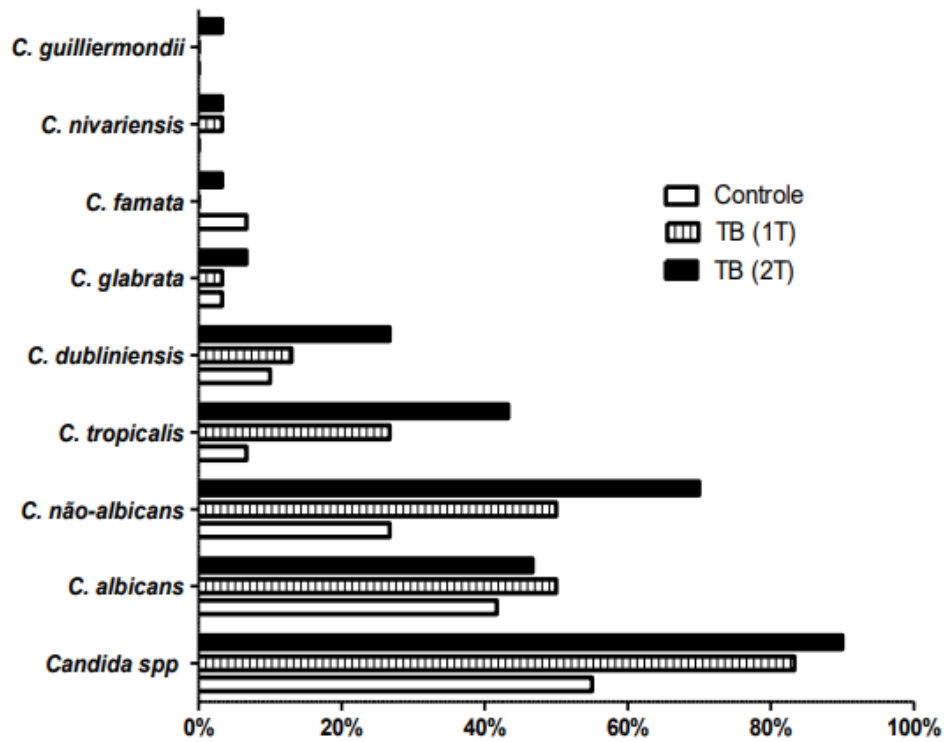


Figura 3 - Representação gráfica da frequência de isolados das espécies de *Candida* demonstradas na Tabela 3
 Fonte: Autora.

Tabela 4 - Frequência de isolamento de *C. albicans* e *não-albicans* em pacientes com tuberculose antes de 45 dias de tratamento anti-TB (T1) e depois de 120 dias de tratamento anti-TB (T2). Teste de McNemar para dados nominais pareados.

<i>C. albicans</i>					
		1T			
		Sim	Não	n	
2T	Sim	46,6%	0	46,6%	p=1,00
	não	3,4%	50%	53,4%	
		50%	50%	100%	
<i>C. não-albicans</i>					
		1T			
		Sim	Não	n	p=0,0233
2T	Sim	43,2%	23,4%	66,6%	
	não	0	33,4	33,4%	
		43,2%	56,8%	100%	

teste de McNemar

Fonte: Autora.

Os pacientes com TB foram colonizados por mais espécies de *Candida* quando comparados ao grupo controle, especialmente durante o 2T (p=0,0006 – teste Qui-quadrado). No grupo controle, apenas 13% dos pacientes foram colonizados por mais de uma espécie de *Candida*, semelhantemente ao grupo TB (1T), onde 10% dos participantes foram colonizados

por mais de 1 espécie de *Candida*, no entanto, durante o 2T esse número foi aumentado para 36% dos indivíduos. Tais resultados estão detalhados na Tabela 5 e na Figura 4.

Tabela 5 – Frequência de número de espécies de *Candida* isoladas em cada participante. Total de 60 pacientes sistemicamente saudáveis (grupo controle) e 30 pacientes com tuberculose (TB), com menos de 45 dias de tratamento anti-TB (T1) e com mais de 120 dias de tratamento anti-TB (T2).

	Controle	TB (1T)	TB (2T)
Não colonizados	45%	17%	10%
1 espécie	42%	73%	53%
2 espécies	13%	6,7%	33,3%
3 espécies	0%	3,3%	3,3%

Fonte: Autora.

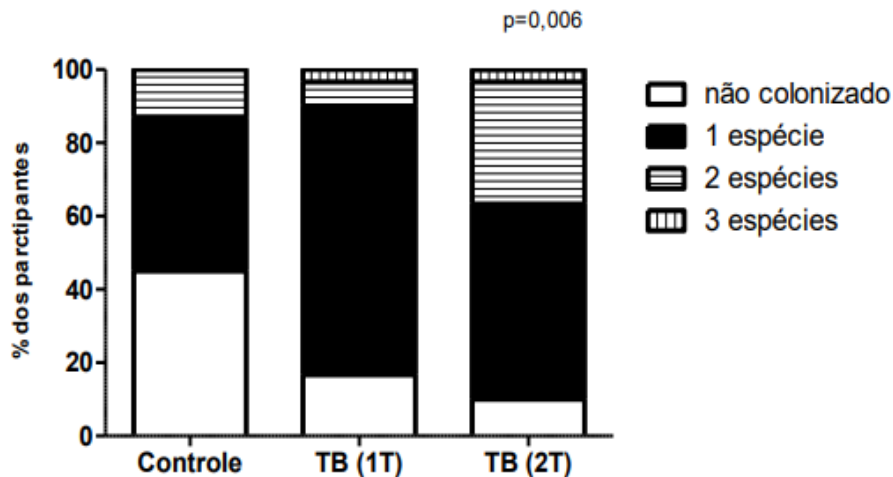


Figura 4 - Representação gráfica da frequência do número de espécies de *Candida* isoladas em cada participante, como demonstrado na Tabela 5.

Fonte: Autora.

4.3 Estudo da quantificação das Unidades Formadoras de Colônia de *Candida* spp isoladas da cavidade oral de pacientes com TB e sistemicamente saudáveis.

A contagem de UFC/mL de *Candida* spp. esteve maior nos participantes com diagnóstico clínico de TB, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$, teste de Kruskal-Wallis), sobretudo durante o 2T ($p = 0,04$, teste de Wilcoxon). Os participantes tiveram mediana de 1 (0 - 66) UFC/mL, enquanto essa contagem foi aumentada para 400,5 (19,5 - 2687,5) UFC/mL, no 1T e para 1380 (20 - 4082) UFC/mL no 2T, como demonstrado na Figura 5.

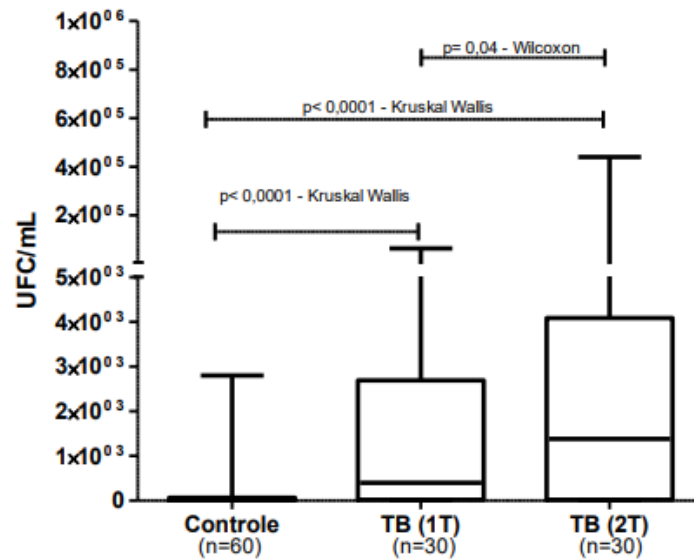


Figura 5 – Comparação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) entre o grupo controle e os grupos com diagnóstico clínico de tuberculose (TB) no tempo 1 (1T) e tempo 2 (2T) ($p < 0,0001$; teste de Kruskal-Wallis). Comparação entre os diferentes tempos TB 1T e TB 2T realizada pelo teste pareado de Wilcoxon ($p = 0,04$). Fonte: Autora.

4.4 Estudo dos níveis salivares das proteínas antifúngicas salivares: Lf e Hist5.

Os níveis salivares de Lf estiveram em maiores concentrações no grupo TB, sobretudo durante o 2T, quando comparados ao grupo controle ($p = 0,0001$; ANOVA), como demonstrado na Figura 6-A. Os participantes do grupo controle apresentaram concentrações salivares médias de Lf de 2381 (± 1470) $\eta\text{g/mL}$, enquanto tais níveis foram aumentados para 3123 (± 1041) $\eta\text{g/mL}$ no 1T e para 3935 (± 2141) $\eta\text{g/mL}$ no 2T, do grupo TB. Podemos verificar que também houve um aumento significativo nos níveis salivares de Lf após os 120 dias de tratamento anti-TB (2T) quando comparado aos níveis salivares dos mesmos pacientes antes de 45 dias (1T) de tratamento anti-TB ($p = 0,0375$; teste t pareado).

Diferentemente da Lf, não verificamos diferença nos níveis salivares de Hist5 em relação ao diagnóstico clínico de TB, quando comparados ao grupo controle ($p = 0,8956$, teste de Kruskal-Wallis) como demonstrado na Figura 6-B. Os participantes do grupo controle tiveram mediana de 63,5 (41,75 – 169,5) $\eta\text{g/mL}$, enquanto os participantes do grupo TB no 1T tiveram mediana de 70,5 (30,75 – 191,75) $\eta\text{g/mL}$ e, no T2 de 77,5 (40,5 – 184,25) $\eta\text{g/mL}$, como demonstrado na Figura 7-B.

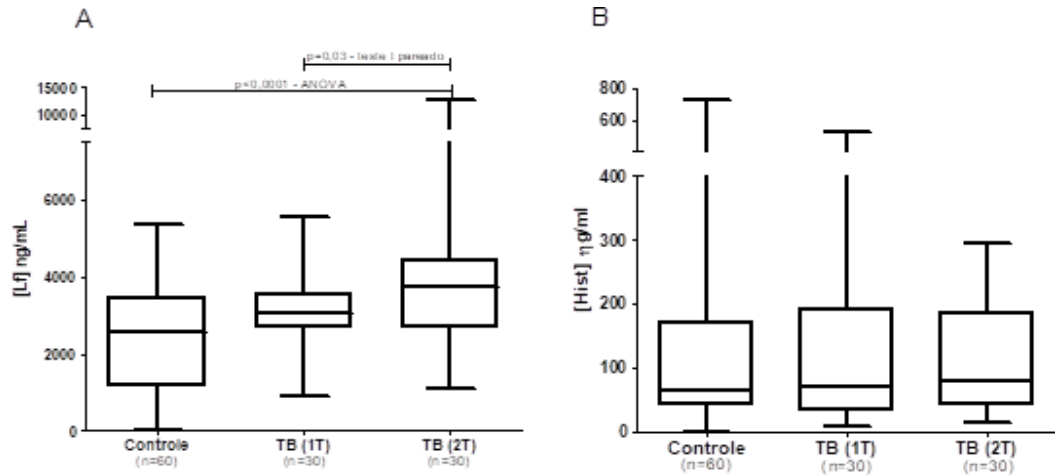


Figura 6 – Estudo dos níveis salivares das proteínas antifúngicas (A) Lactoferrina (Lf) e (B) Histatina (Hist5) em 60 pacientes sistemicamente saudáveis (grupo controle) e 30 pacientes com tuberculose (Grupo TB), com menos de 45 dias de tratamento anti-TB (1T) e com mais de 120 dias de tratamento anti-TB (2T).

Fonte: Autora.

Analisando conjuntamente o grupo controle e o grupo TB, no 1T e no 2T, não observamos correlação entre os níveis salivares de Hist5 e a UFC de *Candida* spp ($p=0,8281$; $r=0,02003$; IC 0,9410 – 0,4362; Correlação de Spearman). No entanto, observamos uma correlação positiva entre os níveis salivares de Lf e a UFC de *Candida* spp, ($p=0,0025$; $r=0,2738$; Correlação de Spearman) como demonstrado na Figura 7.

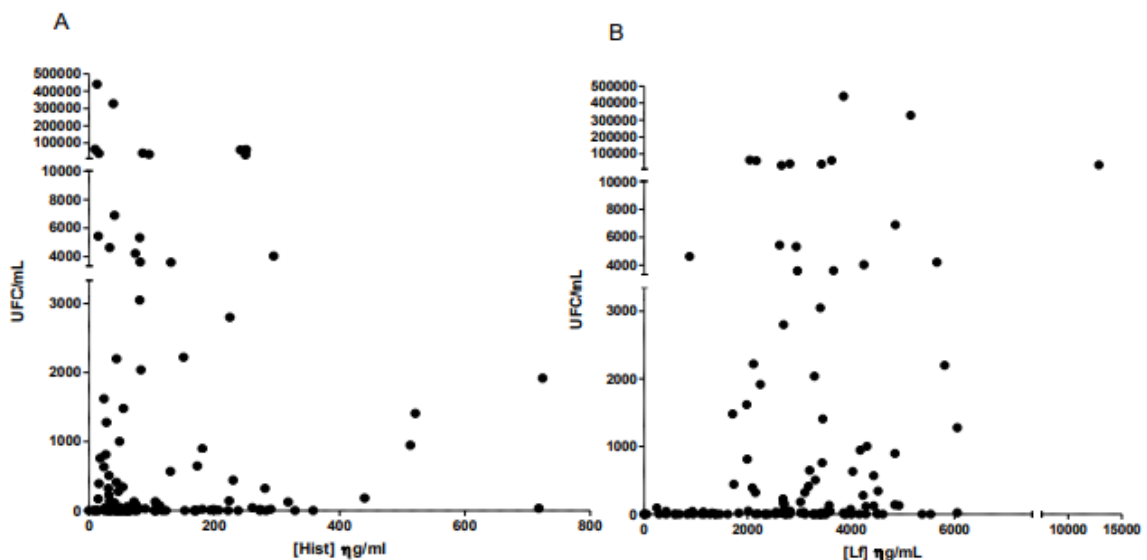


Figura 7 – (A) Correlação entre os níveis salivares de Histatina 5 (Hist5) e a Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nas 90 amostras do estudo ($p=0,8281$; $r=0,02003$; IC 0,9410 – 0,4362; Correlação de Spearman). (B) Correlação entre os níveis salivares de lactoferrin (Lf) e as UFC nas 90 amostras do estudo ($p=0,0025$; $r=0,2738$; Correlação de Spearman).

Fonte: Autora.

Os níveis salivares da Lf se correlacionaram positivamente com a idade dos participantes ($p=0,039$; $r= 0,218$; Correlação de Spearman), da mesma maneira tal associação foi encontrada entre os níveis salivares de Hist5 e a idade dos participantes ($p=0,0177$; $r=0,2495$; Correlação de Spearman).

No entanto, os níveis salivares de Hist5 e Lf não sofreram influência dos sexos dos participantes. Os homens apresentaram concentrações médias salivares de Lf de 2507 (+1415) $\eta\text{g/mL}$, enquanto essa concentração entre as mulheres foi de 2848 (+1431) $\eta\text{g/mL}$ ($p=0,228$; teste t). A mediana dos níveis salivares de Hist5 entre os homens foi de 73,5 (36-181) $\eta\text{g/mL}$ e entre as mulheres de 65 (39-170,25) ($p=0,4151$; teste de Mann Whitney).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo verificou um maior carreamento, frequência de isolamento, diversidade de espécies e virulência de *Candida* spp. entre os pacientes com TB pulmonar, assim como observou que o tratamento antimicrobiano de longa duração potencializou o carreamento e a frequência de espécies *não-albicans* na cavidade oral desses pacientes. Não encontramos outros trabalhos que tivessem relatado a quantificação das UFC das espécies de *Candida* na cavidade oral de pacientes com TB e, embora o aumento do carreamento de *Candida* não tenha resultado no aparecimento de lesões clínicas, é importante destacar que a colonização oral pode tornar-se fonte para disseminações sistêmicas^{22,24,47}. As mensurações das UFC na cavidade oral de pacientes com TB descritas no presente estudo são superiores ao encontrado em pacientes infectados pelo HIV, doença na qual sua relação com a *Candida* spp. foi mais estudada e entendida^{36,48}.

A frequência de isolados de *Candida* spp, no presente estudo, foi maior entre os pacientes com TB, tanto nos primeiros 45 dias (83,3%) quanto após os 120 dias de tratamento anti-TB (90%), quando comparados aos pacientes sistemicamente saudáveis (55%). Também Querido et al. (2011) verificaram maior prevalência de *Candida* spp. isoladas da cavidade oral de pacientes com TB (72%) quando comparados à prevalência em pacientes sistemicamente saudáveis (52%). Neste trabalho todos os pacientes com TB estavam em tratamento anti-TB há menos de 45 dias, de forma que não foi avaliado o tempo de tratamento anti-TB sobre a prevalência de *Candida* spp⁴⁹. Em 2016, Astekar e colaboradores, estudando a prevalência de *Candida* spp. no escarro de pacientes com TB, verificaram um aumento na frequência de seu isolamento após 3 meses de tratamento anti-TB, quando comparados àqueles que completaram menos de 3 meses de tratamento e com aqueles que ainda não haviam iniciado esse tratamento. Astekar também descreve uma maior frequência de isolamento de *Candida* spp. no escarro de pacientes refratários ao tratamento anti-TB, que apresentavam sintomatologia persistente, mesmo após 1 mês de tratamento⁴.

O aumento da frequência de isolamento na cavidade oral das espécies *não-albicans* com o prolongamento do tratamento anti-TB foi um importante achado de nosso trabalho. Embora outros trabalhos tenham verificado a frequência de *Candida não-albicans* em paciente com TB, nosso trabalho foi o primeiro a demonstrar o aumento dessa frequência em decorrência do tempo de tratamento anti-TB. Apesar da interação *C. albicans* – hospedeiro ser assintomática, a administração de antibióticos de largo espectro aumenta a magnitude da colonização de *Candida* e conseqüentemente infecções sistêmicas⁵⁰.

A espécie *não-albicans* mais isolada em nosso estudo foi a *C. tropicalis*, o que corrobora com outros estudos que também verificaram a *C. tropicalis* como a segunda espécie mais isolada na cavidade oral de pacientes com TB, após a *C. albicans*^{51,52,53,54}. O aumento da frequência de isolamento de *C. tropicalis* está ligada ao comprometimento da resposta imune e estudos têm verificado que a *C. tropicalis* promove uma maior invasão tecidual quando comparada a *C. albicans*^{55,56}. Embora historicamente a *C. albicans* seja a principal responsável pela infecção fúngica sistêmica, alguns trabalhos têm observado um grande aumento de espécies *não-albicans*, especialmente a *C. tropicalis* e *C. glabrata*^{18,57,58}, e, em alguns estudos, a *C. albicans* é isolada em menos de 50% dos casos de candidemia⁵⁹. Um fator preocupante com o aumento das infecções sistêmicas de espécies *não-albicans* é que espécies como a *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e a *C. nivariensis* são naturalmente resistentes ou apresentam padrões de susceptibilidade diminuídos a azóis, anfotericina B ou equinocandinas^{58,59}. A *C. glabrata*, por exemplo, possui resistência a grande maioria dos antifúngicos levando a uma mortalidade de 50 a 100% em pacientes com candidemia^{18,60}. Entender como a frequência desses isolados variam de acordo com o tempo de tratamento anti-TB é de grande importância, uma vez que o diagnóstico tardio das infecções fúngicas promovem pior prognóstico e aumento da mortalidade.

Pode contribuir para o aumento da colonização da *Candida* spp. o fato da TB pulmonar ser uma doença destrutiva crônica dos pulmões, propiciando uma região ideal para a manutenção do *Mycobacterium tuberculosis* e de outros microrganismos, como a *C. albicans*. A *C. albicans* pode promover complicações graves, embora seu isolamento no escarro não seja um fator clínico significativo nas doenças pulmonares em curso¹.

Da perspectiva biológica, as espécies de *Candida* e de *Mycobacteria* apresentam poucas características em comum. As *Candida* spp. são microrganismos eucariontes (fungos leveduriformes) com genoma diploide, divisão celular assexuada com possível formação de pseudohifas, enquanto as micobactérias são microrganismos procariontes, de genoma haploide e divisão por cissiparidade. A *Candida* spp. e o *M. tuberculosis* são colonizadores exclusivos dos seres humanos e 30% da população mundial está co-infectada por esses microrganismos, apesar de 90% dos infectados não apresentar sinais e sintomas clínicos das doenças²¹.

A associação sinérgica promotora do crescimento de *Candida* e *Mycobacterium tuberculosis* também foi documentada experimentalmente⁵². Muito provavelmente esse sinergismo ocorra devido ao estímulo de Receptores Padrões Associados a Patógenos (PRRs, do inglês Pattern Recognition Receptors) semelhantes no hospedeiro. Os PRRs ativados pela *Candida* e pelo *Mycobacterium* incluem receptores do tipo Toll, receptores de lectina tipo C e

receptores citosólicos tipo NOD. O reconhecimento pelo mesmo PRR desencadeia vias de sinais sobrepostas que culminam com a secreção de citocinas similares que podem romper o equilíbrio desses microrganismos²¹. Além disso, o aumento concomitante desses dois microrganismos pode ser explicado pelo desenvolvimento da leucopenia. Drogas anti-TB possuem vários efeitos colaterais, principalmente no sistema hematológico. Estudos recentes demonstraram que antibióticos como a rifampicina apresentam capacidade de realizar ligação com macromoléculas plasmáticas, formando imunocomplexos responsáveis pela lise de leucócitos e desenvolvimento do quadro de leucopenia^{5,6}. Outros estudos também verificam respostas leucopênicas semelhantes relacionadas à isoniazida, pirazinamida, etambutol, rifampicina e levofloxacina^{61,62}. Todos esses antimicrobianos são largamente utilizados para o tratamento da TB. A leucopenia, sobretudo a neutropenia, é um fator preponderante para o desenvolvimento das formas variadas de manifestações clínicas da candidíase mucocutânea, assim como para suas formas disseminadas^{21,63}.

No presente estudo, avaliamos as prevalências de *Candida* spp. em dois diferentes momentos do tratamento anti-TB. A maioria dos pacientes, 93%, estavam em tratamento do esquema básico da TB, ou seja, utilizavam rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol durante a fase intensiva e rifampicina e isoniazida durante a fase de manutenção. Somente dois participantes de nosso estudo estavam em esquema alternativo de tratamento anti-TB, que são administrados em pacientes com *Mycobacterium tuberculosis* resistentes ou com intolerância às medicações⁶⁴. Segundo Kali et al. (2013), muitos pacientes com TB pulmonar apresentam co- infecções com espécies *não-albicans* e esse aumento na frequência de isolamento de espécies *não-albicans* pode estar associada à resposta inadequada às drogas anti-TB⁵². Nossos resultados corroboram com esses achados, visto que, nos pacientes com maior tempo de tratamento anti- TB, observamos maior frequência de espécies *não-albicans*, dentre elas a *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. nivariensis*, *C. famata* e a *C. guilliermondii*.

A maior colonização por *Candida* em nosso trabalho também pode ser explicada pela observação do menor fluxo salivar nos pacientes com diagnóstico clínico de TB quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$). O fluxo salivar está diretamente associado a maior presença de colonização e infecção pela *Candida* spp.²⁶ e diversas doenças sistêmicas estão relacionadas com a diminuição do fluxo salivar, tais como: infecção pelo HIV²⁷ e diabetes²⁶. No entanto, de acordo com nossos conhecimentos, nenhum trabalho reporta redução do fluxo salivar em pacientes com TB, salvo os casos de TB extrapulmonar que acometem as glândulas salivares maiores, que cursam com redução do fluxo salivar e edema das glândulas salivares como resposta à inflamação crônica granulomatosa no tecido glandular^{65,66}.

O fluxo e a composição salivar estabelecem um equilíbrio dinâmico entre *Candida* spp. e outros membros da microbiota comensal, prevenindo o estabelecimento de candidíase no hospedeiro imunocompetente^{31,32,33}. Desta forma a composição salivar influencia diretamente no carreamento das espécies de *Candida*, por possuírem diversas citocinas com atividade antimicrobiana. Dentre essas proteínas destacamos a Lf e a Hist5, que possuem grande atividade inibitória de crescimento e de morte celular de espécies de fungos e bactérias^{28,29,30}.

A Lf é uma glicoproteína multifuncional da família das transferrinas sintetizada por neutrófilos polimorfonucleares e células epiteliais acinares^{67,68}. A Lf está presente em diversas secreções corpóreas, assim como na saliva³⁶ e possuem a função de carrear íons de ferro, restringindo sua disponibilidade necessária para o crescimento microbiano³⁹. Além do carreamento do ferro, alguns estudos apontam que a Lf é adsorvida pela superfície celular da *C. albicans*, promovendo o extravasamento proteico e formação de bolhas em sua superfície celular^{40,69,70,71,72,73}. Nosso trabalho verificou maiores concentrações de Lf na saliva de pacientes com TB, que também foram os pacientes mais colonizados pela *Candida* spp. De maneira semelhante ao nosso trabalho, Alves e colaboradores, em 2014, verificaram maiores concentrações de Lf na saliva de crianças infectadas pelo HIV, que também estiveram mais colonizados pela *Candida* spp. quando comparados às crianças sistemicamente saudáveis³⁵. Kuznetsov e colaboradores, em 2012, também mensuraram os níveis de Lf na saliva, no escarro e no sangue de pacientes com TB pulmonar e em outras patologias pulmonares, e assim como nosso estudo, verificaram maiores níveis de Lf na saliva de pacientes com TB quando comparados a indivíduos sistemicamente saudáveis. Segundo Kuznetsov, o alto nível da Lf nas secreções brônquicas pode ocorrer devido à degranulação e destruição dos neutrófilos e devido à hipersecreção de Lf nas células epiteliais glandulares, uma vez que a Lf é um importante fator de defesa inata da proteção mucosa. Ainda segundo esse mesmo estudo, a mensuração pode ser recomendada como teste laboratorial para o monitoramento do curso da TB pulmonar, uma vez que está intimamente relacionada à progressão do processo inflamatório⁷⁴.

Tanida e colaboradores, em 2003, estudando a relação da concentração salivar da Lf com o aparecimento da candidíase, verificaram menores níveis salivares de Lf em pacientes com sinais clínicos de candidíase em relação aos pacientes sem lesão oral. Embora o presente estudo não tenha verificado pacientes com manifestações clínicas de candidíase, observamos uma correlação positiva entre os níveis salivares de Lf com a quantificação determinada pela UFC de *Candida* spp.⁷⁵

A Hist5 é um peptídeo presente na saliva com importantes propriedades antifúngicas in vitro, atuando na inibição da formação do biofilme⁷⁶ e na indicação ativa de distúrbio local e

sistêmico^{77,78}. Estudos in vitro demonstraram que as histatinas, em especial a Hist5, têm capacidade de eliminar a *C. albicans* de maneira dose dependente^{43,79}. Em resumo, sua atuação antifúngica se deve a diminuição metabólica celular das *Candida* spp.^{43,78}, além de atuar na morte celular pela produção de espécies reativas de oxigênio⁸⁰. Não encontramos diferença nos níveis salivares de Hist5 em relação ao diagnóstico clínico de TB e ao tempo de tratamento anti- TB. Da mesma forma, não encontramos qualquer associação entre as concentrações salivares de Hist5 e o carregamento de *Candida* spp, muito embora, Sugimoto e colaboradores, em 2006, utilizando-se de regressão múltipla linear, verificaram diminuição dos níveis salivares de Hist5 em pacientes com elevada colonização por *Candida* spp^{34,81}. Da mesma maneira, Khan e colaboradores, em 2013, e Torres e colaboradores, em 2008, verificaram diminuição nos níveis salivares de Hist5 entre os pacientes infectados pelo HIV e consequentemente, associaram essa redução à maior prevalência de *Candida* spp.^{34,42} Com base em nosso conhecimento, nenhum estudo verificou os níveis salivares de Hist5 em pacientes com TB, no entanto, destacamos que os pacientes com TB apresentaram carregamento e prevalência de *Candida* spp., muitas vezes superiores aos pacientes infectados pelo HIV e que a manutenção dos níveis da Hist5 em pacientes com TB sugere que sua diminuição em pacientes infectados pelo HIV esteja relacionado à progressão da AIDS e não propriamente com o maior carregamento de *Candida* spp.

No presente estudo, verificamos uma associação positiva entre os níveis salivares de Hist5 e Lf e a idade dos participantes, tais resultados também foram encontrados por Sugimoto e colaboradores, em 2006, que verificaram níveis aumentados de Hist5 em pacientes com mais de 85 anos⁸¹ e por Ferreira et al. (2015) que verificou uma maior concentração de Lf salivar em pacientes com mais de 50 anos⁸². No entanto, o estudo de Dodds; Johnson; Yeh, em 2000, verifica uma redução dos níveis de Hist5 entre os pacientes idosos, associando esse achado com a maior probabilidade de desenvolvimento de candidíase nesses pacientes⁸³. Assim como o presente trabalho, diversos estudos não encontraram associação dos níveis salivares de Lf e da Hist5 com o sexo dos participantes^{36,75,81,82}.

Apesar da conhecida atividade antifúngica da Lf e da Hist5, não foi possível correlacionar seus níveis salivares com o aumento do carregamento da *Candida* spp. Porém, relatamos o aumento das concentrações salivares de Lf em pacientes com TB, este aumento parece estar mais associado com o estado inflamatório da doença do que com a presença de *Candida* spp.

O presente estudo contribuiu com a observação que o diagnóstico clínico de TB e o tempo de tratamento anti-TB estão associados ao maior carregamento e prevalência de diferentes

espécies de *Candida*. O aumento da prevalência e quantificação de *Candida* isolada de paciente com TB atenta para o maior risco de lesões orais e disseminações sistêmicas nesses pacientes, uma vez que a *Candida* comensal da cavidade oral se torna patogênica quando ocorre mudança na interação entre a levedura e o hospedeiro. Esses resultados se tornam mais importantes quando verificamos que a TB tem maior incidência em pacientes imunocomprometidos, e, portanto, mais susceptíveis às infecções fúngicas.

6. CONCLUSÕES

Concluimos com esse trabalho que:

- Pacientes com TB apresentam maior contagem de UFC de *Candida* spp, quando comparados aos pacientes sistemicamente saudáveis.
- O tratamento anti-TB, após 120 dias, acarreta em um aumento adicional da contagem de UFC de *Candida* spp. em pacientes com TB.
- A frequência de isolados de *C. não-albicans* é maior em paciente com TB, quando comparados aos pacientes sistemicamente saudáveis.
- O tratamento anti-TB, após 120 dias, proporciona um aumento adicional na frequência de isolamento de *C. não-albicans* em pacientes com TB.
- A colonização pela *C. tropicalis* é maior em pacientes com TB, sobretudo após 120 de tratamento anti-TB.
- Os níveis salivares de Lf estão aumentados em paciente com TB, sobretudo após 120 dias do tratamento anti-TB.
- Os níveis salivares de Lf se correlacionou positivamente com a contagem de UFC na cavidade oral dos participantes da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Latha R, Sasikala R, Muruganandam N, Babu V. Study on the shifting patterns of non-*Candida albicans* *Candida* in lower respiratory tract infections and evaluation of the CHROMagar in identification of the *Candida* species. J Microbiol Biotech Res. 2011; 1:113- 9.
2. Chen XH, Gao YC, Zhang Y, Tang ZH, Yu YS, Zang GQ. Tuberculosis infection might increase the risk of invasive candidiases in immunocompetent patient. Rev Inst Med Trop SaoPaulo. 2015; 57(3):273-5.
3. Shiboski CH, Chen H, Ghannoum MA, Komarow L, Evans S, Mukherjee PK, Isham N, Katzenstein D, Asmelash A, Omozoarhe AE, Gengiah S, Allen R, Tripathy S, Swindells S. AIDS clinical trials group network and Oral HIV/AIDS research alliance. Role of oral candidiasis in TB and HIV Co-Infection: AIDS Clinical Trial Group Protocol A5253. Int J Tuberc Lung Dis. 2014;18:682-8.
4. Astekar M, Bhatiya PS, Sowmya GV. Prevalence and Characterization of Opportunistic Candidal Infections among Patients with Pulmonary Tuberculosis. J Oral Maxillofac Pathol. 2016; 20(2):183-9.
5. De Vriese AS, Robbrecht DL, Vanholder RC. Rifampicin-Associated Acute Renal Failure: Pathophysiologic, Immunologic and Clinical Features. Am J Kidney Dis 1998; 31:108-15.
6. Rekha VV, Santha T, Jawahar MS. Rifampicin Induced Renal Toxicity During Retreatment Of Patients With Pulmonary Tuberculosis. J Assoc Physicians India 2005;53:811-3.
7. Tuberculosis. World Health Organization, 2020 [citado 31 julho 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.
8. Brasil. Boletim Epidemiológico de Tuberculose da Secretaria de Vigilância em Saúde, 2020 [citado 31 julho 2020]. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/marco/24/Boletim-tuberculose-2020-marcas--1-.pdf>.
9. Castelo AF. II consenso brasileiro de tuberculose: diretrizes brasileiras para tuberculose 2004.J. Bras. Pneumol. 2004; 30(Supl. 1):S2-S56. 9.
10. Fontalvo DM, Jiménez Borré G, Gómez Camargo D, Chalavé Jiménez N, Bellido Rodríguez J, Cuadrado Cano B, Navarro Gómez S. Tuberculosis pulmonary and Candidiasis Co-Infection Present In A Previously Healthy Patient. Colomb Med (Cali). 2016; 47(2):105-8.

11. Mortazavi, Hamed, et al. Pulmonary Fungal Co-Infection Prevalence among Iranian Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sains Malaysiana*. 2019; 48(12): 2717-2725.
12. Najeeb MAB, Mahantesh BN. Prevalence of fungi as opportunistic pathogens in active and post-treated pulmonary tuberculosis cases-A comparative study. *EC Microbiology*. 2019;15(2):153-157.
13. Ochieng W, Wanzala P, Bii C, Oishi I, Ichimura H, Lihana R, Okoth FA. Tuberculosis and oral *Candida* species surveillance in HIV infected individuals in northern Kenya, and the implications on tuberculin skin test screening for DOPT-P. *East African Medical Journal*. 2005;82(12): 609.
14. Nascimento MC. Medicamentos, comunicação e cultura. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2005; 10:179-93.
15. Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000*. 1996; 10:45-78.
16. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC Lesões fúngicas e protozoárias. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Patologia oral e maxillofacial*. Elsevier: Rio de Janeiro; 2016.
17. Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in allogeneic blood and marrow transplant recipients: evolution of risk factors after the adoption of prophylactic fluconazole. *J Infect Dis*. 2000; 181:309-16.
18. Colombo, AL *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis*, Salvador, v. 17, n. 3, p. 283-312, jun. 2013 [citado 30 julho 2020]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141386702013000300001&lng=es&nrm=iso.
19. Williams, D, Lewis, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 3:1 DOI:10.3402/jom.v3i0.5771. 28 jan. 2011 [citado em 01 agosto 2020].
20. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies. *Front Microbiol*. 2015;6:1391. Publicado 17 Dez. 2015 [citado 31 julho 2020]. DOI:10.3389/fmicb.2015.01391
21. Robinson RT, Huppler AR. The goldilocks model of immune symbiosis with mycobacteria and *Candida* colonizers. *Cytokine*. 2017; 97:49-65.
22. Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Sool DR. Natural Defenses Against *Candida* Colonization Breakdown In The Oral Cavities Of The Elderly. *J Dent Res*. 1999; 78:857-68.

23. Vargas KG, Joly S. Carriage frequency, intensity of carriage, and strains of oral yeast species vary in the progression to oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive individuals. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:341-50.
24. Fidel PL Jr. *Candida*-Host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res.* 2006; 19:80-4.
25. Blijlevens NM, Donnelly JP, de Pauw BE. Impaired gut function as risk factor for invasive candidiasis in neutropenic patients. *Br J Haematol.* 2002; 117:259–64.
26. Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. *Curr Med Mycol.* 2016 Jun;2(2):1-7.
27. Sharma G, Pai K, Suhas S, Ramapuram J, Doshi D, Anup N. Oral manifestations in HIV/AIDS-infected patients from India. *Oral Dis.* 2006;12:537–42.
28. Mackay BJ, Denepitiya L, Iacono VJ, Krost SB, Pollock JJ. Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1984; 44: 695–701.
29. Schekels LC, Veerman EC, Amerogen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6 (2): 161-175.
30. Gusman H, Travis J, Helmerhorst EJ, Potempa J, Troxler RF, Oppenheim FG. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infect Immun.* 2001;69:1402–1408.
31. Odds FC, Davidson AD, Jacobsen MD, Tavanti A, Whyte JA, Kibbler CC, Ellis DH, Maiden MC, Shaw DJ, Gow NA. *Candida albicans* strain maintenance, replacement, and microvariation demonstrated by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3647-58.
32. De Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17:729- 59.
33. Vargas LOS, López NGO, Villar M, Moragues MD, Aguirre JM, Cruz MC, Ribot JLL, Cepeda LAG, Quindós G. Oral *Candida* isolates colonizing or infecting human immunodeficiency virus-infected and healthy persons in Mexico. *J Clin Microb.* 2005;43(8):4159-62.
34. Torres SR, Garzina-Demo A, Meiller TF, Meeks V, Jabra-Rizk MA. Salivary Histatin-5 and Oral Fungal Colonization in HIV+ Individuals. *Mycoses.* 2008; 52: 11–15.
35. Alves TP, Simões AC, Soares RM, Moreno DS, Portela MB, Castro GF. Salivary Lactoferrin in HIV-Infected Children: Correlation with *Candida albicans* carriage, oral manifestations, HIV infection and its antifungal activity. *Arch Oral Biol.* 2014; 59 (8):775-82.

36. Lourenço AG, Nakao C, Machado AA, Motta AC, Tonani L, Candido RC, Komesu MC. Lactoferrin, A Marker For Periodontal Disease. *Curr HIV Res.* 2013; 11(3):220-5.
37. Ozdemir B, Ozcan G, Karaduman B, Teoman AI, Ayhan E, Ozer N, Us D. Lactoferrin in Gingival Crevicular Fluid and Peripheral Blood during Experimental Gingivitis. *Eur J Dent.* 2009; 3:16-23.
38. Pierce A, Legrand D, Mazurier J. La lactoferrine: une protéine multifonctionnelle. *Med Sci (Paris), Paris.* 2009; 25(4):361-369.
39. Kontoghiorghes GJ, Weinberg ED. Iron: mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches. *Blood Rev.* 1995; 9:33-45.
40. Anil S, Samaranayake LP. Impact of lysozyme and lactoferrin on oral *Candida* isolates exposed to polyene antimycotics and fluconazole. *Oral Dis.* 2002; 8:199–206.
41. Curvelo JAR, Moraes DC, Anjos CAD, Portela MB, Soares RMA. Histatin 5 and human lactoferrin inhibit biofilm formation of a fluconazole resistant *Candida albicans* clinical isolate. *An Acad Bras Cienc.* 2019; 91(1):E20180045.
42. Khan SA, Fidel PL Jr, Thunayyan AA, Varlotta S, Meiller TF, Jabra-Rizk MA. Impaired Histatin-5 Levels and Salivary Antimicrobial Activity against *C. albicans* in HIV Infected Individuals. *J AIDS Clin Res.* 2013; 4(193).
43. Helmerhorst EJ, Van't Hof W, Veerman ECI, Simoons-Smit AM, Nieuw Amerongen AV. Synthetic Histatin Analogs With Broad-Spectrum Antimicrobial Activity. *Biochem J.* 1997; 326:39-45.
44. Periodontal screening and recording training program kit. Chicago: American Dental Association and American Academy of Periodontics; 1992.
45. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *J Oral Pathol* 1986;15:386–388.
46. Brasil. Boletim Da Tuberculose. Available: https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/ssaude/pdf/d-casos_tuberculose.pdf. Acesso em 02/03/2020.
47. Vargas-Montiel, Vargas-Camino N, Molero M, Urbina M, Urdaneta A. *Candida* in biological human samples. *REV INVEST CLIN.* 1999;40:245-55.
48. Lourenço AG, Ribeiro AERA, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, Komesu MC. Oral *Candida* Spp Carriage and Periodontal Diseases in HIV-Infected Patients in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2017; 1;59:E29.
49. Querido SM, Back-Brito GN, Dos Santos SS, Leão MV, Koga-Ito CY, Jorge AO. Opportunistic microorganisms in patients undergoing antibiotic therapy for pulmonary tuberculosis. *Braz J Microbiol.* 2011; 42(4): 1321-8.

50. Gutierrez D, Weinstock A, Antharam VC, Gu H, Jasbi P, Shi X, Dirks B, Krajmalnik-Brown R, Maldonado J, Guinan J, Thangamani S. Antibiotic-induced gut metabolome and microbiome alterations increase the susceptibility to *Candida albicans* colonization in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol.* 2020; 96(1):187.
51. Naz SA, Tariq P. Study of the trend in prevalence of opportunistic *Candida* coinfections among patients of pulmonary tuberculosis. *Pak J Bot.* 2004;36:857–62.
52. Kali A, Charles MP, Noyal MJ, Sivaraman U, Kumar S, Easow JM. Prevalence of *Candida* Co-Infection in Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Australia's Med J.* 2013; 316(8):387-91.
53. Ndukwu CB, Mbakwem-Aniebo C, Frank-Peterside N. Prevalence of *Candida* Co-Infections among Patients with Pulmonary Tuberculosis in Emuoha, Rivers State, Nigeria. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences.* 2016; 11(5):60-63.
54. Kumar VG, Latha R, Vedhagiri K, Sathiamoorthi T, Jayarani G, Sasikala R, Selvin J, Natarajaseenivasan K. Phospholipase C, Proteinase And Hemolytic Activities Of *Candida* Spp. Isolated From Pulmonary Tuberculosis Patients. *Journal De Mycologie Médicale.* 2009;19:3-10.
55. Roilides EE, Farmaki J, Evdoridou A, Francesconi M, Kasai J, Filioti et al. *Candida tropicalis* in a neonatal intensive care unit: epidemiologic and molecular analysis of an outbreak of infection with an uncommon neonatal pathogen, *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(2):735–741.
56. Chen J, Chen J, Lane S, Liu H. A conserved mitogen activated protein kinase pathway is required for mating in *Candida albicans*, *Mol. Microbiol.* 2002; 46(5) 1335–1344.
57. Jain SK, Agrawal RL, Sharma DA, Agrawal MM. *Candida* in pulmonary tuberculosis. *Journal of Postgraduate Medicine.* 1982; 28(1):24-29.
58. Megri Y, Arastehfar A, Boekhout T, Daneshnia F, Hörtnagl C, Sartori B, Hafez A, Pan W, Lass-Flörl C, Hamrioui B. *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020; 9(1):50.
59. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J Mol Diagn.* 2011;13(1):12-22.
60. Medeiros MAP, Melo APV, Bento AO, Souza LBFC, Neto FAB, Garcia JB, Zuza-Alves DL, Francisco EC, Melo ASA, Chaves GM. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. *PLoS One.* 2019; 14(8):E0221033.
61. Lin FS, Wu MY, Tu WJ, Pan HQ, Zheng J, Shi JW, Fei ZT, Zhang RM, Yan WG, Shang MQ, Zheng Q, Wang MJ, Zhang X. A cross-sectional and follow-up study of leukopenia in tuberculosis patients: prevalence, risk factors and impact of anti-tuberculosis treatment. *J Thorac Dis.* 2015; 7:2234-42

62. Lee SW, Lee SM, Yoo CG. Leukopenia during treatment with first-line anti-tuberculosis medication. *Respiration*. 2005; 72:660-1.
63. Trautwein-Weidner K, Gladiator A, Nur S, Diethelm P, Leibund S, Gut- Landmann S. IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal Immunol*. 2015; 8:221–31.
64. Rabahi M, Fouad et al. Tuberculosis Treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2017; 43(6): 472-486.
65. Babazade F, Mortazavi H, Jalalian H. Parotid tuberculosis: a forgotten suspicion (a case reportand literature review). *Int J Dermatol*. 2012; 51(5):588-91.
66. Hamdan AL, Hadi U, Shabb N. Tuberculous parotitis: a forgotten entity. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 126(5):581-2
67. Lonnerdal B, Lyster S. Lactoferrin: molecular structure and biological function,” *Annual Review of Nutrition*.1995; 15:93–110.
68. Kanyshkova TG, Buneva VN, Nevinsky GA. Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry*. 2001; 66:1-7.
69. Valenti P, Visca P, Antonini G, Orsi N. Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells. *FEMS Microbiol. Lett*. 1986; 33:271-275.
70. Nikawa H, Samarayanake LP, Hamada T. Modulation of the anti-*Candida* activity of apo- lactoferrin by dietary sucrose and tunicamycin in vitro. *Arch. Oral Biol*. 1995; 40:581-584.
71. Nikawa H, Samarayanake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch. Oral Biol*. 1993; 38:1057-1063.
72. Xu YY, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Nikawa H. In vitro susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. *Med Mycol*. 1999; 37:35-41.
73. Susana A, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2009; 33:301E1-E8.
74. Kuznetsov IA, Rasulov MM, Iskakova JT. Iron-Containing Proteins Lactoferrin and Ferritin in Biological Media of Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Yulleten’ Eksperimental Noi Biologii i Meditsiny*. 2011; 154 (11) 572-576.
75. Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, Osaki T. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral PatholMed*. 2003; 32(10):586-94.

76. Moffa EB, Mussi MCM, Xiao Y, Garrido SS, Machado MAAM, Giampaolo ET, Siqueira WL. Histatin 5 inhibits adhesion of *C. albicans* to reconstructed human oral epithelium. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6:885.
77. Burbelo PD, Bayat A, Lebovitz EE, Iadarola MJ. New technologies for studying the complexity of oral diseases. *Oral Dis*. 2012; 18: 121–126.
78. Komatsu T, Kobayashi K, Helmerhorst E, Oppenheim F, Chang-II Lee EM. Avaliação Direta Da Propriedade Antioxidante Da Histatina Salivar. *Jornal de Bioquímica Clínica e Nutrição*. 2019; 65 (3), 217-222.
79. Komatsu T, Kobayashi K, Helmerhorst E, Oppenheim F, Chang-II Lee EM. Avaliação Direta Da Propriedade Antioxidante Da Histatina Salivar. *Jornal de Bioquímica Clínica e Nutrição*. 2019; 65 (3), 217-222.
80. Cody BB, McNabb DS, Pinto I. Abordagem de genoma completo para a compreensão do mecanismo de ação de um peptídeo derivado de histatina 5. *Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia*. 2020; 64(3) E01698-19.
81. Sugimoto J, Kanehira T, Mizugai H, Chiba I, Morita M. Relationship Between Salivary Histatin 5 Levels And *Candida* CFU Counts In Healthy Elderly. *Gerodontology*. 2006; 23(3):164-9.
82. Ferreira SM, Gonçalves LS, Torres SR, Nogueira SA, Meiller TF. Lactoferrin levels in gingival crevicular fluid and saliva of HIV-infected patients with chronic periodontitis. *J Investig Clin Dent*. 2015; 6(1):16-24.
83. Johnson DA, Yeh CK, Dodds MW. Effect of donor age on the concentrations of histatins in human parotid and submandibular/sublingual saliva. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(9):731-40.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEX-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA).**

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato


Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

<u>DADOS PESSOAIS</u>	
Nome: Thainá Nasato Fioravanti	
Nº USP: 10294237	Período: 9º período
Telefone de contato: (19) 99683-100	E-mail USP: thaina_nf@usp.br
<u>INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO</u>	
Nome do Orientador(a): Alan Grupioni Lourenço	
Departamento: DBBO	
Área de conhecimento: Patologia	
Subárea: Doenças Infeciosas	
<u>MODALIDADE</u>	
Modalidade:	
Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional	
<u>ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)</u>	

Eu, Prof(a). Dr(a). Alan Grupioni Lourenço, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Thainá Nasato Fioravanti



Alan Grupioni Lourenço

