

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

MARCO AURÉLIO FIFOLATO

**Relação da prevalência, carga microbiana de espécies de *Candida* e grau de estomatite
relacionada à prótese com risco cardíaco.**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÁUDIA HELENA LOVATO DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO
2024

MARCO AURÉLIO FIFOLATO

**Relação da prevalência, carga microbiana de espécies de *Candida* e grau de estomatite
relacionada à prótese com risco cardíaco.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÁUDIA HELENA LOVATO DA SILVA

RIBEIRÃO PRETO

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Fifolato, Marco Aurélio

Relação da prevalência, carga microbiana de espécies de *Candida* e grau de estomatite relacionada à prótese com risco cardíaco.

39p.: il.; 30cm

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

Orientador(a): Silva-Lovato, Cláudia Helena.

1. Prótese total; 2. *Candida* spp.; 3. ERP; 4. Suscetibilidade; 5. Antifúngicos;
6. Risco cardiovascular.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** por me conceder saúde, determinação e sabedoria para enfrentar os desafios ao longo deste caminho.

Aos meus pais, **Marco Justino Fifolato** e **Márcia Regina Menegueti Fifolato**, pela inestimável dedicação, apoio incondicional e incentivo constante. Vocês são meu exemplo de perseverança e amor, e sem vocês, nada disso seria possível.

À minha namorada, **Natália Carvalho de Paula**, por sua compreensão, carinho e incentivo em todos os momentos. Sua presença trouxe conforto nos momentos difíceis e alegria nos momentos de conquista. Você é minha inspiração.

Aos meus amigos, pelo apoio, compreensão e por estarem ao meu lado nos momentos de alegria e dificuldade. Vocês tornaram essa jornada mais leve.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**, por proporcionar um ambiente acadêmico estimulante e pelos recursos disponibilizados que contribuíram para o enriquecimento da minha formação profissional.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento (Nº 2022/04995-6) deste trabalho.

À **Viviani de Cássia Oliveira** e **Ana Paula Macedo**, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, durante a etapa laboratorial e processamento da estatística.

À **Adriana Barbosa Ribeiro** e **Lorena Mosconi Clemente**, pela ajuda e dedicação para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora **Profa. Dra. Cláudia Helena Lovato da Silva**, cuja orientação dedicada e expertise na área foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Desde o início sua orientação precisa, paciência e apoio foram uma fonte constante de inspiração e motivação para mim. Seu compromisso com a excelência acadêmica e seu profissionalismo exemplar foram verdadeiramente inspiradores. Fica aqui registrado meu respeito e admiração pela senhora e por todos os conhecimentos compartilhados, muito obrigado.

RESUMO

Fifolato, Marco Aurélio. **Relação da prevalência, carga microbiana de espécies de *Candida* e grau de estomatite relacionada à prótese com risco cardíaco.** 2024. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Próteses dentárias totais removíveis são comumente empregadas para reabilitação de indivíduos desdentados totais. Entretanto, a superfície da resina acrílica utilizada na confecção pode favorecer a formação de biofilme associado às espécies de *Candida* e desencadear inflamações locais, sendo a mais prevalente a estomatite relacionada à prótese (ERP). A literatura indica que o edentulismo e a presença de inflamação estão relacionados com doenças sistêmicas, em especial alterações cardíacas. Objetivo: Assim, o objetivo do estudo foi identificar, avaliar a prevalência e quantificar a carga microbiana de espécies de *Candida* em indivíduos desdentados totais sem e com ERP e, ainda, avaliar o risco cardíaco de indivíduos com e sem ERP. A história médica e odontológica e dados sociodemográficos foram coletados. Para as análises microbiológicas, biofilme da prótese total superior e do palato foi coletado, semeado em meio de cultura específico ChromAgar-*Candida* para identificação, prevalência e quantificação por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A confirmação da identificação presuntiva foi obtida por meio do ensaio de Reação de Cadeia Polimerase (PCR). O risco cardiovascular foi avaliado por meio da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). As características qualitativas sociodemográficas dos participantes dos grupos com escores 0, 1 e 2 foram apresentadas em tabela. A concordância entre a identificação presuntiva (CHM) e o PCR foi aferida pelo Teste de Kappa. A avaliação da prevalência (n indivíduos) das espécies de *Candida* por sítio e escore de ERP foi apresentado em figura. A comparação da carga microbiana em função do grau de inflamação (escores 0, 1 e 2) e sítio (prótese e palato) foi realizada para cada espécie de *Candida* pelo teste de Modelo linear generalizado com pós teste de Wald. A análise da suscetibilidade antifúngica das amostras de *Candida* spp. isoladas nos grupos com escores 0, 1 e 2 foi realizada por meio do Teste de Qui-quadrado de Pearson. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) foi analisada pelo ANOVA One-way e pós teste de Tukey com ajuste de Bonferroni, teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Foi adotado nível de significância de 5%. Os resultados indicaram que *C. albicans* é a espécie mais frequentemente encontrada no biofilme da prótese e no palato, tanto de indivíduos com ERP como de indivíduos saudáveis. O método cromogênico na identificação de *Candida* spp. é eficaz/útil. A indicação de nistatina para o tratamento da ERP parece ser eficaz uma vez que todas as cepas foram sensíveis a este antifúngico. Os indivíduos sem ERP apresentam um menor risco cardiovascular se comparado com os indivíduos com a inflamação.

Palavras-chave: 1) Prótese total; 2) *Candida* spp.; 3) ERP; 4) Suscetibilidade; 5) Antifúngicos; 6) Risco cardiovascular.

ABSTRACT

Fifolato, Marco Aurélio. **Relationship of prevalence, microbial load of *Candida* species and degree of prothesis-related stomatitis with cardiac risk.** 2024. 39p. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Removable complete dentures are commonly used for the rehabilitation of fully edentulous individuals. However, the surface of the acrylic resin used in their fabrication may promote the formation of biofilm associated with *Candida* species and trigger local inflammations, with the most prevalent being denture stomatitis (DS). The literature indicates that edentulism and the presence of inflammation are related to systemic diseases, especially cardiac alterations. Objective: Thus, the aim of the study was to identify, assess the prevalence, and quantify the microbial load of *Candida* species in complete edentulous individuals with and without DS, and to evaluate the cardiac risk of individuals with and without DS. Medical and dental history and sociodemographic data were collected. For microbiological analyses, biofilm from the upper complete denture and palate was collected, seeded on specific CHROMAgar-*Candida* culture medium for identification, prevalence, and quantification through colony-forming unit (CFU) counting. Confirmation of presumptive identification was obtained through the Polymerase Chain Reaction (PCR) assay. Cardiovascular risk was assessed through heart rate variability (HRV). The sociodemographic qualitative characteristics of participants in the groups with scores 0, 1, and 2 were presented in a table. Concordance between presumptive identification (CHM) and PCR was assessed by the Kappa test. The prevalence assessment (number of individuals) of *Candida* species by site and DS score was presented in a figure. Comparison of microbial load according to the degree of inflammation (scores 0, 1, and 2) and site (denture and palate) was performed for each *Candida* species using the Generalized Linear Model test with Wald post hoc test. Antifungal susceptibility analysis of *Candida* spp. samples isolated in groups with scores 0, 1, and 2 was performed using Pearson's Chi-square test. Heart rate variability (HRV) was analyzed using One-way ANOVA and Tukey's post hoc test with Bonferroni adjustment, Kruskal-Wallis test, and Dunn's post hoc test. A significance level of 5% was adopted. The results indicated that *C. albicans* is the most frequently found species in denture biofilm and palate, in both individuals with DS and healthy individuals. The chromogenic method for *Candida* spp. identification is effective/useful. Nystatin appears to be an effective treatment for DS as all strains were sensitive to this antifungal. Individuals without DS present a lower cardiovascular risk compared to individuals with inflammation.

Keywords: 1) Complete denture; 2) *Candida* spp.; 3) PCR; 4) Susceptibility; 5) Antifungals 6) Cardiovascular risk.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. PROPOSIÇÃO	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Seleção dos indivíduos	12
3.1.1 Identificação e classificação da estomatite relacionada à prótese	12
3.2 Identificação presuntiva, prevalência e carga microbiana de <i>Candida</i> spp.....	14
3.3 Confirmação da identificação presuntiva por meio do PCR	15
3.4 Análise da suscetibilidade antifúngica	17
3.5 Variabilidade da frequência cardíaca	18
3.6 Análise dos dados	19
4. RESULTADOS	21
4.1 Dados sociodemográficos	22
4.2 Identificação presuntiva, confirmação por PCR, prevalência e carga microbiana de <i>Candida</i> spp.	22
4.3 Análise da suscetibilidade antifúngica das amostras de <i>Candida</i> spp. Isoladas	27
4.4 Análise da variabilidade cardíaca	29
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços da odontologia preventiva, o edentulismo continua sendo um problema de saúde pública, sendo prevalente entre adultos de 65 anos ou mais em diversos países (Emami *et al.*, 2013; Petersen *et al.*, 2005*et al.*). No Brasil, 11% da população apresenta mais de 60 anos, sendo que 38,3% necessitam de prótese total convencional em uma arcada ou em ambas (Ministério da Saúde, 2011; Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014).

As próteses dentárias removíveis em resina acrílica ainda são comumente empregadas para o restabelecimento da estética e função de edêntulos totais (Regis *et al.*, 2013). No entanto, a resina acrílica, pelas suas características, favorece a formação de biofilme, o qual é caracterizado pela presença de diferentes espécies de fungos e bactérias envoltos em uma matriz de glicoproteínas salivares, imunoglobulinas, células epiteliais descamadas e detritos orais (Shay, 2000). Em indivíduos saudáveis os microrganismos se relacionam de forma comensal, porém, frente a alterações imunológicas e/ou ambientais do hospedeiro pode ocorrer o desenvolvimento de infecções locais como a estomatite relacionada à prótese (ERP) (Hannah *et al.*, 2017; Scannapieco, Cantos, 2016).

A ERP é uma inflamação crônica associada ao uso de próteses mal adaptadas, uso contínuo de prótese, hipossalivação, má higiene e principalmente, à grande carga microbiana de *Candida spp.* (Araújo *et al.*, 2021; Badaró *et al.*, 2017; Badaró, *et al.*, 2020; Kabawat *et al.*, 2014; Kossioni, 2011; Kulak-Ozkan *et al.*, 2002; Mousa *et al.*, 2020). Quando descartada a causa da estomatite por trauma e desadaptação da prótese sobre os tecidos de assentamento, o tratamento pode incluir métodos conservadores com a instituição de protocolos de higiene (Ribeiro *et al.*, 2019; Badaró *et al.*, 2020; Araújo *et al.*, 2021) e/ou a prescrição de antifúngicos (Maciag J *et al.*, 2017; Osmenda G *et al.*, 2017). Com relação aos protocolos de higiene, eles precisam ser efetivos, porém, para que proporcionem os resultados esperados, é de extrema importância à adesão do paciente ao mesmo, empregando o protocolo indicado de forma correta e rotineira, condição que nem sempre acontece (Sharma *et al.*, 2020). A prescrição de antifúngicos tem como objetivo o tratamento imediato da inflamação e deve seguir a posologia e tempo indicados. A indicação de antifúngico para o tratamento das infecções por *Candida spp.* deve ser realizada com base em sua química, ação antifúngica e gravidade. Entre os polienos, que interagem com ergosterol nas membranas fúngicas alterando sua permeabilidade, a anfotericina B é muito utilizada em casos de infecções mais graves. Entre os triazóis, que inibem a biossíntese do ergosterol fúngico, fluconazol,

itraconazol e cetoconazol são usados para tratar vários tipos de fungos. Caspofungina, anidulofungina e micafungina representam os antifúngicos de equinocandina, inibidores específicos de polímeros de -glucano nas paredes celulares dos fungos. Flucitosina inibe a síntese de DNA e RNA em leveduras patogênicas (*Candida* e *Cryptococcus* spp.) e seu uso ocorre em combinação com polienos ou triazóis (Sanglard; Odds, 2002).

A literatura aponta que a recidiva da doença é comum após a suspensão do tratamento, gerando a necessidade de repetições que podem levar à resistência fúngica (Figueiral *et al.*, 2015). Espécies de *Candida* não *albicans* como *C. tropicalis* e *C. glabrata*, frequentemente são encontradas em isolados clínicos da cavidade bucal e são relacionadas a uma maior gravidade da doença, principalmente em indivíduos imunossuprimidos ou imunocomprometidos com potencial de virulência, a partir do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (Demitto *et al.*, 2012), tornando o tratamento difícil, com a necessidade de trocas de medicamentos.

Ainda, fatores de virulência como aderência, formação de biofilmes e secreção de enzimas hidrolíticas favorecem a permanência dos fungos no tecido do hospedeiro e contribui para a resistência aos antifúngicos (Silva *et al.*, 2012). No entanto, ainda não está elucidado se essa resistência aos antifúngicos está correlacionada com o perfil dos pacientes que apresentam o quadro de estomatite relacionada à prótese ou se essa resistência também pode ser encontrada em pacientes saudáveis em relação à presença dessa inflamação. O fato é que, a baixa suscetibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos comumente administrados pode desencadear sub-tratamentos e expor o indivíduo a complicações sistêmicas (Smith *et al.*, 2003; Sumi *et al.*, 2002; Sumi *et al.*, 2003;).

Segundo a literatura há uma relação entre ERP, biofilme e doenças sistêmicas, uma vez que a presença do biofilme pode causar o agravamento de pneumonia aspirativa, aumentar o risco para doenças cardiovasculares, e até infecções gastrointestinais (Hannah *et al.*, 2017; Osmenda *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2022). Segundo Osmenda *et al.* (2017). A inflamação/infecção local na cavidade bucal (ERP) pode causar a produção de interleucina (IL)-6, proteína C-reativa (PCR), fator de necrose tumoral α (TNF α), e outras citocinas pró-inflamatórias, desencadeando inflamação sistêmica. Offenbacher *et al.* (2012) sugeriram que patógenos bucais invasivos desencadeiam uma resposta inflamatória sistêmica, via mediadores liberados pelo sistema cardiovascular e pelo fígado, aumentando o fator de risco dos pacientes. Embora alguns estudos tenham correlacionado a ERP e alterações cardiovasculares, essa abordagem é muito recente (Maciag *et al.*, 2017; Osmenda *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2022), e demanda maior evidência científica.

Em que pese o tratamento de escolha para estomatite relacionada à prótese ser baseado no controle e manutenção das próteses totais, conhecer a suscetibilidade das espécies de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de pacientes com ERP é necessário para os casos em que as medidas conservadoras isoladas não atingem as expectativas, havendo a necessidade de prescrição de antifúngicos. Ainda, é sabido que indivíduos com mais de 60 anos apresentam risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Como esta população é comumente usuária de próteses, é importante a realização de estudos clínicos que avaliem se a presença de diferentes espécies de *Candida* spp. e a carga microbiana associada à ERP, bem como o risco de doenças cardiovasculares, uma vez que poucos pesquisadores investigaram estas relações (Osmenda *et al.*, 2017).

2. PROPOSIÇÃO.

O objetivo do estudo foi identificar, avaliar a prevalência e quantificar a carga microbiana de espécies de *Candida* em indivíduos desdentados totais sem e com ERP e, ainda, avaliar o risco cardíaco de indivíduos com e sem ERP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Seleção dos indivíduos:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da FORP – USP (CAAE 93712418.1.0000.5419). Os participantes foram avaliados por meio de anamnese e exame clínico para verificação do estado geral de saúde e condição da cavidade bucal. Os pacientes foram informados sobre a pesquisa, e, os que demonstraram interesse em participar, foram avaliados segundo os critérios de elegibilidade, atendendo aos critérios de inclusão e exclusão. Os indivíduos que preencheram os critérios de elegibilidade receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para ciência e assinatura.

Critérios de inclusão:

Os participantes incluídos foram indivíduos de ambos os sexos, com bom estado geral de saúde, desdentados totais maxilar e mandibular, usuários de próteses totais em ambos os arcos, ou apenas da prótese total superior em bom estado para o uso, confeccionadas em resina acrílica termicamente polimerizada, e dentes de acrílico há pelo menos 12 meses.

Critérios de exclusão:

Os indivíduos com doenças crônicas não controladas como Hipertensão Arterial Crônica, Insuficiência Cardíaca, Diabete mellitus, Infarto prévio do miocárdio, e Doença de Parkinson foram excluídos. Ainda, foram excluídos indivíduos com próteses mal adaptadas, reparos, ou fraturas; indivíduos imunossuprimidos e/ou em tratamento com quimioterapia e/ou radioterapia, com uso de antibióticos, anti-inflamatórios, ou agentes antifúngicos nas últimas quatro semanas que antecederam o estudo; indivíduos com lesões na mucosa oral, tais como hiperplasia fibrosa induzida por dentadura, papilomas, ou ulcerações traumáticas associadas às bases de prótese, e com substituição das próteses em uso durante o período experimental. Também foram excluídos os indivíduos que não apresentaram crescimento de *Candida spp.*.

3.1.1 Identificação e classificação da estomatite relacionada à prótese:

Os pacientes foram inicialmente examinados por dois pesquisadores calibrados (A.B.R., L.M.C.) e clinicamente diagnosticados como saudáveis ou com estomatite relacionada à prótese. Uma vez detectada a presença ou ausência da estomatite, foram obtidas fotografias padronizadas do palato (A.B.R.) com Câmera digital Canon EOS, Objetiva Canon (EF Macro

100 mm/2:8) e Flash Circular Canon (ML3), com o foco centralizado na região da rafe mediana. As imagens foram transferidas para o computador, e dois pesquisadores cegos (C.H.S-L; H.F.O.P.), previamente calibrados, atribuíram escores, segundo a classificação de Newton modificada (Kabawat *et al.*, 2014), confirmando assim, o grau de estomatite. O mesmo procedimento foi realizado com os participantes com mucosa saudável, para confirmar a ausência de inflamação.

Cabe-nos esclarecer que o projeto proposto inicialmente sofreu alterações visando apresentar uma análise comparativa entre indivíduos distribuídos em 3 grupos, sendo um grupo sem estomatite escore 0 (controle), um grupo com ERP escore 1 (grau leve e intermediário, incluindo pacientes classificados como grau IA e IB de Newton modificado) e um grupo com ERP escore 2 (graus moderados e grave, incluindo pacientes classificados como grau II e III de Newton modificado). Para a equidade de casos com diferentes gravidades da inflamação nos grupos e maior poder de comparação entre elas, propõe-se uma categorização com 3 níveis, conforme presente na tabela 1.

Tabela 1 - Classificação de Newton modificada (Kabawat *et al.*, 2014) e Classificação proposta no estudo, sendo:

Escore Newton modificado	Características Clínicas	Escore proposto
Escore 0 (Controle)	Mucosa saudável	0 - Saudável
Escore 1 (Tipo IA)	Mucosa palatal com presença de petéquias, geralmente encontradas ao redor dos orifícios dos dutos das glândulas da mucosa do palato	1 - ERP leve e intermediária
Escore 2 (Tipo IB)	Palato com áreas localizadas de inflamação na área recoberta pela prótese total;	
Escore 3 (Tipo II)	Palato com área generalizada de inflamação envolvendo a área recoberta pela prótese total;	
Escore 4 (Tipo III)	Superfície hiperplásica do palato com inflamação da área recoberta pela prótese total.	2 - ERP moderada e grave

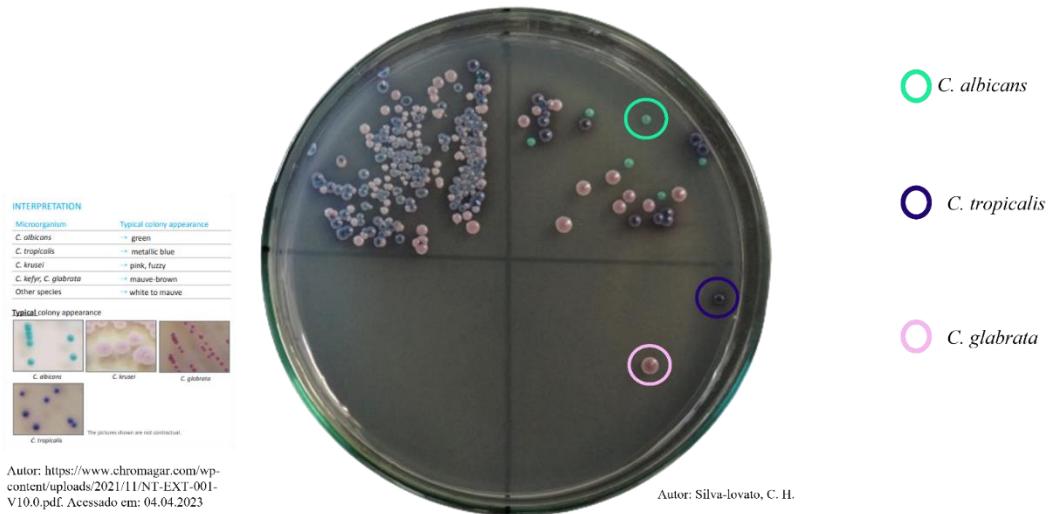
Para a caracterização da amostra, foram coletas informações sociodemográficas quanto ao sexo, idade, estado civil, escolaridade, condições de moradia e renda.

3.2 Identificação presuntiva, prevalência e carga microbiana de *Candida* spp.:

Para identificação das espécies de *Candida* por método presuntivo, biofilme foi coletado da superfície interna da prótese maxilar e do palato dos participantes. As próteses totais foram removidas da cavidade bucal e colocadas em placas de Petri, em zona asséptica, para dessorção do biofilme com escova esterilizada (Tek, Cerdas macias Johnson & Johnson do Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda., S. J.dos, SP, Brasil) e solução salina tamponada com fosfato (PBS - Phosphate-Buffered Saline) (Panzeri *et al.*, 2009). A solução obtida foi transferida para um tubo de ensaio com pérolas de vidro, com auxílio de uma pipeta (Paranhos *et al.*, 2009). Para coleta das amostras do palato, o pesquisador friccionou uma escova estéril para citologia nas regiões palatinas, onde assenta-se a prótese total (Kabawat *et al.*, 2014). Em seguida, a ponta ativa foi seccionada e armazenada em tubo estéril contendo 1,5 mL de solução PBS. As soluções com as amostras da prótese e do palato foram agitadas por 1 minuto (agitador Vortex Phoenix® – AP56, Ind. e Com. de Equipamentos Científicos Ltda., Araraquara, SP, Brasil). Em seguida 25 µL das soluções foram semeadas (10^0) e na sequência, 25 µL foram diluídos em 225 µL de PBS, obtendo-se diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} , que foram semeadas em placas de Petri com meio de cultura específico CHROMagarTM *Candida* (Becton Dickinson, Paris, França) e incubadas em estufa microbiológica (De Leo Equipamentos Laboratoriais, Porto Alegre, RS, Brasil) a 37°C durante 48h.

Após o período de incubação, o pesquisador (M.A.F.) realizou a identificação pela diferença de cor. As cepas isoladas em meio CHROMagarTM *Candida*, foram catalogadas de acordo com a orientação do fabricante do meio específico, sendo atribuídas às colônias verde-claras para *C. albicans*, roxo ou azul para *C. tropicalis* e roxo claro ou lilás para *C. glabrata* (Figura 1). As cepas isoladas foram armazenadas para posterior confirmação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para isso fez-se a seleção da colônia mais isolada no meio e com uma alça estéril, ela foi coletada e inserida no tubo de vidro com o meio TSB com 10% de glicerol. O conjunto colônia e meio foram levados à estufa a 37°C durante 24 horas. Após esse período de incubação, o meio foi redistribuído em microtubos, em duplicatas, e então, armazenado em freezer -80°C do laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Figura 1 – Identificação presuntiva de *Candida* spp..



Após a identificação, foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) para quantificação da carga microbiana e análise de prevalência das espécies. Para o cálculo de UFC/mL, foi considerada a diluição em que o número de UFC variou entre 0 e 300 colônias, empregando a fórmula: $\text{UFC/mL} = \text{No de colônias} \times 10^n/q$, sendo n: valor absoluto da diluição (0, 1, 2 ou 3); q: quantidade (mL) pipetada para cada diluição quando da semeadura (0,025).

3.3 Confirmação da identificação presuntiva por meio do PCR:

A identificação por ensaio de PCR foi realizada por meio da extração do DNA das espécies isoladas dos pacientes e do DNA das cepas comerciais de *C. albicans* (ATCC 10231), *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. glabrata* (ATCC 2001) para comparação do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição.

Para extração do DNA das leveduras, o meio de cultura Saboraud Dextrose Agar foi preparado em placas de Petri e semeado em estrias múltiplas com alíquotas de *Candida* isolada e da cepa comercial, e incubadas por 24 horas. Após o crescimento, uma colônia foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL de caldo Saborauld Dextrose. Após 24 horas, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3200 g. O pellet resultante foi ressuspensido em 500 µL 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 à 500 µg de pérolas de vidro, de 425-600 µm de diâmetro, lavadas previamente com ácido clorídrico. As amostras foram agitadas e homogeneizadas por 10 minutos e o lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL com

500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) (Sigma), os quais foram novamente agitados, por 10 minutos e centrifugados a 2000 g por 10 min. A fase aquosa obtida desta centrifugação foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL ao qual foi adicionado 1 mL de isopropanol (Sigma). Uma nova centrifugação foi realizada e o pellet resultante foi lavado com 500 µL de etanol a 70% (Sigma). 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) 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, ShimadzuBiotech, 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). Após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas a - 20°C.

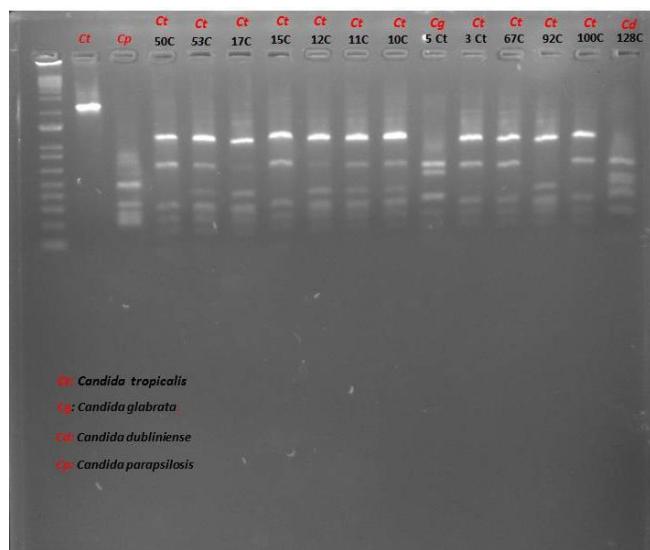
A reação de PCR foi conduzida pela amplificação do IGS2 e restrição com a enzima NlaIII IGS2 para *C. albicans* e amplificação por meio de IGS com restrição pela enzima AluI para outras espécies de *Candida*, por meio de primers descritos por Cornet *et al.* (2011). O polimorfismo das sequências após o tratamento com a enzima de restrição, vistos em gel de agarose, além da eficácia científica do teste CHROMagar*Candida*TM, definiram a confirmação da cepa. Foram utilizados os primers para a amplificação parcial do IGS (IGS2): 5'- TTAACATACAGTTGATCGGAC-3' (forward) e 5'- CTTAATCTTGAGACAAGC-3' (reverse) para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Para amplificação foi utilizado um mix contendo 10 pmol de cada primer (forward e reverse), 5 nmol de dNTP (Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), 1,5 U Taqpolymerase (Sigma-Aldrich), 10% de tampão da Taqpolymerase (Sigma-Aldrich), e 50 ng de DNA, em um volume final de 25 µL, 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 uma ciclagem final de 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, uma alíquota de 5 µL do produto do PCR foi confirmada em gel de agarose a 0,8% a 100 V por 40 minutos. O produto do PCR confirmado foi submetido à digestão por meio de enzimas de restrição para obtenção do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição necessários para a identificação das espécies de *Candida*. Para isso, foi selecionada a enzima NlaIII (New England BioLabs, Hitchin, Hertfordshire, Inglaterra) para o IGS2 ou a enzima AluI (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, California, EUA) para IGS. Para a reação de digestão foram utilizados 10 µL de produto de PCR, 1,5 U de uma das enzimas, e 2 µL do tampão em volume final de 20 µL. A mistura foi levada ao

termociclador por 90 minutos a 37°C, seguido de inativação da enzima por 20 minutos a 65°C. Os subfragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% a 80V por 80 minutos, para verificação da separação das bandas. A confirmação das espécies foi realizada por meio de comparação visual dos padrões obtidos das cepas de referência na matriz de gel com as bandas das cepas identificadas (Figura 2).

Uma vez realizada a confirmação ou não das espécies, os valores de prevalência e carga microbiana foram corrigidos de acordo com os resultados da confirmação por PCR.

Figura 2 – Matriz de gel com os padrões de bandas para a identificação de *Candida* spp.



3.4 Análise da suscetibilidade antifúngica:

A susceptibilidade foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27-A3 do CLSI, frente a diferentes antifúngicos, sendo eles: micafungina, fluconazol, nistatina e miconazol. Foi utilizado o meio de cultura RPMI-1640 (Gibco), tamponado com ácido morfolinopropansulfônico (Sigma) pH 7,0 e suplementado com 2% de glicose, como proposto pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). As suspensões das espécies de *Candida* foram ajustadas em espectrofotômetro (530 nm) obtendo a concentração final de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços e a incubação realizada a 37°C por 48h, com agitação constante. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Expert plus-ASYS®) a 490 nm. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do antifúngico, capaz de promover 50% de inibição e os resultados foram expressos em: sensível (S), sensível dependente de dose (SDD) e resistente (R).

3.5 Variabilidade da frequência cardíaca:

A coleta dos exames foi realizada pelos pesquisadores (A.B.R, L.M.C) e acompanhado pelo pesquisador (M.A.F). Os pacientes foram posicionados, confortavelmente, em posição supina e instrumentados com eletrodos adesivos e descartáveis, em ambos os braços e na perna esquerda, para monitorização eletrocardiográfica, contínua, na Derivação II de Einthoven. Para registro dos movimentos respiratórios, uma cinta elástica com sensor de estiramento foi colocada ao redor do tórax. Os sinais do eletrocardiograma e da cinta respiratória foram filtrados (100 Hz a 0,5 kHz), amplificados (BioAmp, ADInstruments, Bella Vista Australia), digitalizados (PowerLab 2/20, ADInstruments, Bella Vista, Australia), e amostrados (1000 Hz) continuamente em um IBM/PC. Durante a aquisição dos dados os indivíduos foram orientados a permanecerem acordados, com postura relaxada (evitando movimentações) e em silêncio. Após 15 minutos o registro foi, então, encerrado.

Os arquivos com os registros do eletrocardiograma foram processados por programa computacional (ECG Module for LabChart, ADInstruments, Bella Vista, Australia), o qual identificou o complexo QRS do eletrocardiograma, gerando séries temporais de sucessivos valores de iRR.

A variabilidade da frequência cardíaca é dada pela análise de um conjunto de variáveis como:

- **Variabilidade Total (Domínio do Tempo):** Após inspeção cuidadosa das séries de valores de iRR para remoção de artefatos de registro e batimentos ectópicos, as mesmas foram divididas em segmentos com 500 valores com sobreposição de 50%. Cada segmento teve seu valor médio e desvio padrão da média calculados, ou seja, o Standard Deviation of the N-N intervals (SDNN). O SDNN é o “padrão ouro” clínico que avalia a saúde cardiovascular e, em particular, a morbidade e o risco de eventos cardíacos, e maiores valores de variabilidade são favoráveis quanto ao diagnóstico do risco cardiovascular.

A raiz quadrada da média do quadrado de diferenças entre intervalos, ou seja, Root Mean Square of Successive Differences (RMSSD) também foi calculada. O RMSSD está altamente associado ao tônus vagal, ou atividade do nervo vago, que em poucas palavras é a capacidade de resposta da atividade dos órgãos internos ao estresse/estímulos, batimentos cardíacos, respiração, etc. É considerada a melhor medida para variações de curto prazo da VFC, mas ainda é uma medida robusta para análises de longo prazo, com casos de uso típicos para monitorar estresse, doença, treinamento e recuperação.

- **Análise Espectral (Domínio da Frequência):** As séries com valores de intervalo RR foram re-amostradas em 3 Hz por interpolação cúbica, para regularização do intervalo

entrebatimentos. As séries com valores interpolados de intervalo RR foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50%. A estacionariedade de cada segmento foi examinada visualmente, e aqueles com artefatos, ou transientes, foram excluídos. Cada segmento teve seu espectro calculado pela Transformada Rápida de Fourier (FFT), após janelamento do tipo Hanning. Os espectros de intervalo RR foram integrados em bandas de baixa (LF: 0,04 a 0,15 Hz) e alta frequência (HF: 0,15 a 0,50 Hz). As médias das potências dos espectros do intervalo RR, nas bandas de LF e HF foram utilizadas para cada indivíduo. A potência relativa (unidades normalizadas) dos espectros de intervalo RR, em cada banda de frequência, bem como a razão entre as potências de LF e HF (LF/HF) dos mesmos, foram determinadas (Silva *et al.*, 2017a).

- Análise Simbólica: Este método busca por padrões de alteração entre sucessivos valores de intervalo cardíaco, classifica estas alterações em classes, e quantifica a ocorrência das mesmas. Para tanto, séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de intervalo RR tiveram os valores máximos e mínimos determinados; em seguida, foram distribuídos em 6 faixas de igual magnitude. Sequências de 3 símbolos foram, então, analisadas e classificadas em 4 diferentes famílias, de acordo com o número de variações encontradas. A frequência de ocorrência de cada padrão foi analisada, e indicada, como 0V%, 1V% e 2V%. Interessam como indicadores da modulação autonômica cardiocirculatória a frequência percentual das variações do tipo 0V (simpático) e 2V (vagal) (Silva *et al.* 2017a).

- Entropia Amostral (SampEn): foi calculada a partir das séries de intervalos cardíacos (IC) com o auxílio do programa computacional JBios. Em termos práticos, a SampEn quantifica a probabilidade (logarítmica) de que padrões próximos de tamanho “m” continuarão próximos para “m+1”. Em outras palavras, dentre os padrões de tamanho “m” que são similares, a SampEn indica qual porcentagem destes continuarão similar para “m+1”, isto é, quando um ponto adicional é considerado. Alta probabilidade de os padrões continuarem próximos indica regularidade, produzindo valores baixos de entropia (Silva *et al.*, 2016, 2017b).

3.6 Análise dos dados:

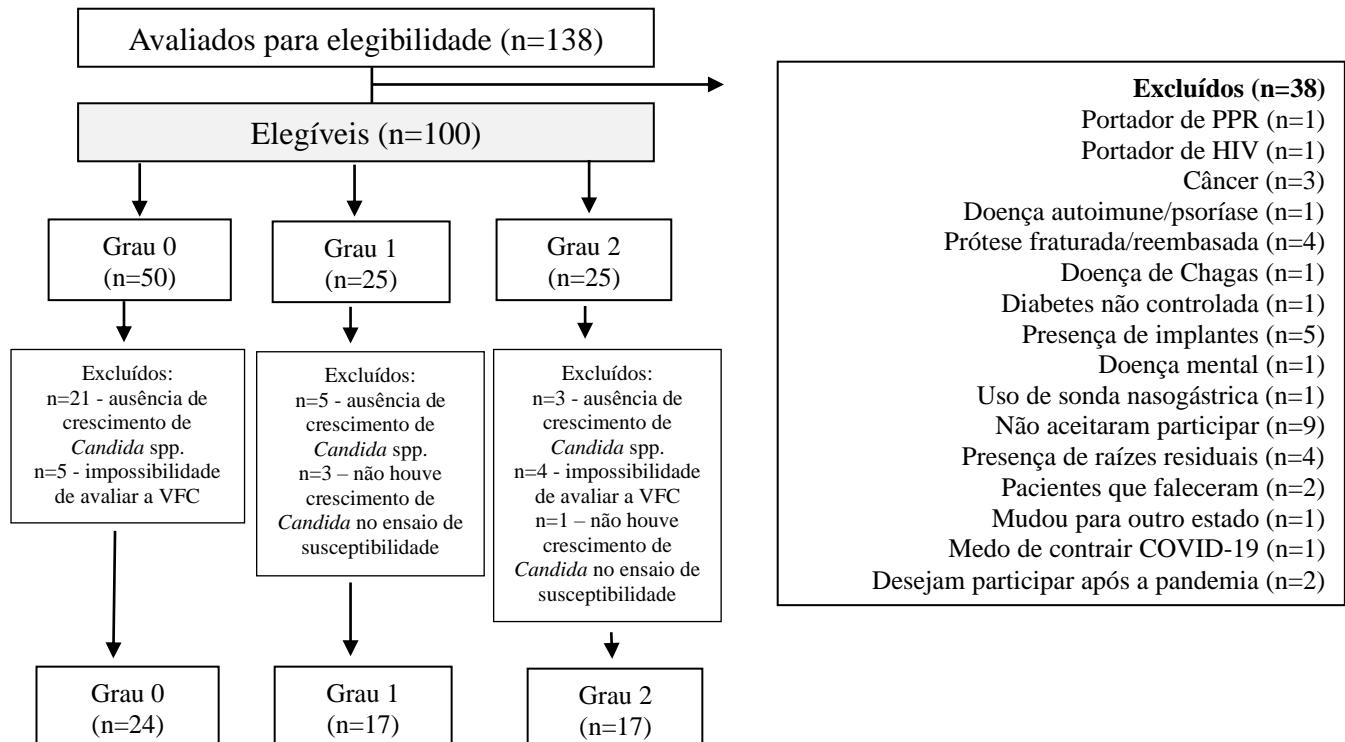
As características qualitativas sociodemográficas dos participantes dos grupos com escors 0, 1 e 2 foram apresentadas em tabela. Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância para determinação dos testes estatísticos apropriados. Para avaliação da concordância entre a identificação presuntiva (CHM) e o PCR foi aplicado o Teste de Kappa. A avaliação da prevalência (n indivíduos) das espécies de *Candida* por sítio e escore de ERP foi apresentado em figura. A comparação da carga microbiana em função do

grau de inflamação (escores 0, 1 e 2) e sítio (prótese e palato) foi realizada para cada espécie de *Candida* pelo teste de Modelo linear generalizado com pós teste de Wald. A análise da suscetibilidade antifúngica das amostras de *Candida* spp. isoladas nos grupos com escores 0, 1 e 2 foi realizada por meio do Teste de Qui-quadrado de Pearson. Para variabilidade da frequência cardíaca, (VFC), as condições de distribuição normal e homogênea foi aceita para Time Domian para a variável da média, no Spectral Analysis nas variáveis LFnu e HF nu e no Symbolic Dynamics na variável 1V, sendo realizado ANOVA *One-way* e pós teste de Tukey com ajuste de Bonferroni. Para as demais variáveis contínuas, foi realizado teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Foi adotado nível de significância de 5%. As análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS (SPSS 21.0, Inc, Chicago, Illinois, USA).

4. RESULTADOS.

Foram coletados dados de 100 participantes, sendo 50 sem ERP (50%) e 50 com ERP (50%); dentre os participantes com ERP, o grau intermediário (IB) foi o mais frequente ($n=17$; 17%), seguido dos graus II ($n=15$; 15%) e grau III ($n=10$, 10%), e o menos frequente foi o grau IA ($n=8$, 8%), por isso, visando equidade dos grupos, foi proposta uma nova categorização. Os pacientes com grau leve (IA) e intermediário (IB) de ERP foram classificados com o escore 1; e pacientes com grau moderado (II) e grave (III) de ERP, classificados com o escore 2. Dos 50 individuos elegíveis do escore 0, 21 foram excluídos por não apresentarem crescimento de *Candida* spp., e 5 foram excluídos pela variabilidade da frequência cardíaca, já que os exames não possibilitaram análises. Para os 25 elegíveis do escore 1, 5 foram excluídos por não apresentarem crescimento de *Candida* spp., e 3 foram excluídos pelo teste de microdiluição em caldo, no qual não houve desenvolvimento de *Candida* spp. Para os 25 elegíveis do escore 2, 4 foram excluídos pela variabilidade da frequencia cardíaca, já que os exames não possibilitaram análises, 3 foram excluídos por não apresentarem crescimento de *Candida* spp., e 1 foi excluído pelo teste de microdiluição em caldo, no qual não houve desenvolvimento de *Candida* spp. Dessa forma, os grupos ficaram da seguinte forma: $n=24$ para o escore 1, $n=17$ para escore 1 e $n=17$ para escore 2 (Figura 3).

Figura 3 - Fluxograma de acordo com STROBE.



4.1 Dados sociodemográficos:

A idade média dos participantes foi de 66,3 anos. A tabela 2 apresenta as características sociodemográficas dos três grupos. A maioria dos participantes eram do sexo feminino, casada, em convívio com familiares, com ensino fundamental completo e renda entre um e três salários mínimos.

Tabela 2 - Características qualitativas sociodemográficas dos participantes dos grupos 0, 1 e 2, de acordo com o escore de inflamação.

<i>Variável</i>	<i>Grupos (Escore de inflamação)</i>		
	0	1	2
<i>Sexo</i>			
Feminino	19 (79,2%)	13 (76,5%)	13 (76,5%)
Masculino	5 (20,8%)	4 (23,5%)	4 (23,5%)
<i>Estado civil</i>			
Solteiro	3 (12,5%)	2 (11,7%)	0 (0,0%)
Casado	8 (33,3%)	13 (76,5%)	9 (53,0%)
Divorciado	7 (29,2%)	1 (5,9%)	4 (23,5%)
Separado	1 (4,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Viúvo	5 (20,8%)	1 (5,9%)	4 (23,5%)
<i>Reside com</i>			
Sozinho	4 (16,7%)	3 (17,6%)	1 (5,9%)
Amigos	0 (0,0%)	1 (5,9%)	0 (0,0%)
Familiares	20 (83,3%)	13 (76,5%)	16 (94,1%)
<i>Grau de escolaridade</i>			
Analfabeto	1 (4,2%)	2 (11,8%)	0 (0,0%)
Ensino básico	4 (16,7%)	4 (23,5%)	2 (11,8%)
Ensino fundamental	14 (58,3%)	9 (52,9%)	9 (53,0%)
Ensino Médio	5 (20,8%)	1 (5,9%)	5 (29,3%)
Ensino superior	0 (0,0%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)
Pós-graduação	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<i>Renda</i>			
1 a 3 salários	22 (91,7%)	17 (100%)	17 (100,0%)
4 a 7 salários	2 (8,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

4.2 Identificação presuntiva, confirmação por PCR, prevalência e carga microbiana de *Candida* spp..

Por meio do método presuntivo, foram isoladas 89 amostras de *Candida* spp.. Por meio da identificação presuntiva, foram consideradas 48 amostras de *C. albicans* (54%), 19 amostras de *C. glabrata* (21,3%) e 22 amostras de *C. tropicalis* (24,7%).

Das 48 (100%) amostras inicialmente identificadas como *C. albicans* pelo método presuntivo, 40 (83,3%) foram confirmadas como *C. albicans* e 8 (16,7%) como *C. dublinienses*. Das 19 amostras (100%) identificadas presuntivamente como *C. glabrata*, 15 (78,9%) foram confirmadas, 1 (5,3%) foi identificada como *C. dublinienses*, 1 (5,3%) foi identificada como *C. bracarensis* e 2 (10,5%) foram identificadas como *C. nivariensis*. Das 22 amostras (100%) identificadas presuntivamente como *C. tropicalis*, 21 (95,5%) foram confirmadas, 1 (4,5%) foi identificada como *C. glabrata*. Por meio dos resultados, verifica-se que houve confirmação de 85,4% das avaliações (76 amostras) (Tabela 3), mostrando concordância substancial (Landis e Koch, 1977).

A figura 4 apresenta o número de indivíduos e as cepas identificadas por sítio e escore de ERP. Verifica-se *C. albicans* é a espécie mais encontrada em ambos os sítios (palato e prótese) e que a prótese é o sítio mais contaminado. *C. albicans* e *C. tropicalis* apareceram no palato de maior número de indivíduos com escore 2 de ERP, enquanto as mesmas espécies foram mais prevalentes na prótese de indivíduos com grau 0. *C. glabrata* foi identificada na prótese de uma maior quantidade de indivíduos com grau 2 de ERP. Além disso, houve maior número de indivíduos com escore 0 e 1 com *C. dubliniensis* na prótese. A tabela 4 apresenta a carga microbiana em função do escore de ERP e sítio (prótese e palato).

Figura 4 – Prevalência (n indivíduos) das espécies de *Candida* por sítio e escore de ERP.

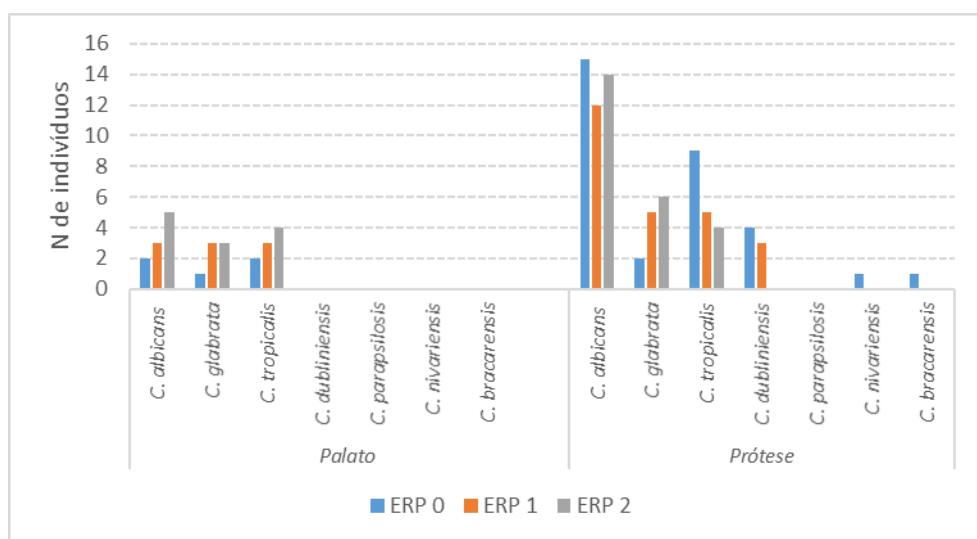


Tabela 3 – Concordância entre a identificação presuntiva (CHM) e o PCR.

		PCR					
CHM		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. nivariensis</i>	<i>C. bracarensis</i>
<i>C. albicans</i>	Contagem	40	0	0	8	0	0
	% do total	44,90%	0,00%	0,00%	9,00%	0,00%	0,00%
<i>C. glabrata</i>	Contagem	0	15	0	1	2	1
	% do total	0,00%	16,90%	0,00%	1,10%	2,20%	1,10%
<i>C. tropicalis</i>	Contagem	0	1	21	0	0	0
	% do total	0,00%	1,10%	23,60%	0,00%	0,00%	0,00%

*Teste de Kappa (Kappa = 0,779; p<0,001).

Tabela 4 Análise descritiva da carga microbiana das espécies de *Candida* no palato e na prótese e escore de ERP.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>C. nivariensis</i>		<i>C. bracarensis</i>		
ERP	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	Palato	Prótese	
0	Média	0,23	2,19	0,14	0,45	0,17	1,58	0	0,77	0,13	0,09	0	0,14
	DP	0,62	2,05	0,57	1,60	0,61	2,25	0	1,86	0	0	0	0
	Mediana	0,00	2,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0	0	0
	IC	(-0,08;0,44)	(1,25;2,98)	(-0,10;0,38)	(-0,20;1,15)	(-0,08;0,43)	(0,69;2,59)	0	(0,01;1,58)	0	0	0	0
1	Média	0,3	3,13	0,4	1,28	0,61	1,15	0	0,79	0	0	0	0
	DP	0,71	3,10	1,00	2,25	1,47	2,01	0	1,86	0	0	0	0
	Mediana	0,00	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00	0	0	0	0
	IC	(-0,05;0,68)	(1,76;4,44)	(-0,09;0,94)	(0,21;2,51)	(-0,12;1,40)	(0,18;2,25)	0	(-0,12;1,79)	0	0	0	0
2	Média	0,61	3,71	0,48	1,48	0,69	0,9	0	0	0	0	0	0
	DP	1,06	2,31	1,16	2,27	1,41	1,79	0	0	0	0	0	0
	Mediana	0,00	2,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0	0	0	0	0
	IC	(0,10;1,19)	(2,40;4,77)	(-0,09;1,11)	(0,40;2,73)	(0,00;1,46)	(0,03; 1,87)	0	0	0	0	0	0

Para *C. albicans*, a carga microbiana foi influenciada pelo grau de estomatite ($p=0,038$) e pelo sítio de coleta. Não houve interação entre os fatores ($p=0,261$). O grupo com escore 2 apresentou maior contagem de UFC de *C. albicans* quando comparado ao grupo com escore 0; o grupo com escore 1 apresentou carga microbiana com valores intermediários ao grupo 0 e 2 (Tabela 5). A prótese apresentou carga microbiana significativamente maior que o palato.

Tabela 5 - Carga microbiana (média de UFCLog10 e intervalo de confiança) de *C. albicans* em função do escore de inflamação e sítio (palato e prótese).

		Média	IC	P*
ERP	Escore de 0	1,14 ^a	0,69 – 1,59	0,038**
	1	1,70 ^{ab}	1,05 – 2,36	
	2	2,11 ^b	1,50 – 2,72	
Sítio	Palato	2,93	2,33 – 3,53	<0,001
	Prótese	0,37	0,16 – 0,59	

*Modelo linear generalizado com pós teste de Wald**

Para *C. glabrata*, a carga microbiana foi influenciada pelo sítio ($p=0,001$), sendo que a prótese [1,13 (0,59-1,66)] apresentou maior contagem de UFC que o palato [0,35 (0,11-0,60)]. O escore de ERP ($p=0,104$) e a interação dos fatores sítio×escore de ERP ($p=0,301$) não influenciou a carga microbiana.

Já para a carga microbiana de *C. tropicalis*, verificou-se que houve interação entre sítio×escore de ERP ($p=0,026$). A comparação das médias indicou que para o escore 0, a maior carga microbiana foi identificada na prótese. Para os escores 1 e 2, não houve diferença entre os sítios (Tabela 6).

Tabela 6 - Carga microbiana (média de UFCLog10 e intervalo de confiança) de *C. tropicalis* em função do escore de inflamação e sítio (palato e prótese).

	ERP	0	1	2	P*
Prótese	Média	1,64 ^{Aa}	1,22 ^{Aa}	0,95 ^{Aa}	0,026
	(IC)	0,69 – 2,59	0,18 – 2,25	0,03 – 1,87	
Palato	Média	0,18 ^{Ab}	0,64 ^{Aa}	0,73 ^{Aa}	
	(IC)	-0,08 – 0,43	-0,12 – 1,40	0,00 – 1,46	

*Teste de Kruskal-Wallis

4.3 Análise da suscetibilidade antifúngica das amostras de *Candida* spp. isoladas.

Foram isoladas 85 amostras de *Candida* spp. das quais 39 eram de *C.albicans*, 21 de *C. tropicalis*, 15 de *C. glabrata*, 7 de *C. dubliniensis*, 2 de *C. nivariensis* e 1 de *C. bacarensis*.

O total de cepas resistentes aos antifúngicos em função do escore de inflamação foi de 38 (41,2%) (Tabela 7). A tabela 8 apresenta a quantidade de espécies de *Candida* que os individuos apresentaram em cada grupo.

Tabela 7 – Quantidade de cepas resistentes em cada grupo.

Antifúngico \ ERP	0	1	2
Micafungina	1	2	0
Fluconazol	11	13	11
Nistatina	0	0	0
Miconazol	0	0	0
Total	12	15	11

O teste de Qui-quadrado de Person foi aplicado para todas as espécies de *Candida* (Tabelas 8 a 11) e houve diferença significante entre os grupos de inflamação apenas para *C. tropicalis* quando exposta ao fluconazol, onde o grupo de escore 1 apresentou maior quantidade de cepas resistentes (71,4%) quando comparado com os grupos de escore 0 (20%) e 2 (50%).

Tabela 8 - Comparaçao da frequênci (%) de cepas de *C. albicans* sensiveis (S), sensíveis dependentes de dose (SDD) ou resistentes (R) aos antifúngicos para cada grupo de inflamação.

	S	SDD	R	P
Micafungina	0	14 (100%)	0	*0,325
	1	12(92,3%)	0	
	2	12 (100%)	0	
Fluconazol	0	8 (57,1%)	0	*0,639
	1	8 (61,5%)	1 (7,7%)	
	2	7 (58,3%)	0	
Nistatina	0	14 (100%)	0	#
	1	13 (100%)	0	
	2	12 (100%)	0	
Miconazol	0	14 (100%)	0	#
	1	13 (100%)	0	
	2	12 (100%)	0	

*Sem diferença entre cepas sensíveis e resistentes; # Todas as cepas foram sensíveis.

Tabela 9 - Comparação da frequência (%) de cepas de *C. glabrata* sensíveis (S), sensíveis dependentes de dose (SDD) ou resistentes (R) aos antifúngicos para cada grupo de inflamação.

		S	SDD	R	P
Micafungina	0	3 (100%)	0	0	*0,379
	1	5(83,3%)	0	1(16,7%)	
	2	6 (100%)	0	0	
Fluconazol	0	1(33,3%)	0	2(66,7%)	*0,375
	1	2 33,3%)	0	4(66,7%)	
	2	1(16,7%)	2(33,3%)	3 (50%)	
Nistatina	0	3 (100%)	0	0	#
	1	6 (100%)	0	0	
	2	6 (100%)	0	0	
Miconazol	0	3 (100%)	0	0	#
	1	6 (100%)	0	0	
	2	6 (100%)	0	0	

*Sem diferença entre cepas sensíveis e resistentes; #Todas as cepas foram sensíveis.

Tabela 10 - Comparação da frequência (%) de cepas de *C. tropicalis* sensíveis (S), sensíveis dependentes de dose (SDD) ou resistentes (R) aos antifúngicos para cada grupo de inflamação.

		S	SDD	R	P
Micafungina	0	9 (90%)	0	1 (10%)	*0,463
	1	7 (100%)	0	0	
	2	4 (100%)	0	0	
Fluconazol	0	8 (80%)	0	2 (20%)	**0,004
	1	0	2(28,6%)	5(71,4%)	
	2	2 (50%)	0	2 (50%)	
Nistatina	0	10 (100%)	0	0	#
	1	7 (100%)	0	0	
	2	4 (100%)	0	0	
Miconazol	0	10 (100%)	0	0	#
	1	7 (100%)	0	0	
	2	4 (100%)	0	0	

*Sem diferença entre cepas sensíveis e resistentes; **Houve diferença entre cepas sensíveis e resistentes; #Todas as cepas foram sensíveis.

Tabela 11 - Comparação da frequência (%) de cepas de *C. dubliniensis* sensíveis (S), dependentes de dose (SDD) ou resistentes (R) aos antifúngicos para cada grupo de inflamação.

		S	SDD	R	P
Micafungina	0	4 (100%)	0	0	#
	1	2 (100%)	0	0	
	2	1 (100%)	0	0	
Fluconazol	0	3 (75%)	0	1 (25%)	*0,144
	1	2 (100%)	0	0	
	2	0	0	1 (100%)	
Nistatina	0	4 (100%)	0	0	#
	1	2 (100%)	0	0	
	2	1 (100%)	0	0	
Miconazol	0	4 (100%)	0	0	#
	1	2 (100%)	0	0	
	2	1 (100%)	0	0	

*Sem diferença entre cepas sensíveis e resistentes; #Todas as cepas foram sensíveis.

Para as espécies de *C. nivariensis* e *C. bacarensis* todas as cepas foram sensíveis para os antifúngicos micafungina, nistatina e miconazol, e todas as cepas foram sensíveis dose dependente para o fluconazol.

4.4 Análise da variabilidade cardíaca.

Foram analisados exames de 58 indivíduos, sendo 24 do grupo com escore 0, 17 do grupo com escore 1 e 17 do grupo com escore 2. Houve diferença significante para o SDNN no domínio do tempo ($p=0,031$), sendo que grupo com escore 0 apresentou valores estatisticamente maiores que o grupo com escore 2. Isso ressalta que pacientes sem a presença de sinais de inflamação, especificamente, sem estomatite relacionada à prótese (escore 0) apresentaram um menor risco cardiovascular em comparação com aqueles diagnosticados com inflamação, ou seja, escore 1 (leve e intermediária) e escore 2 (moderada e grave).

As tabelas 12 a 14 apresentam os dados e a comparação dos valores obtidos no Domínio do Tempo, Análise Espectral e da Análise Simbólica, respectivamente.

Tabela 12 - Comparação dos valores da média e erro padrão (EP) para os parâmetros do Domínio do tempo.

ERP		Mean	SDNN	RMSSD
0	Média	995	47 ^a	41
	EP	31	4	5
1	Média	909,5	34,9 ^b	26,5
	EP	29	4	4
2	Média	971,2	29,9 ^b	23,8
	EP	34	2	2
P		0,241*	0,031**	0,058**

*Teste ANOVA; **Teste Kruskal-Wallis.

Tabela 13 - Comparação dos valores da média e erro padrão (EP) para os parâmetros da Análise Espectral.

ERP		VLF abs	LF abs	HF abs	LF nu	HF nu	LF/HF
0	Média	541,1	634,6	693,8	49,6	54,4	1,4
	EP	81	197	165	4	4	0,3
1	Média	329,9	231,3	535,8	49,5	50,5	1,3
	EP	52	44	237	4	4	0,1
2	Média	363,2	192,1	225,7	47,9	52,1	1,4
	EP	88	38	44	5	5	0,3
P		0,221**	0,144**	0,116**	0,894*	0,894*	0,862**

*Teste ANOVA; **Teste Kruskal-Wallis.

Tabela 14 - Comparação dos valores da média e erro padrão (EP) para os parâmetros da Análise Simbólica.

ERP		0V	1V	2LV	2UV
0	Média	21,48	45,53	9,23	22,06
	EP	3	1	2	2
1	Média	23,37	45,2	11,29	19,97
	EP	2	1	3	2
2	Média	17,15	46,44	11,5	24,54
	EP	3	2	2	2
P		0,225**	0,884*	0,291**	0,264**

*Teste ANOVA; **Teste Kruskal-Wallis.

5. DISCUSSÃO.

Este estudo isolou e identificou as espécies de *Candida* do biofilme de próteses totais e palato de indivíduos acometidos por estomatite relacionada à prótese (ERP) e ainda, avaliou a prevalência das espécies, a suscetibilidade antifúngica e a variabilidade da frequência cardíaca nos diferentes grupos de ERP.

A maioria dos participantes apresentava ERP (58,6%) com escore 1 (n=17) e 2 (n=17), era do sexo feminino, residente com a família, casada, com ensino fundamental completo e de baixa renda, assim como encontrado em outros estudos (Araujo *et al.*, 2021; Badaró *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2022).

A identificação de *Candida* spp. por meio dos métodos convencionais, que utilizam a micro morfologia das colônias, assimilação de açucares e teste de fermentação é trabalhosa e demanda um longo período (Cooke 2002; Odds *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2009). Neste estudo, a identificação inicial foi realizada pelo método cromogênico utilizando o meio CHROMAgar *Candida* e, as espécies foram confirmadas pelo método de biologia molecular através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A concordância entre os métodos foi de 85,4% que segundo Landis e Koch (1977) é uma concordância substancial, demonstrando que o meio CHROMAgar *Candida* é eficaz/útil na identificação de espécies de *Candida*. Por meio deste resultado, pode-se considerar a necessidade de realizar a identificação por PCR em situações onde há baixa resposta da infecção ao tratamento e em casos graves, visto que o custo e tempo são relativamente mais elevados quando comparado ao método presuntivo.

De modo geral, neste estudo a carga microbiana de *Candida* spp. foi maior na prótese se comparado ao palato, resultado que corrobora com os de outros estudos (Badaró *et al.*, 2020; Kabawat *et al.*, 2014). *C. albicans* apresentou a maior prevalência nos três grupos, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata* (Marcos-Arias *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2010; Omran *et al.*, 2018). Um achado interessante foi a identificação de *C. nivariensis* e *C. bracarensis* no grupo com escore 0, espécies não frequentemente isoladas, mas que vem emergindo na última década (Kumar *et al.*, 2022). Estas espécies assemelham-se a *C. glabrata*, fenotipicamente (Figueiredo-Carvalho *et al.*, 2016). Pelo nosso conhecimento apenas um estudo relatou a presença de *C. nivariensis* na cavidade bucal (Morales-Lópes *et al.*, 2016). Hernando-Ortiz *et al.* (2021) avaliaram as interações entre hospedeiro e patógeno durante a infecção por *C. glabrata*, *C. nivariensis* e *C. bracarensis*, no modelo de candidíase em *Galleria mellonella*. Das 3 espécies, *C. glabrata* foi a mais virulenta e *C. bracarensis* a menos virulenta. O modelo de candidíase em *G. mellonella* é simples e adequado para avaliar a virulência e a resposta terapêutica dessas espécies emergentes de *Candida*, permitindo detectar diferenças no sistema

imunológico do hospedeiro dependendo da virulência dos patógenos. Os isolados de *C. nivariensis* são menos suscetíveis do que os isolados de *C. glabrata* aos agentes antifúngicos azólicos [fluconazol (FLC), itraconazol (ITR) e voriconazol (VRC)], que são comumente usados no tratamento da candidíase (Borman *et al.*, 2008). Figueiredo-Carvalho *et al.* (2016) avaliaram o perfil de suscetibilidade de *C. nivariensis* e os resultados reforçaram o perfil de resistência aos medicamentos azólicos geralmente usados no tratamento de candidíase. Assim, especial monitoramento deve ser realizado em pacientes com idosos e principalmente, imunocomprometidos (Figueiredo-Carvalho *et al.*, 2016; Hernando-Ortiz *et al.*, 2021; Morales-López *et al.*, 2016).

Em relação à suscetibilidade antifúngica, houve diferença significante apenas para *C. tropicalis*, onde o grupo com estomatite escore 1 (71,4%) apresentou maior quantidade de cepas resistentes ao fluconazol, quando comparada ao grupo 0 (20%) e 2 (50%). De modo geral, houve um alto índice de resistência ao fluconazol, principalmente entre as cepas não *albicans* (Reinhardt *et al.*, 2020). O fluconazol oral é eficaz no tratamento da candidíase oral que não responde ao tratamento tópico, entretanto sua aplicação em subdoses pode ser responsável pelo desenvolvimento de resistência pelas diferentes espécies de *Candida* (Reinhardt *et al.*, 2020). Embora em pequena quantidade (3 cepas de 85), também foi verificada resistência à Micafungina, inibidor seletivo da síntese de 1,3-β-D-glucano fúngico, um componente essencial da parede celular fúngica. É utilizado na forma de infusão e comumente indicado para o tratamento de candidíase invasiva e esofágica (Wasemann *et al.*, 2018), portanto, mais indicada para casos graves.

Todas as cepas isoladas foram sensíveis à Nistatina e ao Miconazol. Este resultado é importante uma vez que Nistatina é um agente antifúngico tópico e oral com atividade contra muitas espécies de leveduras e *Candida albicans*, amplamente utilizada no tratamento de candidíase cutânea e orofaríngea e, por não ser absorvida por via oral, não foi associada a lesões hepáticas induzidas por medicamentos (LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, 2020). Nistatina e miconazol são os antifúngicos tópicos mais comumente utilizados e são eficazes, porém exigem um longo período de uso para erradicar a infecção. As apresentações farmacológicas do miconazol são mais confortáveis para os pacientes, mas este medicamento pode interagir com outros medicamentos, devendo sempre avaliar a possibilidade de interação antes da prescrição (Quindós *et al.*, 2019).

As cepas identificadas como *C. nivariensis* e *C. bracarensis* foram sensíveis ou sensíveis dependentes de dose aos antifúngicos, e segundo a literatura a suscetibilidade dessas espécies continua obscura, uma vez que tem variações em relação à sensibilidade entre os

estudos (Kumar et al., 2022; Li *et al.*, 2014; Sikora *et al.*, 2019). A literatura indica que isolados de *C. nivariensis* são menos suscetíveis do que os isolados de *C. glabrata* aos agentes antifúngicos azólicos [fluconazol (FLC), itraconazol (ITR) e voriconazol (VRC)], que são comumente usados no tratamento da candidíase (Borman *et al.*, 2008). Figueiredo-Carvalho *et al.* (2016) avaliaram o perfil de suscetibilidade de *C. nivariensis* e os resultados reforçaram o perfil de resistência aos medicamentos azólicos geralmente usados no tratamento de candidíase. Assim, especial monitoramento deve ser realizado em pacientes com idosos e principalmente, imunocomprometidos (Figueiredo-Carvalho *et al.*, 2016; Hernando-Ortiz *et al.*, 2021; Morales-Lópes *et al.*, 2016).

Recentemente a estomatite relacionada à prótese está sendo associada a implicações sistêmicas, como alterações na pressão arterial, que antecedem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares graves como a hipertensão e a aterosclerose (Maciag *et al.*, 2014; Maciag *et al.*, 2017; Ribeiro *et al.*, 2022). Este estudo encontrou diferenças estatísticas importantes no SDNN do domínio do tempo. O SDNN é o padrão clínico que avalia a saúde cardiovascular, a morbidade e o risco cardiovascular, e maiores valores de variabilidade são favoráveis ao menor risco cardiovascular. O grupo 0, ou seja, sem a inflamação apresentou valores maiores que os dos grupos 1 e 2, ressaltando que indivíduos sem a presença da inflamação apresentam uma menor chance de desenvolveram problemas cardiovasculares se comparados com indivíduos que apresentam esta inflamação. Estes achados vão ao encontro da literatura, uma vez que a redução da inflamação por ERP após tratamento local promoveu melhora de marcadores de inflamação local e redução da pressão arterial sistólica de indivíduos desdentados totais, usuários de próteses totais (Ribeiro *et al.*, 2022).

Os resultados deste estudo sugerem que indivíduos com inflamação por ERP apresentam maior carga microbiana e também um maior risco de problemas cardiovasculares. Embora uma limitação por ser atribuída ao número amostral, este estudo observacional indica a necessidade da realização de estudos clínicos controlados, aleatorizados com indivíduos portadores da inflamação, antes e após o tratamento da ERP envolvendo outras variáveis indicadoras de risco cardiovascular.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos achados o estudo conclui que:

- 1) *C. albicans* é a espécie mais frequentemente encontrada no biofilme da prótese e no palato, tanto de indivíduos com ERP como de indivíduos saudáveis.
- 2) O método cromogênico na identificação de *Candida* spp. é eficaz/útil, devendo ser substituído por métodos de biologia molecular em situações graves e não resposta ao tratamento.
- 3) A indicação de nistatina para o tratamento da ERP parece ser eficaz uma vez que todas as cepas foram sensíveis a este antifúngico.
- 4) Os indivíduos sem ERP apresentam um menor risco cardiovascular se comparado com os indivíduos com a inflamação.

REFERÊNCIAS

- Araújo CB, Ribeiro AB, Fortes CV, Bueno FL, De Wever B, Oliveira VC, Macedo AP, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Effect of local hygiene protocols on denture-related stomatitis, biofilm, microbial load, and odor: A randomized controlled trial. *J Prosthet Dent.* 2021 Mar 15:S0022-3913(20)30808-8.
- Badaró MM, Bueno FL, Arnez RM, Oliveira VC, Macedo AP, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. The effects of three disinfection protocols on *Candida* spp., denture stomatitis, and biofilm: A parallel group randomized controlled trial. *J Prosthet Dent.* 2020; 124(6):690-698.
- Badaró MM, Salles MM, Leite VMF, Arruda VNF, Oliveira VC, Nascimento CD, Souza RF, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH. Clinical trial for evaluation of *Ricinus communis* and sodium hypochlorite as denture cleanser. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(3):324-334.
- Borman AM, Petch R, Linton CJ, Palmer MD, Bridge PD, Johnson EM. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol.* 2008;46:933-938.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- Cobos B, Haskard-Zolnieruk K, Howard K. White coat hypertension: improving the patient-health care practitioner relationship. *Psychol Res Behav Manag.* 2015;8:133-141.
- Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jul;68(7):3622-7.
- 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 Jan;13(1):12-22.
- Demitto FO, do Amaral RCR, Biasi RP, Guilhermetti E. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2012;48(5).
- de Souza RF, Khiyani MF, Chaves CAL, Feine J, Barbeau J, Fuentes R, Borie E, Crizostomo LC, Silva-Lovato CH, Rompre P, Emami E. Improving practice guidelines for the treatment of denture-related erythematous stomatitis: a study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017 May 5;18(1):211.
- Emami E, de Souza RF, Kabawat M, Feine JS. The impact of edentulism on oral and general health. *Int J Dent.* 2013 May 8;2013:498305.
- EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY. Method for determination of minimal inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. Discussion document E. Dis. 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany. 2002.

Felipe LO, Júnior WFDS, Araújo KC, et al. Lactoferrin, chitosan and Melaleuca alternifolia-natural products that show promise in candidiasis treatment. *Braz J Microbiol.* 2018;49(2):212-219.

Figueiral MH, Fonseca P, Lopes MM, Pinto E, Leite TP, Maia BS. Effect of Denture-Related Stomatitis Fluconazole Treatment on Oral *Candida albicans* Susceptibility Profile and Genotypic Variability. 2015; 9: 46–51.

Figueiredo-Carvalho MH, Ramos Lde S, Barbedo LS, Chaves AL, Muramoto IA, Santos AL, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM. First description of *Candida nivariensis* in Brazil: antifungal susceptibility profile and potential virulence attributes. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016 Jan;111(1):51-8.

Goldman N, Glei DA, Seplaki C, Liu IW, Weinstein M. Perceived stress and physiological dysregulation in older adults. *Stress.* 2005;8(2):95-105.

Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J.* 2017 Dec 1;6(4):46-51.

Hernando-Ortiz A, Eraso E, Quindós G, Mateo E. Candidiasis by *Candida glabrata*, *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in *Galleria mellonella*: Virulence and Therapeutic Responses to Echinocandins. *J Fungi (Basel).* 2021;23;7(12):998.

Kabawat M, de Souza RF, Badaró MM, de Koninck L, Barbeau J, Rompré P, Emami E. Phase 1 clinical trial on the effect of palatal brushing on denture stomatitis. *Int J Prosthodont.* 2014 Jul-Aug;27(4):311-19.

Kossioni AE. The prevalence of denture stomatitis and its predisposing conditions in an older Greek population. *Gerodontology.* 2011;28(2):85-90.

Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil.* 2002;29(3):300-304.

Kumar S, Kumar A, Roudbary M, Mohammadi R, Černáková L, Rodrigues CF. Overview on the Infections Related to Rare *Candida* Species. *Pathogens.* 2022 Aug 24;11(9):963.

Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159-74.

Li J, Shan Y, Fan S, Liu X. Prevalência de *Candida nivariensis* e *Candida bracarensis* na candidíase vulvovaginal. *Micropatologia.* 2014 Out;178(3-4):279-83.

LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012-. Nystatin. 2020 Apr 29.

Luft CD, Sanches SO, Mazo GZ, Andrade A. Brazilian version of the Perceived Stress Scale: translation and validation for the elderly. *Rev Saude Publica.* 2007 Aug;41(4):606-615.

Maciąg J, Mikołajczyk T, Matusik P, Nowakowski D, Robertson D, Maciąg A, Osmenda G, Cześniakiewicz-Guzik M. The Effect of Treatment of Denture-related Stomatitis on Peripheral T Cells and Monocytes. *Oral Health Prev Dent.* 2017;15(3):259-268.

Maciąg J, Osmenda G, Nowakowski D, Wilk G, Maciąg A, Mikołajczyk T, Nosalski R, Sagan A, Filip M, Dróżdż M, Loster J, Guzik TJ, Cześniakiewicz-Guzik M. Denture-related stomatitis is associated with endothelial dysfunction. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:474016.

Mahdavi-Omran S, Dastjerdi MR, Zuashkiani M, Moqarabzadeh V, Taghizadeh-Armaki M. In Vitro Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Iranian Patients with Denture Stomatitis, *BioMed Research International.* 2018; 2018:3086586.

Malachias MVB, Neves MF, Mion D Junior, Silva GV, Lopes HF, Oigman W, et al. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 3 - Clinical and Complementary Assessment. *Arq Bras Cardiol.* 2016 Sep;107(3 Suppl 3): 18-24.

Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, Aguirre JM, Eraso E, Quindós G. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol.* 2009;54(2):127-131.

Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Gonçalves V, Seabra Á, Azeredo J, Oliveira R. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2010;27(3):119-124.

Ministério da Saúde (Brasil). Projeto SB Brasil 2010: Resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde. 2011.

Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores Sociais Municipais: uma análise dos resultados do universo do Censo Demográfico. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014.

Morales-López SE, Taverna CG, Bosco-Borgeat ME, Maldonado I, Vivot W, Szusz W, Garcia-Effron G, Córdoba SB. *Candida glabrata* species complex prevalence and antifungal susceptibility testing in a culture collection: First description of *Candida nivariensis* in Argentina. *Mycopathologia.* 2016 Dec;181(11-12):871-878.

Mousa MA, Lynch E, Kielbassa AM. Denture-related stomatitis in new complete denture wearers and its association with *Candida* species colonization: a prospective case-series. *Quintessence Int.* 2020;51(7):554-565.

Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 1994 Aug;32(8):1923-9.

Offenbacher S, Beck JD, Barros SP, Suruki RY, Loewy ZG. Obstructive airway disease and edentulism in the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *BMJ Open.* 2012;2(6):e001615.

Oliveira NC, Rampazzo RCP, Minari MC, Corrêa PRC, Carneiro M, Svidzinsk TIE, Maia LF, Yamada-Ogatta SF. (2009). Utilização de um meio cromogênico e da técnica de semi-nested

PCR para identificação de espécies de *Candida*. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. 2006 Out;27(2):125.

Osmenda G, Maciąg J, Wilk G, Maciąg A, Nowakowski D, Loster J, Dembowska E, Robertson D, Guzik T, Cześnikiewicz-Guzik M. Treatment of denture-related stomatitis improves endothelial function assessed by flow-mediated vascular dilation. 2017;1;13(1):66-74.

Panzeri H, Lara EH, Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, de Souza RF, de Souza Gugelmin MC, Tirapelli C, Cruz PC, de Andrade IM. In vitro and clinical evaluation of specific dentifrices for complete denture hygiene. Gerodontology. 2009;26(1):26-33.

Paranhos HFO, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Cruz PC, de Freitas-Pontes KM, Watanabe E, Ito IY. Effect of three methods for cleaning dentures on biofilms formed in vitro on acrylic resin. J Prosthodont. 2009;18(5):427-431.

Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. Bull World Health Organ. 2005;83(9):661-669.

Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019 Mar 1;24(2):e172-e180.

Regis RR, Cunha TR, Della Vecchia MP, Ribeiro AB, Silva-Lovato CH, de Souza RF. A randomised trial of a simplified method for complete denture fabrication: patient perception and quality. J Oral Rehabil. 2013;40(7):535-545.

Reinhardt LC, Nascente PS, Ribeiro JS, Guimarães VBS, Etges A, Lund RG. Sensitivity to antifungals by *Candida* spp. samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC). Braz J Biol. 2020 Apr-Jun;80(2):266-272.

Ribeiro AB, de Araújo CB, Silva LEV, Fazan-Junior R, Salgado HC, Ribeiro AB, Fortes CV, Bueno FL, de Oliveira VC, Paranhos HFO, Watanabe E, da Silva-Lovato CH. Hygiene protocols for the treatment of denture-related stomatitis: local and systemic parameters analysis - a randomized, double-blind trial protocol. Trials. 2019 Nov 29;20(1):661.

Ribeiro AB, Ribeiro AB, de Araújo CB, Fortes CV, Clemente LM, Paranhos HFO, Watanabe E, Salgado HC, Silva-Lovato CH. Effect of a Hygiene Protocol on Denture-Related Stomatitis Remission, Local Inflammatory Factors, and Hemodynamic Responses by Arterial Pressure. Antibiotics (Basel). 2022 Sep 28;11(10):1320.

Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis. 2002 Feb;2(2):73-85.

Scannapieco FA, Cantos A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases: implications for the elderly. 2016 Oct; 72(1):153-75.

Sharma N, Shukla J, Sharma D, Mehta D, Kakde L, Bais K. Perceived Status and Care Practices among Complete Denture Wearers. J Pharm Bioallied Sci. 2020 Aug;12(1):336-339.

Shay K. Denture hygiene: a review and update. J Contemp Dent Pract. 2000;1(2):28-41.

Sikora M, Kuthan R, Piskorska-Malolepsza K, Golas-Pradzynska M, Domanski D, Augustynowicz-Kopec E, Swoboda-Kopec E. Prevalence and Antifungal Susceptibility of the Emerging Fungal Species, *Candida nivariensis*, isolated in a teaching hospital in Poland. Pol J Microbiol. 2019 Sep;68(3):303-308.

Silva LE, Lataro RM, Castania JA, da Silva CA, Valencia JF, Murta LO Jr, Salgado HC, Fazan R Jr, Porta A. Multiscale entropy analysis of heart rate variability in heart failure, hypertensive, and sinoaortic-denervated rats: classical and refined approaches. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016;311(1):150-156.

Silva LE, Silva CA, Salgado HC, Fazan R Jr. The role of sympathetic and vagal cardiac control on complexity of heart rate dynamics. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017b;312(3):469-477.

Silva LEV, Geraldini VR, de Oliveira BP, Silva CAA, Porta A, Fazan R Jr. Comparison between spectral analysis and symbolic dynamics for heart rate variability analysis in the rat. Sci Rep. 2017a;16;7(1):8428.

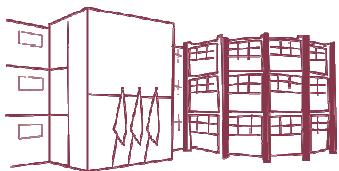
Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. 2012; 36(2):288-305.

Smith AJ, Brewer A, Kirkpatrick P, Jackson MS, Young J, Watson S, Thakker B. *Staphylococcal* species in the oral cavity from patients in a regional burns unit. 2003;55(3):184-9.

Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, Michiwaki Y, Sakagami N. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. 2002;19(1):25-9.

Sumi Y, Kagami H, Ohtsuka Y, Kakinoki Y, Haruguchi Y, Miyamoto H. High correlation between the bacterial species in denture plaque and pharyngeal microflora. 2003;20(2):84-7.

Wasemann RE, Muilwijk EW, Burger DM, Verweij PE, Knibbe CA, Brüggemann RJ. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Micafungin. Clin Pharmacokinet. 2018;57(3):267-286.



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 536^a Reunião Ordinária, realizada em 04 de outubro de 2024, **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), conforme menção constante no trabalho e documentação existente no Serviço de Graduação da FORP.

Ribeirão Preto, 04 de novembro de 2024.

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