

Presença *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica

CLÉLIA APARECIDA DE PAIVA MARTINS* ; SILVANA SOLÉO FERREIRA DOS SANTOS** ; JUSSARA CIA SANCHES LOBERTO** ; CRISTIANE YUMI KOGA-ITO***, ANTONIO OLAVO CARDOSO JORGE**/****

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* são habituais na cavidade bucal humana e podem causar doença na presença de fatores predisponentes. As leveduras podem ser isoladas de bolsa periodontal e originar um quadro de superinfecção, principalmente quando do uso de antibióticos. O objetivo do presente trabalho foi verificar a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal e bolsas periodontais de indivíduos portadores de periodontite crônica e correlacionar as cepas isoladas da cavidade bucal com as da bolsa periodontal. As amostras coletadas de 88 indivíduos foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e, após crescimento, as cepas foram isoladas e identificadas através das provas bioquímicas. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas da cavidade bucal em 31,82% e da bolsa periodontal em 7,96% dos indivíduos examinados, sendo que 6,82% apresentaram leveduras tanto na cavidade bucal quanto na bolsa periodontal. *Candida albicans* foi a espécie mais frequentemente encontrada.

UNITERMOS

Candida; periodontite; fosfolipase; proteinase; fator *killer*; boca ou doenças da boca

MARTINS, C.A.P. et al. Presence of *Candida* spp. in chronic periodontitis patients. *Cienc Odontol Bras*, v.5, n.3, p. 75-83, set./dez. 2002.

ABSTRACT

Candida spp. is commonly isolated from the human oral cavity and can cause disease when predisposing factors are present. Yeasts can be also isolated from the periodontal pocket and originate superinfection, mainly when the patient is under antibiotic therapy. The aim of the present study was to verify the presence of *Candida* spp. in the oral cavities and

periodontal pockets of patients with chronic periodontitis and to correlate the strains isolated from these different sites. The material collected from 88 patients were inoculated on Sabouraud dextrose agar supplemented with chloramphenicol and the isolates were identified through biochemical tests. *Candida* spp. were isolated from the oral cavity of 31.82 % of the patients and 7.96 % of the examined periodontal pockets 6.82 % presented *Candida* in both the studied sites. *Candida albicans* was the most frequently isolated.

UNITERMS

Candida; periodontitis disease; phospholipase; proteinase; killer system, oral cavity

INTRODUÇÃO

Infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* afetam frequentemente o ser humano e sua incidência tem aumentado com o crescente uso de antibióticos, agentes imunossupressores e, mais recentemente, com a epidemia da AIDS¹⁰. As leveduras estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, vegetais, alimentos e em diversos ambientes, inclusive hospitalares. Embora algumas espécies tenham distribuição mais restrita, podem comportar-se como microrganismos comensais ou patogênicos no organismo do homem e de outros animais^{17,21}.

Quando ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico, geralmente resultante de fatores predisponentes (patológicos, fisiológicos, imunológicos e mecânicos), há um aumento na multiplicação e/ou invasão destes microrganismos em tecidos, instalando-se a infecção^{11,21}. Qualquer fungo é capaz de

* Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em Biopatologia Bucal (Nível de Mestrado) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP- 12245-000 - SP

** Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Concentração em Biopatologia Bucal (Nível de Doutorado) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP- 12245-000 - SP

*** Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP- 12245-000 – SP.

**** Departamento de Microbiologia e Imunologia – Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté - 12010-120 - SP.

crescer à temperatura do hospedeiro (37°C) e sobreviver em baixo potencial de óxido-redução (condição encontrada em tecidos danificados), pode ser considerado um patógeno humano importante³⁷. O aumento no número de indivíduos imunocomprometidos na população tem atraído a atenção para a importância do estudo de *C. albicans* como um fungo oportunista patogênico⁸.

C. albicans, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são as espécies mais frequentemente isoladas de candidoses (mais de 80%). *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* são também isoladas de diferentes amostras clínicas⁴⁴. No entanto o principal patógeno humano do gênero *Candida* é, sem dúvida, *C. albicans*, e sua habilidade em causar doença está mais relacionada ao estado imunológico do hospedeiro do que aos conhecidos fatores de virulência³⁸.

Vários autores relataram a produção de fosfolipases^{15,23,31,33} e proteinases^{6,7,26,39} por cepas de *Candida*. Fosfolipase é uma enzima que degrada fosfolípídeos, comuns em todas as formas de vida e estão frequentemente associadas às membranas celulares^{3,15}, podendo tomar parte do processo de invasão de *C. albicans* nos tecidos³¹.

Produção de proteinase extracelular tem sido apontada como relevante na virulência de determinadas cepas. Muitos microrganismos patogênicos possuem enzimas hidrolíticas que destroem, alteram ou danificam a integridade da membrana celular do hospedeiro, levando a uma disfunção ou interrupção das suas atividades, representando importante mecanismo de patogenicidade de *C. albicans*, possivelmente por facilitar sua penetração nos tecidos.

Algumas espécies de *Candida* produzem substâncias protéicas que podem agir como fatores de virulência, denominados fatores, toxinas ou proteínas *killer*^{5,30}. O efeito *killer* demonstrado por leveduras é medido pela presença de receptores celulares da parede celular e pela ausência de um sistema de imunidade específica do hospedeiro.

Pires et al.²⁶ (1996) estudaram amostras de *C. albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com positividade para HIV e encontraram 64,5% com o biotipo 211. Oliveira et al.²³ (1998) estudaram a sensibilidade de amostras isoladas de *C. albicans* da

mucosa bucal de indivíduos com câncer às toxinas *killer* e relataram que essas amostras apresentam na sua maioria apenas um biotipo. Entre os isolados de *C. albicans*, 95,8% mostraram-se com biotipo 811.

A forma mais comum de doença periodontal destrutiva em adultos é a periodontite crônica que se caracteriza por perda clínica de inserção, em decorrência da destruição do ligamento periodontal e perda de osso de suporte¹. Em alguns casos, esta perda de inserção pode progredir, a despeito de um extensivo tratamento, caracterizando a periodontite refratária, que pode ocorrer em situações onde a terapia convencional tem falhado em eliminar reservatórios de microrganismos infecciosos, ou resultar do aparecimento de patógenos oportunistas superinfectantes².

De acordo com Jorge¹⁴ (1995), há um aumento no isolamento de *Candida* no sulco gengival de pacientes com doença periodontal. Espécies de *Candida* têm sido isoladas na microbiota subgengival de tecidos gengivais de pacientes com abscessos periodontais¹³, periodontite avançada⁴⁵; em pacientes com AIDS³⁵; em pacientes com periodontite juvenil localizada¹² e em pacientes com periodontite crônica tratados com antibióticos¹³.

A utilização de antibacterianos de amplo espectro como auxiliares no tratamento periodontal tem sido um dos mais relevantes fatores para o desenvolvimento de superinfecções por bactérias resistentes e por leveduras do gênero *Candida*⁹, inclusive em pacientes portadores do HIV, que além de terem sua imunidade comprometida, são submetidos a tratamentos prolongados com antibacterianos para curar ou prevenir infecções bacterianas³⁶.

O propósito do presente trabalho foi isolar e identificar amostras de leveduras do gênero *Candida* da cavidade bucal e bolsa periodontal em pacientes com periodontite crônica, correlacionar as cepas presentes na cavidade bucal com as da bolsa periodontal e além disso, avaliar fatores de patogenicidade e distribuição de biotipos *killer* nas amostras isoladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram selecionados 88 pacientes que procuraram a clínica de Periodontia da

Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté (UNITAU), com 25 anos de idade ou mais e que apresentavam quadro de periodontite crônica (mínimo de dois sítios com profundidade de sondagem maior ou igual a 5mm). Estes pacientes não deveriam apresentar doença sistêmica, não haver iniciado tratamento da doença periodontal e não ter feito uso de antibióticos nos seis meses que precederam a coleta. Nenhum paciente havia recebido tratamento periodontal ou recebido orientações sobre higiene bucal antes da coleta de material.

Os pacientes foram informados sobre a finalidade da pesquisa, bem como sobre os métodos de coleta das amostras e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa 072/99-PH/CEP. Após o consentimento foram realizados: anamnese, exame clínico periodontal utilizando o índice de doença periodontal (IDP) desenvolvido por Spolsky⁴⁶ (1992), e preenchida a ficha clínica com dados necessários ao estudo. Para o grupo controle, foram utilizados setenta indivíduos saudáveis.

Para cada paciente do grupo controle foi fornecido 10mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,85%) tamponada com fosfato 0,1M, pH 7,4 (PBS), em um recipiente universal descartável, para que fosse feito enxágüe bucal por 60 segundos. A seguir, o enxágüe bucal foi devolvido ao recipiente, que foi mantido em gelo até ser levado ao laboratório de Microbiologia, respeitando-se um período máximo de 3 horas entre a coleta e processamento. Cada amostra de enxágüe bucal (controle) foi centrifugada a 3000 Xg por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuscitado em 2,5 mL de PBS e misturado em agitador de tubos (Vortex) por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final, baseando-se em Santos & Jorge⁴³ (1998).

A coleta de material da bolsa periodontal foi realizada com cones de papel, após a remoção da placa supragengival com compressa de gaze esterilizada e isolamento relativo com roletes de algodão, foram colocados três cones de papel esterilizados nº 30 (áureo) em cada bolsa periodontal, até a profundidade de sondagem, por 30 segundos. Os cones, contendo o material coletado, foram colocados em tubos plásticos (Eppendorf) contendo 1mL de PBS. O material coletado foi mantido em gelo até ser levado ao laboratório, respeitando-se

o período máximo de 3 horas entre a coleta e o processamento.

As amostras de material subgengival foram homogeneizadas em Vortex durante 30 segundos e os cones removidos com auxílio de pinças esterilizadas. Cada amostra foi centrifugada por 10 minutos (8000 X g) e o sobrenadante descartado. O depósito foi ressuscitado em 0,6 mL de PBS e misturado em Vortex por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final, baseando-se em Santos & Jorge⁴³ (1998).

De cada amostra (suspensão de concentração final) de enxágüe bucal e material subgengival, foi semeado 0,1mL em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) com cloranfenicol (0,1 mg de Quemisetina Succinato, Carlo Erba, por mL de meio) e incubadas a 37°C por 48 horas e a seguir por mais cinco dias a temperatura ambiente. As amostras também foram semeadas em CHROMagar. Após crescimento das colônias características, foram feitos esfregaços corados pelo Gram. Quando da presença de leveduras, as colônias foram transferidas para ágar Sabouraud dextrose inclinado, para obtenção de culturas puras, as quais foram posteriormente identificadas de acordo com Sandvén⁴² (1990).

A produção de fosfolipase foi detectada com metodologia descrita por Price et al.³². (1982), proteínase por Ruchel et al.⁴⁰ (1982). A verificação do fator *killer* foi realizado baseando-se em Polonelli et al.²⁹ (1983).

Para análise dos resultados foi realizado o teste estatístico Qui - quadrado (χ^2) considerando-se diferença estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas do enxágüe bucal de 28 (31,82%) pacientes com periodontite. *C. albicans* foi a espécie mais frequente nos isolamentos (83,34%), seguindo-se *C. glabrata* (10%) e *C. tropicalis* (6,66%). Da bolsa periodontal, foram isoladas leveduras do gênero *Candida* em 7,96% dos pacientes (n = 7), sendo que 85,72% das amostras foram identificadas como *C. albicans* e 14,28% *C. glabrata* conforme pode ser observado na Tabela 1.

Dos indivíduos examinados, 22 (25%) apresentaram leveduras do gênero *Candida* somente na cavidade bucal, 1 (1,13%) somente na bolsa periodontal e 6 (6,82%) apresentaram tanto na cavidade bucal quanto na bolsa periodontal (Figura 1).

Deste estudo participaram 35 homens e 53 mulheres, não sendo encontrada diferença estatisticamente significativa com relação ao sexo ($p = 0,1407$) entre os casos positivos e negativos (Tabela 2).

Não houve prevalência estatística significativa ($p = 0,6947$) de casos positivos para as faixas etárias estudadas (Tabela 3).

Também não foi encontrada correlação estatística significativa ($P = 0,5164$) entre casos positivos e pacientes fumantes (Tabela 4).

Com relação a profundidade de bolsa periodontal não ocorreu uma prevalência estatisticamente

significativa ($p = 0,3332$) para os casos positivos para *Candida* na cavidade bucal (Tabela 5).

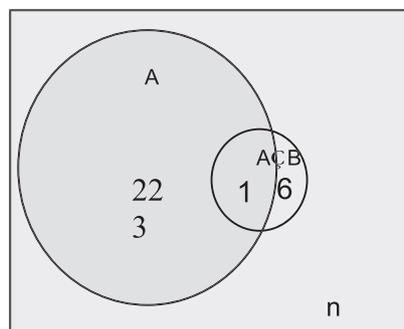
Vinte e uma (75%) das 28 cepas de *C. albicans* produziram fosfolipase e 25 (89,3%), proteínase; destas ocorreu predominância de cepas fortemente positivas (46,5% para fosfolipase e 89,3% para proteínase). Seis (21,5%) das cepas de *C. albicans* foram fortemente positivas para as duas enzimas (Tabela 6).

A tipagem *killer* realizada com as cepas de leveduras isoladas da cavidade bucal, demonstrou maior frequência do biotipo 111, com 19 (52,77%) cepas, seguindo-se o biotipo 114 com 8 (22,3%) cepas, biotipo 414 com 8 (22,3%) e 1 (2,7%) cepa com o biotipo 888. A tipagem *killer* realizada com as cepas de leveduras isoladas das bolsas periodontais, também demonstrou maior frequência do biotipo 111, com 6 (85,8%) cepas. Duas (28,6%) das cepas de *C. albicans* foram fortemente positivas para as duas enzimas (Tabela 7).

Tabela 1 - Distribuição de frequência das espécies de leveduras do gênero *Candida* isolados da cavidade bucal de indivíduos com periodontite crônica.

Espécies	Bochecho		Bolsa Periodontal		Total
	n	n	%	n	%
<i>C. albicans</i>	25	83,33	06	85,72	31
<i>C. glabrata</i>	03	10	01	14,28	04
<i>C. tropicalis</i>	02	6,67	-	-	02
Total de espécies	30	100	07	100	37

Diagrama de Venn



onde:

$n^{\text{®}}$ total da amostra = 88

$A^{\text{®}}$ positivos para a cavidade bucal = 22

$B^{\text{®}}$ positivos para a bolsa periodontal = 1

$A \cap B^{\text{®}}$ positivos para a cavidade bucal e bolsa periodontal = 6

FIGURA 1- Diagrama de Venn demonstrando esquematicamente a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal e bolsa periodontal.

Tabela 2 - Número de indivíduos que apresentaram espécies de Candida na cavidade bucal e bolsa periodontal de acordo com o sexo

Sexo	Casos positivos		Casos negativos		Total
	n	n	%	n	%
Masculino	16	45,71	19	54,29	35
Feminino	15	28,31	38	71,69	53

Teste Qui-quadrado ($c^2= 2,17$, $gl= 1$, $p= 0,1407$)

Tabela 3 - Número de indivíduos que apresentaram espécies de Candida de acordo com a faixa etária

Faixa etária	Casos positivos		Casos negativos		Total
	n	n	%	n	%
25 – 30	3	25	9	75	12
31 – 40	13	43,34	17	56,66	30
41 – 50	13	34,2	25	65,8	38
51 – 60	2	25	6	75	8

Teste de aderência de Kolmogorov-Smirnov ($gl= 2$, $p= 0,6947$)

Tabela 4 - Número de indivíduos que apresentaram espécies de Candida de acordo com o hábito de fumar

	Casos positivos		Casos negativos		Total
	n	n	%	n	%
Fumantes	9	45	11	55	20
Não fumantes	22	32,35	46	67,65	68

Teste Qui-quadrado ($c^2= 0,834$, $gl= 1$, $p= 0,5164$)

Tabela 5 - Número de indivíduos que apresentaram espécies de Candida de acordo com a profundidade de bolsa periodontal

Profundidade da bolsa periodontal em mm	Casos positivos		Casos negativos		Total
	n	%	n	%	n
5 – 6	11	43,3	15	57,7	26
7 – 8	14	34,15	27	65,85	41
9 – 10	6	28,6	15	71,4	21

Teste de tendência Qui-quadrado ($c^2= 0,9365$, $gl= 1$, $p= 0,3332$)

Tabela 6 - Distribuição de frequência de biotipos killer e grau de atividade enzimática de proteinase e fosfolipase de amostras isoladas da cavidade bucal de indivíduos com periodontite crônica

Espécies	Biotipo killer	n	Fosfolipase – GAE			Proteinase – GAE		
			1	2	3	1	2	3
	111	16	2	6	8	1	0	15
<i>C. albicans</i>	114	06	1	1	4	1	0	5
	414	06	4	1	1	1	0	5
Total		28	7	8	13	3	0	25
<i>C. tropicalis</i>	111	02	1	0	1	1	0	1
	114	1	1	0	0	1	0	0
	414	1	0	0	1	0	0	1
	888	1	0	0	1	0	0	1
Total		5	2	0	3	2	0	3
<i>C. glabrata</i>	111	1	1	0	0	1	0	0
	114	1	0	1	0	1	0	0
	414	1	0	0	1	1	0	1
Total		3	1	1	1	3	0	0
Total de espécies		36						

GAE – Grau de atividade enzimática: 1) negativo, 2) positivo, 3) fortemente positivo

Tabela 7 - Distribuição de frequência de biotipos killer e grau de atividade enzimática de proteinase e fosfolipase de amostras isoladas da bolsa periodontal de indivíduos com periodontite crônica

Espécie	Biotipo killer	n	Fosfolipase – GAE			Proteinase – GAE		
			1	2	3	1	2	3
<i>C. albicans</i>	111	6	1	3	2	0	0	6
<i>C. glabrata</i>	111	1	0	0	1	0	0	1
Total de espécies		7	1	3	3	0	0	7

GAE – Grau de atividade enzimática: 1) negativo, 2) positivo, 3) fortemente positivo

DISCUSSÃO

A porcentagem de isolamento do gênero *Candida* a partir da cavidade bucal, segundo relatos da literatura, apresenta variação de 30 a 60%^{19,34,48}. No presente trabalho, resultado semelhante foi observado, sendo que 31,82% dos indivíduos examinados apresentaram *Candida* na cavidade bucal.

O isolamento deste gênero a partir das bolsas periodontais foi de 7,95%. Considerando-se a similaridade entre a microbiota da doença periodontal e infecção pulpar, verifica-se que tal porcentual de isolamento está de acordo com os dados obtidos por Kubo et al.¹⁶ (1997) que estudaram amostras isoladas do canal radicular utilizando a mesma metodologia de coleta.

Nenhuma correlação pôde ser observada entre o isolamento de *Candida* e o sexo, faixa etária e o fumo. Na literatura, a correlação entre idade avançada e a maior predisposição às candidoses é relatada, em particular em pacientes portadores de prótese total. O percentual de isolamento nos pacientes idosos neste estudo foi semelhante ao observado para faixa etária entre 25 e 30 anos, possivelmente devido ao fato de terem sido excluídos na seleção os pacientes de prótese.

Outro fator frequentemente citado na literatura como fator predisponente para as candidoses é o fumo²². No entanto, no presente trabalho não foi observada correlação entre o fumo e o maior isolamento de *Candida*.

Leveduras do gênero *Candida* tem sido relacionados com casos de periodontite crônica, principalmente em pacientes submetidos ao tratamento com antibióticos^{35,13}. Nenhuma correlação foi observada, no entanto, entre profundidade de bolsa periodontal e isolamento de leveduras do gênero *Candida*.

C. albicans foi a espécie prevalente nos grupos estudados, seguida de *C. glabrata*, tanto a partir da cavidade bucal quanto da bolsa periodontal, o que está de acordo com os estudos de Jorge et al.¹⁴ (1995).

A produção de substâncias protéicas denominadas fatores *killer* são secretadas *in vitro* por várias amostras de *Candida* e possuem efeito antibiótico para outros fungos e várias bactérias, sendo considerados também como fator de virulência²⁸. O biotipo 111 foi observado freqüentemente nos grupos estudados. Dentre as amostras isoladas da cavidade bucal, foram observados também biotipos 114, 414 e 888. Cem por cento das amostras isoladas das bolsas periodontais foram classificadas com biotipo 111.

Polonelli et al.²⁹ (1983) obtiveram 25 biotipos diferentes numa população de cem amostras, com predominância do biotipo 111 em 52% das cepas isoladas e Magaró et al.¹⁸ (1989) amostras registraram três diferentes biotipos *killer* 111, 241 e 411 em cinquenta amostras

O biotipo 888 não foi freqüente nas observações de Polonelli et al.²⁹ (1983), porém nos resultados do presente estudo foram encontrados sete

cepas com este biotipo. O biotipo 888 significa cepas não tipáveis, ou seja, resistentes a todas as proteínas *killer* produzidas pelas cepas padrão. No ponto de vista epidemiológico, a não tipabilidade é de grande valia, principalmente quando este biotipo é isolado sistematicamente na mesma instituição e/ou sítios anatômicos. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, nenhuma correlação entre os biotipos *killer* e a presença de patologia periodontal foi observada.

C. albicans possui fatores de patogenicidade que possibilitam o agravamento da doença periodontal como a capacidade de invadir o epitélio do sulco, inibição de função dos polimorfonucleares, lisar monócitos, presença de endotoxinas e produção de enzimas. A produção de fosfolipase, juntamente com a proteinase parece exercer papel importante na invasão da célula do hospedeiro^{4,24,27}.

A determinação da produção enzimática de amostras de *C. albicans* e outras espécies, isoladas de diversas condições e de diferentes sítios anatômicos, foi observada por vários autores^{23,25,26,40-1}, que apontaram variações de atividade enzimática entre 60% a 100% para proteinase e 50 a 100% para fosfolipase.

Os dados deste trabalho revelaram que (75%) das 28 cepas de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal, produziram fosfolipase e 89,3% eram produtoras de proteinase. Por outro lado, 21,5% das amostras de *C. albicans* isoladas da cavidade bucal e 28,6% da bolsa periodontal apresentaram forte atividade fosfolipásica e proteinásica. Acreditamos que a produção destas enzimas pelas leveduras, no sulco gengival, possam agir como fator de patogenicidade na doença periodontal.

Importante salientar que a identificação de fatores de virulência, como produção de enzimas por microrganismos presentes no sulco gengival é um dos fatores observados para se considerar um microrganismo como possivelmente envolvido na doença periodontal^{47,20}.

CONCLUSÕES

- a) leveduras do gênero *Candida* foram isoladas da cavidade bucal em 31,82% e na bolsa periodontal em 7,96% dos indivíduos examinados;

b) as espécies mais isoladas da cavidade bucal foram *C. albicans* (83,33% das cepas), *C. glabrata* (10%) e *C. tropicalis* (6,67%). No sulco gengival a espécie mais isolada foi *C. albicans* (85,72%) seguindo-se de *C. glabrata* (14,28%);

c) o biotipo *killer* 111 foi o mais frequentemente isolado tanto na cavidade bucal quanto nas bolsas periodontais examinadas;

d) a maioria das amostras de *C. albicans* apresentaram forte atividade enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Parameter on chronic periodontitis with slight to moderate loss of periodontal support. **J Periodontol**, v.71, n. 5, suppl., p. 853-5, May 2000.
2. AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Parameter on "refractory" periodontitis. **J Periodontol**, v.71, n. 5, suppl., p. 859-60, May 2000.
3. BANNO, Y.; YAMADA, T.; NOZAWA, Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans* separation of three enzymes and some biological properties. **Sabouraudia: J Med Vet Mycol**, v.23, n.1, p.47-54, Feb. 1985.
4. BARRETT-BEE, K. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J Gen Microbiol**, v.131, p. 1217-21, 1985.
5. BENDOVÁ, O. The *killer* phenomenon in yeasts. **Folia Microbiol**, v.31, n.5, p.422-33, 1986.
6. BORG, M.; RÜCHEL, R. Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J Med Vet Mycol**, v. 28, n. 1, p. 3-14, 1990.
7. BORG, M.; RÜCHEL, R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida spp.* during experimental infection of oral mucosa. **Infect Immun**, v. 56, n. 3, p. 626-31, 1988.
8. CUTLER, J.E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Ann Rev Microbiol**, v. 45, p. 187-218, 1991.
9. DAHLÉN, G.; WILKSTRÖN, M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. **Oral Microbiol Immun**, v. 10, n. 1, p. 42-6, 1995.
10. FROST, G.I.; CSÓKA, T.; STERN, R. The hyaluronidases: a chemical, biological and clinical overview. **Trends Glycosc Glycol Technol**, v. 8, n. 44, p.419-34, Nov. 1996.
11. GHANNOUM, M.A.; ABU-ELTEEN, K.H. Pathogenicity determinants of *Candida*. **Mycoses**, v.33, n. 6, p. 265-82, June 1990.
12. GONZALES, S. et al. Yeasts in juvenile periodontitis: preliminary observations by scanning electron microscopy. **J Periodontol**, v.58, p. 119-24, 1987.
13. HELOVUO, H.; HAKKARAINEN, K.; PAUNIO, K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n.2, p.75-9, Apr. 1993.
14. JORGE, A.O.C. **Presença de *Candida* e de anticorpos anti-*Candida* na cavidade bucal de pacientes com periodontite crônica do adulto**. 1995. 210f. Tese (Livro-Docência em Microbiologia e Imunologia) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.
15. KOTHAVADE, R.J.; PANTHAKI, M.H. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. **J Med Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 99-102, Feb. 1998.
16. KUBO, C.H.; GOMES, A.P.M.; JORGE, A.O.C. Isolamento de *Candida* de canais radiculares e verificação da sua sensibilidade a medicamentos utilizados na prática endodôntica. **Rev Odontol UNICID**, v. 9, n. 2, p. 119-30, jul./dez. 1997.
17. LACAZ, C.S. et al. Classificações e caracteres gerais dos fungos. In:_. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**, São Paulo: Sarvier, 1998. Cap.1, p. 3-45.
18. MAGARÓ, H.M.; BIASOLI, M.S.; BRACALENTI, B.J.C. Sistema "killer" en cepas de *Candida albicans*. Part II. **Bol Micol**, v. 4, n. 2, p. 73-6, 1989.
19. MARSH, P.; MARTIN, M. **Oral microbiology**. 3 ed. London: Chapman & Hall, 1992.
20. NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Oral microbiology and Immunology**. 2. Ed. Philadelphia: Saunders, 1994.
21. ODDS, F.C. Introduction and historical Note. In:_. **Candida and candidosis**. London: Baillière Tindall, 1988. Cap.1, p. 1-15.
22. OKSALA, E. Factors predisposing to oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, v. 48, p. 71-4, 1990.
23. OLIVEIRA, E.E. et al. Toxinas *killer* e produção de enzimas por *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 31, n.6, p. 523-27, nov./dez. 1998.
24. OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odontol Scand**, v. 48, p. 45-53, 1990.
25. PAULA, C.R. et al. Oral yeasts in patients with cancer of the mouth, before and during radiotherapy. **Mycopathologia**, v. 112, n. 2, p. 119-24, 1990.
26. PIRES, M.F.C. et al. *Candida albicans* biotipos isolados from the oral cavity of HIV-positive patients. **Rev Microbiol**, v. 27, n.1, p. 46-51, 1996.
27. POLAK, A. Virulence of *Candida albicans* mutants. **Mycoses**, v. 35, p. 9-16, 1992.
28. POLONELLI, L.; MORACE, G. Reevaluation of the yeast *killer* phenomenon. **J Clin Microbiol**, v. 24, n. 5, p. 866-9, Nov. 1986.
29. POLONELLI, L. et al. *Killer* system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J Clin Microbiol**, v. 17, n. 5, p. 774-80, May 1983.
30. POLONELLI, L. et al. Potenzialità del fenomeno killer dei lieviti. **Rev Ibero Amer Micol**, v. 9, p. 23-7, 1992.
31. PRICE, M.F.; CAWSON, R.A. Phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 15, n.2, p. 179-85, July 1977.
32. PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n.1, p. 7-14, Mar. 1982.
33. PUGH, D.; CAWSON, R.A. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorion-allantoic membrane. **Sabouraudia**, v. 15, p. 29-35, 1977.

34. RAMIREZ-Aguilar, M.; PEREZ, M. A.; SANTOS, P. JI. Características biológicas y patogenicidad experimental de cepas de *Candida* aisladas por hemocultivos em el Hospital Infantil de México "Frederico Gomes". **Rev Lat-amer Microbiol**, v. 34 p. 259-65, 1992.
35. RAMS, T. E., Microbiological study of HIV-related periodontitis. **J Periodontol**, v. 62, n. 1, p. 74-81, Jan. 1991.
36. RYDER, M.I. Periodontal management of HIV-infected patients. **Periodontology 2000**, v. 23, p. 85-93, 2000.
37. RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. **In fungal infection diagnosis and management**. Oxford: Blackwell Scientific, 1993.
38. RINALDI, M.G. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In: BODEY, G.P. **Candidiasis: pathogenesis, diagnosis and treatment**. New York: Raven Press, 1993. Cap. 3, p.1-20.
39. RÜCHEL, R. A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. **Zbl Bakt Hyg**, v. 257, n. 2, p. 266-74, July 1984.
40. RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n.3, p. 233-44, Sept. 1982.
41. SAMARANAYAKE, L.P.; RAESIDE, J.M.; MacFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Sabouraudia: J Med Vet Mycol**, v. 22, p. 201-7, 1984.
42. SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand**, v. 48, n. 1, p. 27-36, Feb. 1990.
43. SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C. Presença de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* na cavidade bucal humana. **Rev Odontol UNESP**, v. 27, n. 2, p. 473-84, 1998.
44. SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and oral candidosis: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 5, n. 2, p. 125-57, 1994.
45. SLOTS, J.; RAMS, T.E.; LISTGARTEN, M.A. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v. 3, n. 2, p. 47-52, 1988.
46. SPOLSKY, R. Epidemiologia das doenças gengival e periodontal. In: CARRANZA, JUNIOR. F.A. **Glickman periodontia clínica**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. Cap. 22, p. 229-48.
47. SOCRANSKY, S. S. et al. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. **J Clin Periodontol**, v. 18, p. 766-75, 1991.
48. WRAY, D.; FELIX, D.H.; CUMMING, C.G. Alteration of humoral responses to *Candida* in HIV infection. **Br Dent J**, v.168, p. 326-9, 1990.