

THAÍS DOS SANTOS FONTES PEREIRA

**CINÉTICA DA COLONIZAÇÃO BUCAL POR
Candida spp. DURANTE A CORTICOTERAPIA
TÓPICA.**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2014

THAÍS DOS SANTOS FONTES PEREIRA

**CINÉTICA DA COLONIZAÇÃO BUCAL POR
Candida spp. DURANTE A CORTICOTERAPIA
TÓPICA.**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia - área de concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Coorientadores: Prof. Dr^a. Jeane de Fátima Correia Silva Alves e Prof. Dr^a Maria Aparecia de Resende Stoianoff

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - UFMG

BELO HORIZONTE

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

P436c
2014
T
Pereira, Thaís dos Santos Fontes.
Cinética da colonização bucal por *Candida* spp. durante a corticoterapia tópica [manuscrito] / Thaís dos Santos Fontes Pereira. – 2014.
80 f.: il.

Orientador: Ricardo Santiago Gomez
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Doenças da boca. 2. Mucosa bucal. 3. Candidíase bucal.
I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

CINÉTICA DA COLONIZAÇÃO BUCAL POR *Candida* spp. DURANTE A CORTICOTERAPIA TÓPICA.

THAIS DOS SANTOS FONTES PEREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ESTOMATOLOGIA.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Jeane de Fátima Correia Silva Alves
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Renata Gonçalves de Resende
Hospital Municipal Odilon Behrens

Prof(a). Daniel de Assis Santos
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA THAIS DOS SANTOS FONTES PEREIRA

Realizou-se, no dia 26 de fevereiro de 2014, às 09:00 horas, Sala 3418, Faculdade de Odontologia - UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *CINÉTICA DA COLONIZAÇÃO BUCAL POR Candida spp. DURANTE A CORTICOTERAPIA TÓPICA.*, apresentada por THAIS DOS SANTOS FONTES PEREIRA, número de registro 2012778423, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Ricardo Santiago Gomez - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Jeane de Fátima Correia Silva Alves (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Renata Gonçalves de Resende (Hospital Municipal Odilon Behrens), Prof(a). Daniel de Assis Santos (Universidade Federal de Minas Gerais).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2014.

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez (Doutor)

Prof(a). Jeane de Fátima Correia Silva Alves (Doutora)

Prof(a). Renata Gonçalves de Resende (Doutora)

Prof(a). Daniel de Assis Santos (Doutor)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo contínuo apoio, pela educação e valores que me ensinaram através do exemplo.

À minha irmã pela amizade e compreensão.

Ao Pedro pelo carinho e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez agradeço pela oportunidade e exemplo de profissionalismo.

À Prof. Dr.^a Jeane pela atenção, compreensão e paciência para transmitir importantes ensinamentos.

À Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida pela colaboração atenciosa.

Aos professores da Faculdade de Odontologia e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Aos colegas de graduação, iniciação científica, mestrado e doutorado pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia Patológica da FO-UFMG, pelo apoio sempre que necessário.

Aos pacientes, doadores e familiares que gentilmente colaboraram para a realização deste estudo.

APOIO FINANCEIRO

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPQ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*"Que ninguém se engane: só se consegue
a simplicidade através de muito trabalho."*

Clarice Lispector

RESUMO

A candidíase bucal é uma importante alteração secundária à corticoterapia tópica bucal. O presente estudo tem o objetivo de avaliar a colonização bucal por cinco espécies de *Candida* durante a corticoterapia tópica e investigar a patogenicidade e a suscetibilidade *in vitro* ao fluconazol e à anfotericina B. Amostras de raspado bucal de 11 pacientes com líquen plano bucal (LPB) sintomático foram coletadas antes (dia 0), 7 e 30 dias após o início da corticoterapia. Métodos convencionais de identificação e quantificação de *Candida* spp., testes de patogenicidade e de susceptibilidade *in vitro* ao fluconazol e à anfotericina B e PCR em tempo real quantitativo (qPCR), foram realizados. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente na mucosa oral durante a corticoterapia. Aumento do número de unidades formadoras de colônia (UFC) e de cópias de DNA de *C. albicans* foi observado até o dia 30, apesar de não haver evidências clínicas de candidíase em nenhum paciente neste intervalo. A contagem de UFC foi menos sensível que o qPCR, mas ambos os métodos correlacionaram positivamente. Não foi observada resistência ao fluconazol ou à anfotericina B. Corticoterapia tópica bucal foi associada ao aumento de *Candida* spp., principalmente *C. albicans*, na cavidade bucal, independentemente de manifestação clínica da doença.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Candida* spp.; corticoide; líquen plano.

ABSTRACT

Kinetics of oral colonization by *Candida* spp. during topical corticotherapy

Oral candidiasis is an important side effect of oral topical corticotherapy. The purpose of the present study is to assess oral mucosa colonization by 5 *Candida* species during topical corticotherapy and to investigate *Candida* spp. pathogenicity and *in vitro* susceptibility to fluconazole and amphotericin B. Oral swabbing samples from 11 symptomatic oral lichen planus patients were collected before (day 0) and at days 7 and 30 of topical corticotherapy. Conventional methods for identification and quantification of *Candida* species, quantitative PCR (qPCR), pathogenicity tests and *in vitro* susceptibility to fluconazole and amphotericin B assays were performed. *Candida albicans* was the most prevalent species in the oral mucosa during corticotherapy. Increased number of colony-forming units (CFU) and *Candida albicans* DNA copies were observed at day 30 of corticotherapy, despite no clinical evidence of candidiasis in any patient. CFU count of *Candida* species was less sensitive than qPCR, but both methods positively correlated. No resistance to fluconazole or amphotericin B was observed. Oral topical corticoid was associated with increase of *Candida* spp., in particular, *C. albicans*, in the oral cavity, independent of clinical manifestation of the disease.

Keywords: *Candida albicans*; *Candida* spp.; corticotherapy; lichen planus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Lesão de LPB erosivo em borda lateral de língua..... 20

Figura 2: Curva padrão gerada por diluições seriadas (10^2 a 10^{10}) e eficiência de amplificação (Eff%) de aproximadamente 100% do gene alvo de *C. albicans*. Eixos Y: Ciclo *threshold* (Ct); X: Quantidade (cópias de DNA)..... 48

Figura 3: Curvas de dissociação obtidas no qPCR, temperaturas de *melt* e desvio padrão de (A) *C. tropicalis*. (B) *C. albicans*. (C) *C. dubliniensis*. (D) *C. glabrata*. (E) *C. parapsilosis*. 49

ARTIGO

Figura 1: Número de pacientes com colonização bucal por *Candida* spp., detectada por métodos fenotípicos, antes do uso de corticoide tópico (dia 0) e durante a corticoterapia (dias 7 e 30). [Figure 1: Number of patients with oral mucosa colonization by *Candida* spp. detected by phenotypic methods before topical corticoid use (day 0), and during corticotherapy (days 7 and 30)].....54

Figura 2: Quantificação de UFC dos pacientes nos dias 0, 7 e 30 de tratamento. [Figure 2: Patients' CFU quantification at day 0, day 7 and day 30 of treatment].54

Figura 3: Média e desvio padrão da quantificação de cópias de DNA de cada espécie de *Candida* por dia de coleta. [Figure 3: Mean and standard deviation of the quantification of DNA copy number from each *Candida* spp. by day of sample collection].....55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para qPCR.....46

ARTIGO

Tabela 1: Características dos indivíduos com líquen plano erosivo incluídos no estudo [Table 1: Characteristics of subjects with erosive oral lichen planus (OLP) included in the study].....54

ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CD4+	Linfócito T citolítico CD4+
CD8+	Linfócito T citotóxico CD8+
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DHEA	Deidroepiandrosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
IL	Interleucina
LP	Líquen Plano
LPB	Líquen Plano Bucal
MB1	Meio Básico 1
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase Chain Reaction
qPCR	PCR quantitativo
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µg	Micrograma
µl	Microlitro
SAP	Proteinase aspartil secretada
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	6
APOIO FINANCEIRO	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS	12
ABREVIATURAS E SIGLAS	13
SUMÁRIO.....	14
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Líquen Plano.....	20
2.2 <i>Candida</i> spp.....	27
2.3 Antifúngicos	31
2.4 Corticoterapia e Candidíase	32
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	37

4.1 Objetivo Geral.....	38
4.2 Objetivos Específicos.....	38
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1 Aspectos Éticos	40
5.2 Amostra e Pacientes.....	40
5.3 Ensaio Microbiológicos	41
5.3.1 Microcultivo	41
5.3.2 Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC)	42
5.3.3 Teste de suscetibilidade a antifúngicos.....	43
5.3.4 Produção de Protease.....	44
5.3.5 Produção de fosfolipase.....	45
5.4 Ensaio de Biologia Molecular.....	45
5.4.1 Extração de DNA.....	45
5.4.2 PCR em tempo real quantitativo (qPCR).....	46
5.5 Análise Estatística	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58

8 CONCLUSÕES	62
9 REFERÊNCIAS	64
10 ANEXOS	74
10.1 Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa de Universidade Federal de Minas Gerais.....	75
10.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	76

1 INTRODUÇÃO

Candida spp. é um gênero de fungos patogênicos comensais e oportunistas que promovem infecção bucal na presença de fatores predisponentes do hospedeiro. *C. albicans* corresponde a aproximadamente 50% das leveduras isoladas em seres humanos (Bow, 2009). No entanto, a incidência de espécies não-*albicans* tem aumentado recentemente (Falagas *et al*, 2010).

Corticosteroides são recomendados para o tratamento de sintomas associados a doenças imunologicamente mediadas como o líquen plano bucal (LPB). A forma erosiva do LPB frequentemente provoca sintomatologia dolorosa e desconforto ao paciente (Eisen *et al*, 2005). Corticosteroides de maior potência, como o propionato de clobetasol, são capazes de reduzir significativamente os sintomas e a extensão das lesões de LPB, entretanto, a infecção secundária por *Candida* ocorre em 12-30% dos casos (Al-Hashimi *et al*, 2007; Lodi *et al*, 2007).

Apesar de a corticoterapia tópica ser um fator predisponente para candidíase (Lodi *et al* 2007), existe pouca informação sobre os efeitos da terapia na colonização bucal de *Candida* spp.. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a cinética da colonização bucal por *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, e *C. tropicalis* em pacientes tratados com corticoterapia tópica bucal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Líquen Plano

O líquen plano (LP) é uma condição dermatológica inflamatória imunomediada, relativamente comum, que pode acometer a mucosa bucal. A prevalência do envolvimento bucal varia de 0,8 a 1,3%, sendo mais comum em mulheres de meia idade (McCartan & Healy, 2008).

As lesões dermatológicas do LP são descritas clinicamente como pápulas poligonais, púrpuras e pruriginosas com linhas brancas reticulares, denominadas estrias de Wickham, que acometem as áreas flexoras, genitais e unhas (Usatine *et al*, 2011). O envolvimento bucal do LP possui duas apresentações clínicas mais comuns, classificadas como reticular e erosiva. A forma reticular, caracterizada pela presença de estrias de Wickham em mucosa jugal bilateral ou outras regiões bucais, é frequentemente assintomática. A forma erosiva caracteriza-se por áreas atróficas e eritematosas em cujas margens são identificadas estrias brancas reticulares, podendo ser encontradas áreas de ulceração sintomáticas (Usatine *et al*, 2011).



Figura 1: Lesão de LPB erosivo em borda lateral de língua.

As características histopatológicas do LPB envolvem dano aos queratinócitos basais por apoptose, presença de áreas de hiperqueratose e infiltrado inflamatório crônico em banda no tecido conjuntivo subjacente que se estende para a camada basal do epitélio, causando destruição da mesma. Há um aumento da distribuição de linfócitos T citolíticos CD4+ e citotóxicos CD8+ na lâmina própria, predominantemente na região sub-basal (Popovska *et al*, 2013). Essas características são comuns a outras doenças como a reação liquenóide ao amálgama, o eritema multiforme, a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), entre outras. Sendo assim, é imprescindível associar as características clínicas às histopatológicas para conclusão do diagnóstico de LPB (Thornhill *et al*, 2006).

Os critérios de diagnóstico do LPB estabelecidos pela OMS foram revistos por van der Meij e van der Waal (2003) devido à falta de correlação clinicopatológica observada na avaliação de casos de LPB. São considerados os seguintes critérios clínicos: 1) presença de lesões bilaterais mais ou menos simétricas, 2) estrias reticulares brancas/ acinzentadas ligeiramente elevadas (padrão reticular), 3) lesões erosivas, atróficas, bolhosas ou em placa são consideradas subtipos apenas na presença de lesões reticulares. Histopatologicamente, adotaram-se os seguintes critérios: 1) presença de uma banda bem definida de infiltração celular, confinada à parte superior do tecido conjuntivo, constituída principalmente de linfócitos, 2) Sinais de degeneração da camada basal, 3) ausência de displasia epitelial. Uma lesão semelhante ao LPB, que não preenche os requisitos clínicos ou histopatológicos, deve ser

denominada “compatível clinicamente” ou “compatível histopatologicamente” com LPB, respectivamente (van der Meij & van der Waal, 2003).

A etiopatogenia do LP ainda não foi completamente elucidada. Linfócitos T citotóxicos CD8+ podem desencadear apoptose em queratinócitos apresentadores de antígenos específicos, sendo mantidos por mecanismos associados à inflamação pré-existente (Sugerman *et al*, 2002). Observou-se um aumento da distribuição e da frequência de linfócitos T CD4+ e CD8+, predominantemente na região sub-basal e raramente na região intraepitelial (Popovska *et al*, 2013).

Os queratinócitos são importantes para preservação da estrutura da membrana basal do epitélio através da produção de colágeno tipo IV, tipo VII e laminina (Marinkovich *et al*, 1993; Lee *et al*, 2005), influenciada pela interação com fibroblastos do tecido conjuntivo (Lee *et al*, 2005). Dessa forma, a apoptose de queratinócitos parece estar envolvida na ruptura da membrana basal (Sugerman *et al*, 2002).

Ao exame microscópico, o LPB apresenta células CD8+ concentradas na lâmina própria, em regiões de continuidade da membrana basal. Existe um aumento da densidade de mastócitos (Zhou *et al*, 2002; Kapoor *et al*, 2013) e linfócitos T CD8+ intraepiteliais nas regiões de ruptura da camada basal (Zhou *et al*, 2002). Esses achados suportam a hipótese de que os mastócitos estão envolvidos na ruptura da camada basal, facilitando a migração de células T CD8+ (Zhou *et al*, 2002). Ambos os mecanismos podem estar envolvidos na patogênese do LPB, o rompimento da membrana basal pode resultar em

apoptose de queratinócitos, que se tornam incapazes de reparar a membrana basal rompida (Sugerman *et al*, 2002).

Os mastócitos são células responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias no tecido conjuntivo que influenciam a progressão e manutenção da cronicidade do LPB (Sharma *et al*, 2011). Reações liquenóides compreendem lesões com etiologias reconhecidas e características clínicas e histopatológicas semelhantes ao LPB (Jahanshahi *et al*, 2010). A contagem de mastócitos é semelhante em lesões de reação liquenóide e de LPB (Jahanshahi *et al*, 2010; Sharma *et al*, 2011; Ghalayani *et al*, 2012), no entanto, a quantidade de mastócitos degranulados, fator de necrose tumoral (TNF- α) positivos e a proporção entre mastócitos degranulados e a população total dessas células são significativamente menores no LPB (Jahanshahi *et al*, 2010; Ghalayani *et al*, 2012). Estudos sugerem que, esses parâmetros podem ser incluídos nos critérios de diagnóstico dessas lesões (Ghalayani *et al*, 2012).

A proteína Foxp3 (*forkhead box P3*), um marcador específico para as células T reguladoras, e a interleucina 17 (IL-17), uma citocina específica de células T auxiliares, podem estar envolvidos na patogênese do LP (Shen *et al*, 2013). Um estudo recente avaliou pacientes com LPB ou com LP cutâneo e adotou como grupo controle, indivíduos saudáveis que seriam submetidos à cirurgia plástica ou ortognática, respectivamente. A expressão de Foxp3 e IL-17 no LPB foi significativamente maior em comparação com os controles e com o LP cutâneo. Observou-se uma correlação positiva entre Foxp3 e a expressão IL-17 (Shen *et al*, 2013).

A influência de fatores psicossociais na etiopatogenia do LPB é controversa. A associação entre o estresse e o LPB foi estudada por diversos autores (Hampf *et al*, 1987; McCartan, 1995; Burkhart *et al*, 1996). Girardi *et al* (2011) não encontraram diferença significativa dos graus de ansiedade, depressão, estresse e dos níveis salivares de dehidroepiandrosterona (DHEA) e cortisol entre pacientes com LPB e o grupo controle, constituído de indivíduos sem lesões bucais ou alterações sistêmicas e sem uso de medicações há 30 dias. Shah *et al* (2009) avaliaram os mesmos parâmetros psicológicos e observaram diferença significativa entre os grupos caso e controle, pareado por sexo e idade e composto por indivíduos saudáveis. Os níveis salivares de cortisol estavam elevados em 56% dos pacientes com LPB, revelando uma correlação positiva, mas fraca entre os fatores psicológicos e aumento de cortisol. Um estudo caso-controle, com amostra relativamente maior, constatou que os níveis de ansiedade e de cortisol salivar encontravam-se significativamente mais elevados em pacientes com LPB do que em indivíduos do grupo controle, saudáveis, sem alterações endócrinas ou metabólicas (Koray *et al*, 2003). Kapoor *et al* (2013) observou maior índice de depressão entre os pacientes com LPB do que no grupo controle composto por pacientes saudáveis, sem alterações inflamatórias bucais ou sistêmicas. Um estudo caso-controle pareado por sexo e idade comparou os fatores psicossociais no LPB, com um grupo controle positivo, composto por pacientes com síndrome da ardência bucal, dor facial atípica e síndrome disfuncional de dor miofacial, e com um grupo controle negativo de pacientes saudáveis. Foram observados níveis de estresse, ansiedade e depressão significativamente mais elevados nos grupos LPB e controle positivo do que na população em geral. Nenhuma

diferença significativa foi encontrada entre o LPB e os controles positivos, nos quais os fatores psicossociais são a etiologia exclusiva (Chaudhary *et al*, 2004).

Os corticosteroides são drogas recomendadas para o tratamento de doenças imunologicamente mediadas como o LPB. Caso o paciente não apresente sintomatologia, nenhuma terapia é necessária. O LPB erosivo, frequentemente, causa sintomatologia dolorosa. Geralmente, o uso de corticosteroide tópico é suficiente para resolução dos sintomas em uma ou duas semanas (Edwards & Kelsch, 2002; Eisen *et al*, 2005).

O propionato de clobetasol é um corticosteroide tópico indicado para o tratamento paliativo e sintomático do LPB erosivo, sendo considerado um dos mais efetivos (Campisi *et al*, 2004). Um estudo randomizado duplo-cego comparou a eficácia de duas concentrações (0,025 e 0,05%) deste medicamento em gel de hidroxietilcelulose. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre elas. Houve melhora dos sintomas e do aspecto clínico em todos os casos. No protocolo de tratamento foi utilizado miconazol gel a 2% e digluconato de clorexidina 0,12%, sem álcool como profilaxia antifúngica (Carbone *et al*, 2009).

Medicamentos de segunda escolha, principalmente empregados nos casos refratários ao corticoide tópico, incluem corticoides sistêmicos, retinoides (Scardina *et al*, 2006), agentes imunomoduladores como a ciclosporina (Conrotto *et al*, 2006; Yoke *et al*, 2006), o tacrolimus (Hodgson *et al*, 2003) e o pimecrolimus (Swift *et al*, 2005; McCaughey *et al*, 2011).

A isotretinoína é um retinoide que proporciona melhora dos sintomas e resolução das úlceras e erosões do LPB, utilizando a concentração de 0,18%. Aumento da dor e sensibilidade a alimentos quentes são efeitos transitórios associados à aplicação do medicamento (Scardina *et al*, 2006).

Um ensaio clínico randomizado comparou a efetividade da ciclosporina com o propionato de clobetasol para o tratamento sintomático do LPB erosivo (Conrotto *et al*, 2006). A ciclosporina proporcionou resultados mais duradouros após encerramento da terapia, menos efeitos adversos e melhora da sintomatologia similar ao propionato de clobetasol. No entanto, a ciclosporina foi menos efetiva para resolução clínica das lesões e seu custo foi muito mais elevado (Conrotto *et al*, 2006). Outro estudo mostrou que a ciclosporina não é mais efetiva que a triancinolona acetonida para o tratamento sintomático do LPB e não apresentou um bom custo-benefício (Yoke *et al*, 2006).

Tracolimus tópico a 0,1% pode ser utilizado para tratamento de úlceras e erosões de LPB em longo prazo, pois não possui efeitos adversos notáveis num intervalo médio de 19,8 meses. Proporciona resolução parcial das lesões clínicas em 80% dos casos, podendo provocar alteração transitória de paladar e sensação de ardência durante o tratamento (Hodgson *et al*, 2003).

Pimecrolimus tópico a 0,1% foi efetivo para a redução da gravidade do LPB erosivo, da dor, do tamanho das erosões e do eritema. Baixos níveis séricos detectados nos pacientes tratados e ausência de efeitos adversos evidenciam que o medicamento é seguro e bem tolerado pelos pacientes (McCaughey *et al*, 2011).

Sonthalia *et al* (2012) observaram que o tracolimus tópico a 0,1% proporciona resposta 30% superior, comparado ao propionato de clobetasol a 0,05%, sendo uma alternativa ao corticoide tópico para o tratamento sintomático do LPB.

Thongprasom *et al* (2003) avaliaram a efetividade de diferentes formas de aplicação de acetato de fluocinolona, 0,1%, para o tratamento do LPB a longo prazo. A apresentação em veículo adesivo proporcionou a remissão completa das lesões em 77,3% dos casos e foi significativamente mais efetiva do que a suspensão oral (Thongprasom *et al*, 2003).

O uso de corticoides sistêmicos não é indicado para o tratamento sintomático do LP com manifestação restrita à mucosa bucal, pois não traz benefícios adicionais à corticoterapia tópica, apresenta maior custo e mais efeitos adversos (Carbone *et al*, 2003).

Embora os corticoides tópicos sejam considerados o tratamento de primeira escolha para o LPB, segundo Lodi *et al* (2012) não há evidências científicas para afirmar que essa modalidade de tratamento seja superior a outras empregadas para mesma finalidade.

2.2 *Candida* spp.

O gênero *Candida* tem aproximadamente 200 espécies e apenas um número relativamente pequeno delas apresenta importância clínica em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (Bow, 2009; Zomorodian *et al*, 2011). Cerca de 80% dos indivíduos

saudáveis apresentam colonização por uma ou mais espécies de *Candida*. *C. albicans* representa metade a dois terços das leveduras isoladas em humanos e é responsável pela maioria dos casos de candidíase bucal e sistêmica (Bow, 2009). É dimórfica, sendo uma das poucas espécies capazes de produzir hifas verdadeiras, assim como *C. dubliniensis*. Apesar da semelhança morfológica entre ambas as espécies, *C. albicans* é um patógeno com maior habilidade para se adaptar a ambientes desfavoráveis (McManus & Coleman, 2013).

A variabilidade de cariótipos de *C. albicans* pode ser atribuída às regiões de repetição de grandes sequências. Estes *hotspots* recombinantes são compostos de três sub-regiões conhecidas como domínios RB2, RPS e HOK (McManus & Coleman, 2013). A sub-região RPS de *C. dubliniensis* contém maior número de subunidades do que os isolados de *C. albicans*, indicando maior variabilidade cariotípica. A instabilidade cariotípica pode contribuir para a diminuição da patogenicidade de *C. dubliniensis* (Magee et al, 2008).

Recentemente, observou-se que *C. albicans* é capaz de gerar diversidade genética através de eventos recombinantes. Alterações significativas em seu genoma podem ser produzidas rapidamente e propagadas por células mitóticas em resposta a condições desfavoráveis de crescimento, inclusive durante a exposição a antifúngicos (Selmecki, 2010). A passagem por um hospedeiro vivo propicia maiores alterações genômicas e fenotípicas em isolados clínicos de *C. albicans* quando comparados aos isolados *in vitro*. Essas alterações podem estar associadas à criação de mecanismos de adaptação ao microambiente e ao sistema imune do

hospedeiro, que permitem a colonização comensal e a infecção oportunista (Forche *et al*, 2009).

A colonização assintomática por *Candida* spp. pode ocorrer inclusive em pacientes sob terapia antifúngica (Lodi *et al*, 2007). O aumento da carga de *Candida* spp. determinada pela quantificação de unidades formadoras de colônias na saliva (UFC/mL) foi sugerido como um parâmetro para identificação de infecção por *Candida* spp. (Epstein *et al*, 1980), mas não há consenso quanto a definição de um valor limite que caracterize colonização ou infecção. Por outro lado, foram descritos valores elevados de UFC em pacientes assintomáticos (Budtz-Jørgensen *et al*, 1981; Oliver & Shillitoe, 1984).

A densidade de colônias de *C. albicans* e a incidência de outras espécies parece ser maior em pacientes diabéticos (Kadir *et al*, 2002) e usuários de próteses dentárias inadequadas (Lyon *et al*, 2006; Lyon & Resende, 2006; Zomorodian *et al*, 2011). Há associação significativa entre a má higiene da prótese e a permanência da mesma durante o dia e a noite com a estomatite protética provocada por *Candida* spp. (Khasawneh & al-Wahadni, 2002). A recorrência da estomatite em pacientes que mantêm uma boa higiene da prótese é baixa. Apesar de antifúngicos, como o itraconazol, serem capazes de reduzir a carga fúngica, pode haver recolonização subsequente por espécies menos sensíveis ou resistentes (Cross *et al*, 2004).

Esses microrganismos patogênicos desenvolveram fatores de virulência associados à invasão dos tecidos e evasão das repostas de defesa do hospedeiro. A avaliação *in vitro* das características da infecção por *C.*

parapsilosis em epitélio bucal humano reconstituído revelou que essa espécie não é altamente invasiva, mas induz danos teciduais significativos. Essa característica parece estar associada à expressão aumentada do gene proteinase aspartil secretada (SAP) (Silva *et al*, 2009). As enzimas hidrolíticas produzidas por *C. albicans* (proteinase, fosfolipase e lipase) foram descritas como responsáveis por digerir moléculas para nutrição, assim como para invasão de tecidos. Existem evidências de que possam atuar destruindo moléculas do sistema imune do hospedeiro para evadir ou resistir à ação antimicrobiana (Schaller *et al*, 2005).

Estudo longitudinal realizado em Hong Kong mostrou a prevalência de candidemia de 9,6 em 1000 admissões em unidades de tratamento intensivo. A *C. albicans* foi a espécie mais prevalente, correspondendo a 56% dos casos, no entanto a espécie *C. tropicalis* também apresentou uma alta incidência (23%) (Yap *et al*, 2009). A avaliação de 100 pacientes imunocompetentes, com candidíase, atendidos na Santa Casa de São Paulo, identificou *C. albicans* como a espécie mais prevalente (76%) seguida por *C. Kruzei*, em 19% dos casos (Crocco *et al*, 2004).

Profilaxia com fluconazol ou cetoconazol em pacientes criticamente enfermos reduz a mortalidade por infecções fúngicas invasivas pela metade. Em pacientes com risco aumentado de infecções fúngicas invasivas, profilaxia antifúngica com fluconazol deve ser considerada (Playford *et al*, 2006). Das espécies de *Candida* que causam infecções invasivas, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* representam entre 80 e 90% dos isolados encontrados em análises laboratoriais. Os principais fatores

predisponentes para candidemias são a permanência em unidades de tratamento intensivo, a existência de cateter venoso central e, em caso de neonatos, o nascimento prematuro (Aliyu *et al*, 2006). Um estudo retrospectivo, realizado em um hospital de referência de São Paulo, descreveu a incidência de casos de candidíase e identificou que 44% dos casos foram causados por *C. albicans*, seguido por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Foi observado que a incidência de infecção por *C. glabrata* aumentou significativamente de 2006 para 2010 (23.5%). *C. glabrata* foi associada a malignidades e *C. Krusei* a malignidades hematológicas (Moretti *et al*, 2012).

2.3 Antifúngicos

Kuriyama *et al* (2005) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* de *Candida* spp. a sete diferentes antifúngicos. A baixa incidência de resistência ao fluconazol (0-6,8%) foi evidente em todas as espécies estudadas (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e outras espécies). Voriconazol, cetoconazol e miconazol também apresentaram elevada atividade tanto contra *C. albicans*, como não-*albicans*, e 23,7% dos isolados de *C. glabrata* foram resistentes ao itraconazol. Esse estudo demonstra que as espécies bucais de *Candida* apresentam elevada susceptibilidade a uma gama de agentes antifúngicos (Kuriyama *et al*, 2005). Ren *et al* (2014) sugeriram que o conteúdo de ergosterol determina a susceptibilidade de *C. albicans* a azóis e à anfotericina B.

Enxagatórios bucais contendo digluconato de clorexidina ou cloreto de cetilpiridínio, assim como sua combinação, apresentaram atividade fungicida *in*

vitro contra *C. albicans* e espécies emergentes como *C. tropicalis* e *C. krusei* (Giuliana *et al*, 1999; Fathilah *et al*, 2012).

A clorexidina apresentou atividade antifúngica *in vitro* de largo espectro em concentrações detectadas na saliva (≤ 6.25 mg/L) ao utilizar regimes de dosagem padrão. Não foi observada resistência cruzada entre a clorexidina e o fluconazol (Salim *et al*, 2013).

O efeito de enxaguatórios bucais disponíveis comercialmente sobre a prevenção de candidíase em pacientes HIV positivos de foi avaliada por Patel *et al* (2008). Dentre os enxaguatórios bucais (cloridrato de benzidamina, cloridrato de benzidamina com digluconato de clorexidina, triclosan com fluoreto de sódio, bicarbonato de sódio a 5%, ou placebo) testados em 108 pacientes sem candidíase, o triclosan com fluoreto de sódio foi o mais efetivo e proporcionou a diminuição da contagem de *Candida* e aumento do fluxo salivar.

As equinocandinas são agentes antifúngicos, que podem ser usados em alternativa aos azólicos. A caspofungina é um exemplo que apresenta bom desempenho *in vitro* e *in vivo*, sendo indicada para pacientes debilitados, recentemente expostos a agentes azólicos e em risco de infecções causadas por *C. glabrata* ou *C. krusei* (Mayr *et al*, 2012).

2.4 Corticoterapia e Candidíase

Um dos efeitos colaterais mais frequentes após o uso de corticosteroides é a Candidíase. Os corticoides tópicos de maior potência, tais como o propionato de clobetasol, são mais eficazes para o tratamento sintomático de

LPB, no entanto ocorre infecção secundária por *Candida* em 12 a 30% dos casos (Al-Hashimi *et al*, 2007).

O propionato de clobetasol a 0,05% comparado à fluocinonida, a mesma concentração, foi significativamente mais eficaz no tratamento sintomático do LPB erosivo (Carbone *et al*, 1999). Nenhum dos pacientes envolvidos no estudo apresentou candidíase (Carbone *et al*, 1999). No entanto, os grupos estudados receberam terapia antifúngica profilática com miconazol e clorexidina, inviabilizando a avaliação do efeito da corticoterapia sobre o risco de desenvolvimento de candidíase.

Um estudo caso-controle avaliou o desenvolvimento de candidíase após o tratamento sintomático do LPB com propionato de clobetasol 0,05% gel (Lodi *et al*, 2007). O grupo controle foi tratado apenas com o corticoide e o grupo caso, com a associação do corticoide ao miconazol a 2%. O propionato de clobetasol foi capaz de melhorar significativamente os sintomas e a extensão das lesões em até três semanas. Foi observado que cerca de 30% dos pacientes submetidos a esse tratamento podem desenvolver candidíase bucal. O miconazol evitou o desenvolvimento de candidíase no grupo caso (Lodi *et al*, 2007).

A triancinolona acetonida (0,3% a 0,5%) é eficaz para o tratamento tópico do LPB erosivo e apresenta baixa incidência de infecção fúngica secundária ao seu uso (González-Garcia *et al*, 2006).

O aumento do risco de candidíase bucal também foi relatado durante tratamentos envolvendo a inalação de corticoide (Fukushima *et al*, 2003; van

Boven *et al*, 2013) . O risco de desenvolver a micose foi significativamente maior durante os três primeiros meses da corticoterapia (van Boven *et al*, 2013).

Um estudo desenvolvido em modelo animal, utilizando camundongos, relatou a participação de células T CD4+ na manutenção da colonização de *Candida* spp. num período de 20 dias. Foi observada drástica redução do número de células T CD4+ intraepiteliais nos quatro primeiros dias de aplicação de corticoide tópico, concomitante ao aumento da população de *Candida* spp. (Deslauriers *et al*, 1995).

Considerando os estudos apresentados nesta revisão, podemos constatar a ausência de dados sobre a cinética da colonização de espécies de *Candida* após o uso de corticoides tópicos. Esta informação é relevante para conhecermos melhor os efeitos dessa terapia sobre a saúde bucal.

3 JUSTIFICATIVA

A utilização de corticosteroides tópicos para o tratamento do líquen LPB erosivo proporciona melhora dos sintomas, do aspecto clínico e remissão das lesões. Casos mais graves exigem corticosteroides de maior potência como o propionato de clobetasol 0,05%. Cerca de um terço dos pacientes submetidos ao tratamento de LPB desenvolvem candidíase (Lodi *et al*, 2007).

A avaliação dos efeitos quantitativos e qualitativos da colonização bucal por *Candida* spp., ocasionados pela terapia local com corticoide em paciente com LPB, contribuirá para a compreensão da relevância do uso de medicação antifúngica complementar nesses indivíduos. Esta informação é também importante para definição de protocolos utilizados no atendimento odontológico de pacientes com manifestações bucais de doenças imunomediadas.

A identificação de espécies de *Candida*, de fatores de virulência e de resistência a antifúngicos fornecerá evidências sobre o comportamento biológico desses microrganismos na mucosa bucal de pacientes sob corticoterapia tópica, além de informações sobre a eficácia da medicação utilizada para o tratamento dessas infecções.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar alterações qualitativas e quantitativas da colonização por *Candida* spp. na cavidade bucal de pacientes com LPB antes e durante o tratamento com corticoide tópico.

4.2 Objetivos Específicos

Comparar a quantidade de *Candida* spp. presente na mucosa de pacientes com LPB antes, 7 e 30 dias durante a corticoterapia tópica.

Identificar a prevalência das espécies de *Candida* na mucosa bucal de pacientes com LPB, antes, 7 e 30 dias durante a corticoterapia tópica.

Avaliar os fatores de virulência e a suscetibilidade a antifúngicos de *Candida* spp. na mucosa bucal de pacientes com LPB, antes, 7 e 30 dias durante a corticoterapia tópica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) (Anexo A) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), conforme as resoluções CNS nº196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

5.2 Amostra e Pacientes

Foram incluídos 11 pacientes consecutivos com LPB erosivo e sintomático que apresentavam indicação para o tratamento com corticoide tópico (propionato de clobetasol, 0,05%). O diagnóstico de LPB foi confirmado através de análise das características clínicas e histopatológicas (van der Meij *et al*, 2003).

Pacientes em tratamento tópico ou sistêmico com antibióticos, antifúngicos ou corticosteroides em até seis meses antes do estudo, com hipersensibilidade ao propionato de clobetasol, diabetes ou outra alteração sistêmica descompensada, foram excluídos. Possíveis fatores locais que poderiam interferir nos resultados do estudo, como alterações periodontais, higiene bucal deficiente e próteses dentárias inadequadas, foram avaliados e os casos excluídos.

Os pacientes foram tratados com propionato de clobetasol, 0,05%, tópico, três vezes ao dia, por pelo menos 30 dias, até a resolução dos

sintomas. As amostras foram coletadas antes do início do tratamento (dia 0), 7 e 30 dias durante a corticoterapia. Os pacientes foram monitorados quanto aos sinais de candidíase através de exame clínico e citologia esfoliativa com coloração de PAS (ácido periódico de Schiff). Não foi necessário instituir terapia antifúngica no período de estudo, pois nenhum paciente exibiu sinais e sintomas de candidíase. Os intervalos de avaliação e coleta de amostras foram definidos pelo fato de o aumento da contagem de UFC poder ser notado em até 21 dias (Lodi *et al*, 2007). No entanto, todos os pacientes foram acompanhados por 90 dias após o início da corticoterapia.

A coleta de raspado bucal para quantificação de *Candida* spp. por meio de qPCR foi realizada em mucosa jugal, língua e palato, com citobrush estéril e em seguida colocado em um tubo contendo 500 µl de solução de Krebs, centrifugado a 9300 g, em microcentrífuga (Eppendorf – 5415 D), por 10 minutos e armazenado à -20°C até a extração de DNA (Correia-Silva *et al*, 2010). Também foram coletadas amostras de raspado bucal para serem semeadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) (Difco Laboratories, Detroit, USA) com clorofenicol (16 mg/mL). As placas foram incubadas a 28°C por 24 a 48 h (Marinho *et al*, 2010).

5.3 Ensaio Microbiológicos

5.3.1 Microcultivo

A técnica do microcultivo baseia-se no princípio de que leveduras, quando incubadas num meio com Tween-80, apresentam a capacidade de formar pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. Assim, pelas características

morfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie de levedura implicada na identificação. As amostras cultivadas em ASD foram semeadas em CHROMágar *Candida* e isoladas de acordo com a coloração das colônias. As colônias isoladas foram semeadas em ASD e incubadas a 28°C por 48 horas. Em seguida foram semeadas em estrias em ágar fubá e ágar batata em uma lâmina sobre um suporte em uma placa de Petri e cobertas com uma lamínula estéril. Um algodão umedecido com água destilada e estéril foi colocado para fornecer umidade. O conjunto foi mantido a 28°C por três a cinco dias para avaliação morfológica em microscópio.

As espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* não podem ser distinguidas através do CHROMágar *Candida* (Schoofs *et al*, 1997) ou ao exame microscópico. As amostras que apresentaram morfologia correspondente a *C. albicans* ou *C. dubliniensis* no microcultivo e colônia de cor verde no CHROMágar *Candida* foram submetidas ao método identificação baseado na de tolerância térmica. Os isolados foram incubados a 45°C por 48 horas, sendo que as leveduras capazes de crescer nessa temperatura foram consideradas pertencentes à espécie *C. albicans*.

5.3.2 Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC)

Amostras coletadas em solução de Krebs foram centrifugadas a 9300 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi pesado em balança de precisão. Em seguida foi realizada diluição do pellet em 1,0 mL de solução salina estéril. O inóculo foi semeado em ASD com clorofenicol (16

mg/mL) e incubado a 28 °C por 48 h. Foi realizada a contagem das UFC e o cálculo de UFC/g, considerando o peso úmido de cada pellet.

5.3.3 Teste de suscetibilidade a antifúngicos

O meio sintético RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) com L-glutamina, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolino propanosulfônico (MOPS; Sigma) foi preparado de acordo com o documento CLSI M27-A3 (NCCLS / CLSI 2008) e usado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). A suspensão de inóculo foi preparada a partir de culturas fúngicas incubadas a 35°C. O método espectrofotométrico foi usado para obtenção de um inóculo final de $1,5 \pm 1,0 \times 10^3$ CFU ml⁻¹ que foi utilizado no teste de suscetibilidade a antifúngicos.

Foram realizados testes de suscetibilidade ao fluconazol (Pfizer, São Paulo, Brasil) e à Anfotericina B (Sigma). O meio RPMI, sem drogas ou solventes, foi utilizado como controle para proliferação e esterilidade. Diluições em série foram realizadas, utilizando o RPMI como diluente, mantendo um volume constante de 1 ml por tubo. O fluconazol foi testado a dez concentrações que variaram de 64 a 0,125 µg ml⁻¹. Volumes de 100 µl de cada diluição foram distribuídos em microplacas. Diluições seriadas em duplicata foram preparadas segundo o documento CLSI M27-A3. Posteriormente, 100 µl de inóculo de *Candida* spp. proveniente das amostras foram distribuídos nas microplacas, para cada diluição. As placas foram incubadas a 35 ° C durante 48 h. Os pontos finais foram determinados visualmente por comparação com o controle de crescimento livre de droga. A CIM foi expressa em µg ml⁻¹ e

definida como a menor concentração de antifúngico para a qual o conteúdo do poço encontrar-se opticamente claro (Johann S et al, 2007). Processo semelhante foi realizado para o teste de suscetibilidade à Anfotericina B, de acordo o documento CLSI M27-A3.

5.3.4 Produção de Protease

Um meio básico (MB1), constituído de 18,0g de ágar (Difco) e 900,0ml de água destilada, foi esterilizado por meio de autoclave a 120°C por 15 minutos. O meio de albumina para pesquisa de proteinase é constituído de 11,7g de *Yeast Carbon base* (Difco), 2,0g de albumina bovina fração V (Sigma), 2,5ml de Protovit (Roche, Burgdorf, Suíça) e 100,0ml de água destilada. Foi esterilizado através de filtração com filtro de 0,22µm (Millipore, Billerica, MA, USA) e misturado ao MB1, como descrito por Mohan e Ballal (2008).

Para o preparo do inóculo de leveduras as amostras foram repicadas 48h antes da sua utilização. Um inóculo de cada isolado foi semeado em ponto, em duplicata e incubado a 37°C por 72h.

As amostras produtoras de protease produzem um halo de precipitação ao redor do ponto de inoculação. A atividade enzimática é obtida através do quociente do diâmetro da colônia pela soma do diâmetro da colônia com o diâmetro do halo de precipitação. Os valores encontrados foram classificados de acordo com Price, Wikinson e Gentry (1982): ausente (1), positiva ($\leq 0,64$) e fortemente positiva ($> 0,64$).

5.3.5 Produção de fosfolipase

Para a verificação da produção de fosfolipase foi utilizado o meio de cultura composto por 10,00g de peptona, 20,00g de glicose, 57,30g de cloreto de sódio, 0,55g de cloreto de cálcio e 20,00g de ágar. O meio foi esterilizado em autoclave (120°C por 15 minutos) e após resfriado (50°C) foi adicionada emulsão de ovo composta por 80,0g de gema de ovo e 80,0ml de solução fisiológica. Para o preparo da emulsão, os ovos foram submersos em álcool 70% por 1 hora para desinfecção. Então, as gemas foram separadas e colocadas em recipiente estéril, contendo pérolas de vidro, e adicionada solução fisiológica, agitando a solução vigorosamente.

As amostras foram semeadas no meio e incubadas 37°C por quatro dias para leitura do resultado. A interpretação foi semelhante à de produção de proteinase.

5.4 Ensaios de Biologia Molecular

5.4.1 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído com o uso do QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, 1µl de cada amostra foi usado para a quantificação do DNA em NanoDrop (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). Todos os reagentes do kit foram filtrados através de um filtro de 0.22 µm (Millipore) antes do uso (White *et al*, 2003).

5.4.2 PCR em tempo real quantitativo (qPCR)

Quantificação de cópias de DNA das cinco espécies de *Candida* foi realizada através de qPCR com *primers* previamente descritos (Tabela 1) (Khan *et al*, 2009; Yang *et al*, 2011) derivados da região ITS2 de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* (Khan *et al*, 2009).

Tabela 1: Primers utilizados para qPCR.

Espécies	Primer	Sequência 5'-3'	Tamanho do produto
<i>Candida albicans</i>			
	CADET	5'-ATTGCTTGCGGCGGTAACGTCC-3'	105 pb
	CTSR	5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
<i>Candida glabrata</i>			
	CGDET	5'-TAGGTTTTACCAACTCGGTGTT-3'	144 pb
	CTSR	5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
<i>Candida dubliniensis</i>			
	CDDDET	5'-GCTAAGGCGGTCTCTGGCGTCCG-3'	105 pb
	CTSR	5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
<i>Candida parapsilosis</i>			
	CPDET	5'-ACAAACTCCAAACTTCTTCCA-3'	88 pb
	CTSR	5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
<i>Candida tropicalis</i>			
	CTDET	5'-AACGCTTATTTTGCTAGTGGCC-3'	106 pb
	CTSR	5'-TCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
TDH3	Forward	5'-TAACATTATCCCATCTTCCA-3'	229 pb
	Reverse	5'-AGCATCTTCAGTGTAGCCCA-3'	

Foram usados 50 ng de DNA para reação de qPCR, utilizando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (PE Biosystems, Foster City, EUA) sob as seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e um ciclo de extensão final a 72°C por 15 segundos.

Curvas padrão foram obtidas para a quantificação absoluta. O DNA extraído de culturas de células das cepas fúngicas da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA) e da Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Utrecht, Países Baixos) (*C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22 019, *C. glabrata* ATCC 2001 and *C. dubliniensis* CBS 7987) foi utilizado em reação de PCR em tempo real. O produto foi purificado através do método de extração pelo fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) (Invitrogen™, Grand Island, NY, EUA) e precipitação pelo acetato de sódio, de acordo com as instruções do fabricante, e, em seguida, quantificado. O número de cópias de DNA/ μL foi calculado através da fórmula (Godornes *et al*, 2007):

Número de Cópias/ μl =

$$\frac{\text{Concentração DNA (g}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23} \text{ (moléculas/mol)}}{\text{Comprimento do DNA em pb} \times 10^9 \times \text{Peso molecular de um pb de DNA padrão}}$$

Onde, constante de Avogadro = $6,022 \times 10^{23}$; peso molecular de um pb de DNA padrão = 650 Daltons.

A partir da solução estoque pré-quantificada, foram realizadas diluições seriadas com concentrações de 10^2 a 10^{10} cópias de DNA. As curvas padrão foram obtidas pela plotagem dos valores de *Threshold Cycle* (Ct) no eixo-Y e o log da concentração (cópias/ μ l) dos produtos purificados de PCR no eixo-X. Foi realizada regressão linear, gerando-se uma reta cuja inclinação (*slope*) esperada de -3,33 indica 100% de eficiência da reação de PCR (Figura 2).

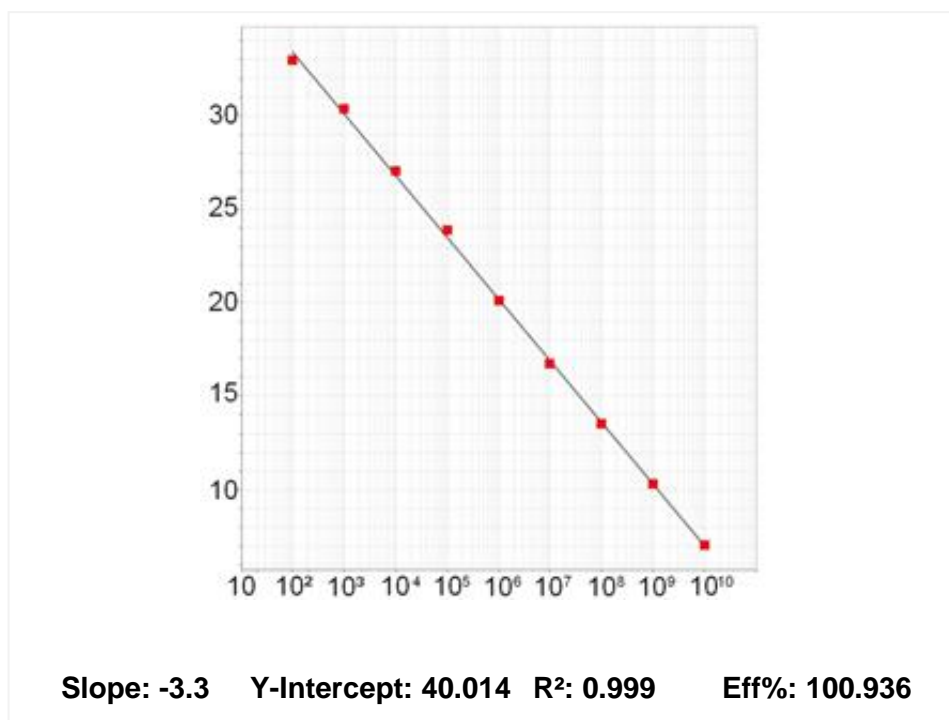


Figura 2: Curva padrão gerada por diluições seriadas (10^2 a 10^{10}) e eficiência de amplificação (Eff%) de aproximadamente 100% do gene alvo de *C. albicans*. Eixos Y: Ciclo *threshold* (Ct); X: Quantidade (cópias de DNA).

O resultado final da quantificação foi obtido a partir do cálculo da média das triplicatas realizadas para cada amostra. Os controles negativos foram realizados substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. Foi realizada análise da curva de dissociação para confirmar a especificidade

da reação (Figura 2). Os ensaios de qPCR foram realizados para quantificação das cinco espécies separadamente, e as amostras de cada paciente foram processadas simultaneamente.

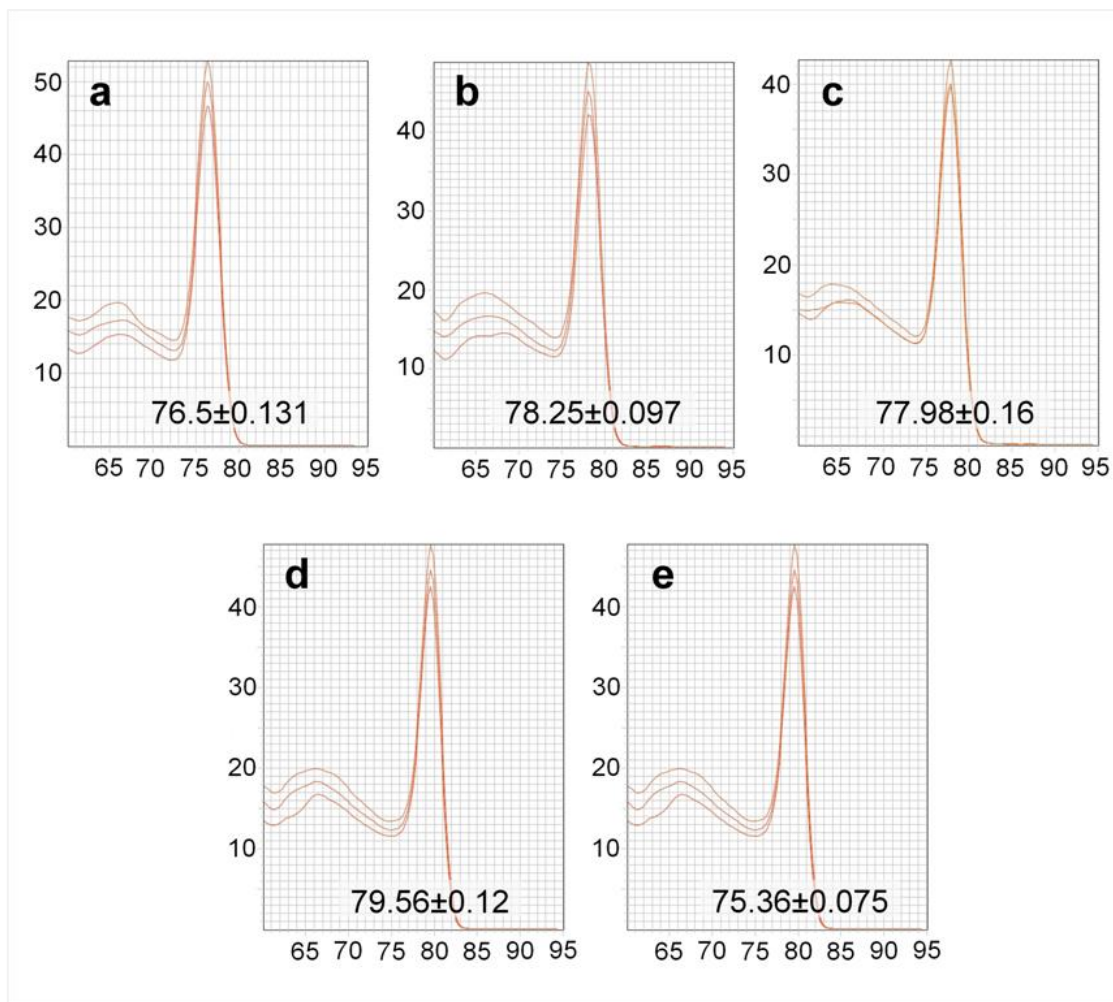


Figura 3: Curvas de dissociação obtidas no qPCR, temperaturas de *melt* e desvio padrão de (A) *C. tropicalis*. (B) *C. albicans*. (C) *C. dubliniensis*. (D) *C. glabrata*. (E) *C. parapsilosis*.

Sob condições de estresse, *C. albicans* pode apresentar variações no número de cópias gênicas (Yang *et al* 2011; Selmecki *et al*, 2010). Realizamos a quantificação do gene *TDH3* da sequência de referência SC5314 que não varia em isolados clínicos para excluir a hipótese de amplificação gênica. Foi

utilizado o método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para determinar o número de cópias de DNA do gene alvo, nos isolados clínicos, relativo ao gene de referência e à amostra calibradora (Livak & Schmittgen, 2001). A partir dos valores de Ct obtidos através do qPCR, foi calculado o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada paciente através da seguinte equação:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \frac{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene alvo}}}{(1+E)^{-\Delta Ct \text{ do gene referência}}}$$

Onde, E= eficiência da reação de PCR; ΔCt do gene alvo = diferença entre o valor de Ct da amostra desconhecida e da amostra calibradora (Ct médio das amostras obtidas no dia 0) para este gene; ΔCt do gene de referência = diferença entre o valor de Ct da amostra desconhecida e da amostra calibradora para este gene.

As amostras obtidas no dia 0, antes do tratamento, foram consideradas amostras calibradoras no cálculo do Ct comparativo (Livak & Schmittgen, 2001). Foi considerada amplificação gênica um aumento maior que duas vezes.

5.5 Análise Estatística

A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov–Smirnov. Para análise estatística empregamos o teste de Friedman, um teste não paramétrico para verificação da diferença entre as amostras dos dias 0, 7 e 30 (SPSS Inc., versão 17.0, Chicago, IL, EUA). Teste de Spearman foi realizado para avaliar a correlação entre os valores obtidos na quantificação através do qPCR e da contagem de UFC/g.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO



Kinetics of oral colonization by *Candida* spp. during topical corticotherapy for oral lichen planus

Thais dos Santos Fontes Pereira¹, Jeane de Fátima Correia Silva Alves¹, Carolina Cavaliéri Gomes², Adriana Rocha do Nascimento³, Maria Aparecida de Resende Stoianoff³, Ricardo Santiago Gomez¹

¹Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Department of Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

BACKGROUND: Oral candidiasis is an important side effect of topical corticotherapy. The purpose of this study was to assess oral mucosa colonization by five *Candida* species during topical corticotherapy and to investigate *Candida* spp. pathogenicity and *in vitro* susceptibility to fluconazole and amphotericin B.

METHODS: Oral swabbing samples from 11 erosive oral lichen planus (OLP) patients were collected before (day 0) and at days 7 and 30 of topical corticotherapy. Conventional methods for identification and quantification of *Candida* species, quantitative PCR (qPCR), pathogenicity tests and *in vitro* susceptibility to fluconazole and amphotericin B assays were performed.

RESULTS: *Candida albicans* was the most prevalent species in the oral mucosa after corticotherapy. Increased number of colony-forming units (CFU) and *Candida albicans* DNA copies were observed at day 30 of corticotherapy, despite no clinical evidence of candidiasis in any patient. Colony-forming units' count of *Candida* species was less sensitive than qPCR, but both methods positively correlated. No resistance to fluconazole or amphotericin B was observed.

CONCLUSIONS: Topical corticoid used for oral erosive lichen planus treatment was associated with increase in *Candida* spp., in particular, *C. albicans*, in the oral cavity, independent of clinical manifestation of the disease.

J Oral Pathol Med (2014)

Keywords: *Candida albicans*; *Candida* spp.; corticotherapy; lichen planus

Introduction

Candida spp. are opportunistic commensal pathogens that promote oral infection under host predisposing conditions. *C. albicans* accounts for approximately 50% of isolated yeasts in humans (1). However, non-*albicans* species incidence has recently increased (2). Corticosteroids are recommended for the treatment of the symptoms associated with immune-mediated diseases such as oral lichen planus (OLP). Erosive OLP is often uncomfortable for the patient causing painful symptoms (3). Topical corticosteroids with greater potency, such as clobetasol propionate, are able to significantly reduce the extent of the lesions and improve symptoms of OLP (4); however, secondary infection with *Candida* occurs in 12–30% of cases (4, 5). Although topical corticotherapy is a predisposing factor for candidiasis (4), there is a lack of information regarding the time-related changes of oral *Candida* spp. colonization during such therapy. Therefore, we assessed the kinetics of *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis* colonization of the oral mucosa in patients treated by oral topical corticotherapy.

Materials and methods

Subjects

The University ethics committee approved the study (Protocol: 11485512.9.0000.5149), and all participants signed a written consent. As topical corticoids are used to control symptoms of patients with erosive OLP, eleven consecutive individuals with this condition were invited to participate in the study. OLP was confirmed by clinical and histopathological diagnosis (6). Subjects under treatment with antibiotics, antifungal or corticosteroids in the 6 months prior to the study, with hypersensitivity to clobetasol propionate, uncontrolled diabetes or other uncontrolled systemic conditions, were excluded. Also, possible local factors that could interfere with the study, such as periodontal alterations, improper dentures and poor oral hygiene, were assessed, and these patients were excluded.

Correspondence: Ricardo Santiago Gomez, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: +55 31 34092477; Fax: +55 31 34092430; E-mail: rsgomez@ufmg.br
Accepted for publication January 28, 2014

2

The patients were treated with topical clobetasol propionate at 0.05%, three times a day, for at least 30 days, until their symptoms improved. Samples were collected before starting the treatment (day 0), and at days 7 and 30 of topical corticotherapy. They were monitored for signs of candidiasis by clinical examination and cytology stained with periodic acid-Schiff (PAS). The assessment period was based on the fact that an increased counting of CFU can be noted within 21 days (4). All the patients were followed up for 90 days after the therapy.

Oral mucosa swabbing was performed in buccal mucosa, palate and tongue with sterile cytobrush and stored in Krebs buffer at -20°C (7). The samples were also placed on Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) with chloramphenicol (16 mg/ml). The plates were incubated at 28°C for 24–48 h (8).

Microbiology assays

Quantification of colony-forming units (CFU)

The oral mucosa swabbing placed in Krebs buffer was used for colony-forming units (CFU) quantification. The content was centrifuged at 9300 g for 10 min, and the supernatant was discarded. The pellet was weighed and diluted in 1 ml of sterile saline. The inoculum was placed on a plate containing Sabouraud dextrose agar (SDA) with chloramphenicol (16 mg/ml) and incubated at 28°C for 48 h. The *Candida* spp. colonies formed were identified and quantified. The number of CFU/g was calculated (9).

Microbiologic identification

Samples were cultured on SDA, seeded on CHROMAgar™ *Candida* (Difco) and incubated at 30°C for 48 h. Selective yeast isolation was performed by detecting colonies of *Candida* spp. color reaction as reported previously (8).

The isolated yeasts were distributed in streaks on culture medium consisting of cornmeal agar (Difco), Tween 80 and distilled water and distributed on microscope slides with a sterile cover slip. Samples were kept in a moist chamber at 28°C for 5 days. Species morphology was analyzed by optical microscopy.

Thermal tolerance

To differentiate the *C. albicans* and *C. dubliniensis* species, cultures that presented green color on CHROMAgar™ *Candida* and exhibited chlamydozoospores in microculture were sown on SDA with chloramphenicol and incubated at 45°C in duplicate. Colonies of *C. dubliniensis* do not grow at 45°C (10).

Production of secretory proteinase and phospholipase activity

The determination of protease production was performed in agar containing BSA (bovine serum albumin), as previously described by Mohan and Ballal (2008) (11), where the isolates were inoculated in a spot in duplicate, following a standard protocol. The phospholipase activity assessment was performed by growing the clinical isolates on egg yolk medium (12). Samples producing exoenzymes should produce a precipitation zone around the inoculation point. The enzyme activity is obtained by dividing the diameter of the colony by the sum of the diameter of the colony with the diameter of precipitation. The final values

are classified according to Price, Wikinson and Gentry (1982) (13).

In vitro susceptibility

The synthetic medium RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine buffered at pH 7.0 with morpholine propanesulfonic acid (MOPS) (Sigma) was prepared according to the CLSI document M27-A3 (NCCLS/CLSI 2008) and used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole and amphotericin B. The inoculum suspension of $1.5 \pm 1.0 \times 10^3$ CFU ml⁻¹ was prepared from fungal cultures incubated at 35°C , using the spectrophotometric method. Minimum inhibitory concentration was expressed in $\mu\text{g/ml}$ and defined as described previously (14).

Molecular biology assays

DNA extraction

DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and quantified in a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA). All reagents were filter-sterilized through 0.2- μm filters before use (15).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Quantification of DNA copies from five *Candida* species was performed by qPCR with previously described primers (16, 17), derived from the ITS2 regions of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis* (16). Reactions were carried out with SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with one cycle of 10 min at 95°C ; 40 cycles of 15 s at 95°C , 1 min at 60°C ; and a final extension cycle at 72°C for 15 s.

Standard curves were obtained for absolute quantification of species of *Candida* DNA copies (7). For construction of the standard curves, we used DNA extracted from cell cultures of fungal strains from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS, Utrecht, The Netherlands) (*C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22 019, *C. glabrata* ATCC 2001 and *C. dubliniensis* CBS 7987). Analysis of the dissociation curve was used to confirm the specificity of the reaction.

As under conditions of stress *C. albicans* can present variations in gene copy number (17, 18), we quantified the *TDH3* gene from a reference-sequencing strain SC5314 that does not vary in clinical isolates (17). We used the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) to determine target gene copy number in the test isolates relative to the reference gene and the reference DNA sample (19). The samples obtained at day 0 were considered control samples in the comparative Ct calculation. Fold change higher than two was interpreted as gene amplification.

Statistical analysis

Data distribution was assessed by Kolmogorov–Smirnov test. Analysis was performed using Friedman test, a nonparametric test for verifying the difference between days 0, 7 and 30 samples (version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Spearman test was performed to evaluate the

correlation between the values obtained from quantification by qPCR and CFU count.

Results

The clinical data of the patients are described in Table 1. None of the patients had uncontrolled systemic disease or were in use of local or systemic medication at least 6 months prior to the study. During the 30 days of the study, no patient presented clinical signs or symptoms of oral candidiasis. However, patient #5 exhibited candidiasis at day 40 of therapy and was treated with miconazole 2%. All the patients were monitored for 3 months after the therapy start. All patients showed improvement in symptoms within 21 days. The resolution of erosive lesions of OLP was observed in the period about 30–40 days.

Microbiology assays

Cultures of *Candida* spp. were positive in six samples (55%) collected at day 0. At day 7 of topical treatment, 10 cultures (90.1%) were positive for *Candida* spp., and all the samples were positive at day 30.

At day 0, all patients had colonization by two or less *Candida* species. At the day 7 of corticotherapy, four patients (36.4%) displayed colonization by between two and four species. After 30 days of corticotherapy, colonization by two to five species was observed in seven (63.7%) patients. *C. albicans* was the most prevalent specie (69.7%). On day 7 and 30 of treatment, the most prevalent species were *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* (Fig. 1).

Thermal tolerance

In the thermal tolerance test, none of the four *C. dubliniensis* samples detected by qPCR grew at 45°C, while four (17.4%) of *C. albicans* viable cultures identified by qPCR were unable to grow at 45°C.

Quantification of colony-forming units (CFU)

An increased number of CFU was observed after seven ($P = 0.014$) and 30 days ($P > 0.05$) of topical corticotherapy (Fig. 2). All patients had CFU counts below 550 CFU/g

Table 1 Characteristics of subjects with erosive oral lichen planus (OLP) included in the study

Case	Age	Sex	Denture wearer	OLP oral site
#1	55	F	No	BBM
#2	51	F	No	BBM
#3	56	F	No	BBM
#4	34	F	No	BBM and left LBT
#5	76	F	Yes	BBM
#6	40	M	No	BBM
#7	37	M	No	BBM and BBT
#8	49	M	No	BBM
#9	41	F	No	BBM
#10	57	F	No	BBT
#11	48	M	No	BBM

BBM, bilateral buccal mucosa. BBT, bilateral border of the tongue. LBT, lateral border of the tongue.

Candida spp. colonization and corticotherapy
Pereira et al.

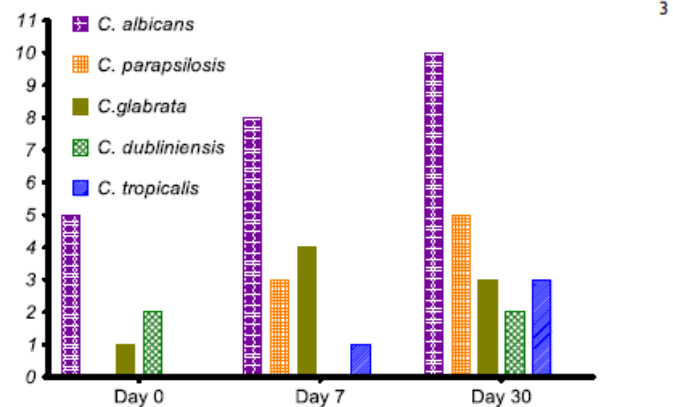


Figure 1 Number of patients with oral mucosa colonization by *Candida* spp., detected by phenotypic methods, before topical corticoid use (day 0) and during corticotherapy (days 7 and 30). One can observe that both number of *Candida* species and number of 'affected' patients increased with the use of topical corticoid. Y-axis: number of patients; X-axis: moment of sampling/analysis.

in the three samples, except in two cases (#5 and #8). While no oral lesion associated with *Candida* species was found in patient #8, patient #5 developed erythematous areas in the mucosa with burning sensation at day 40.

Production of secretory proteinase and phospholipase activity

Only *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* presented positive or strong proteinase activity. Phospholipase activity was found only in cultures of *C. albicans*. At day 0, only two samples (#5 and #9) showed *C. albicans* with positive enzyme activity. At day 7 of treatment, positive or strongly positive enzymatic activity was observed in samples of four patients (#1, #5, #9 and #11). This phenomenon occurred in samples of eight patients (#1, #2, #3, #5, #9, #10, #11 and #12) at day 30 of topical

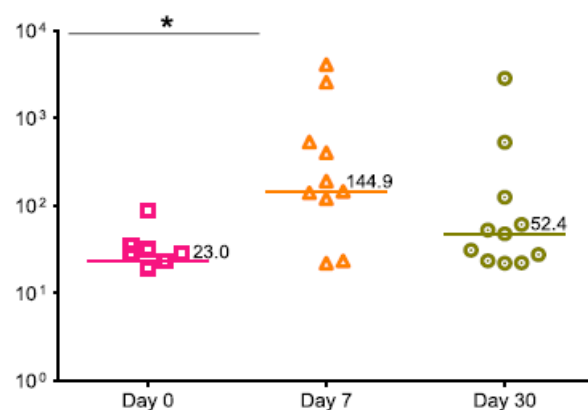


Figure 2 Patients' colony-forming units (CFU) quantification at day 0, day 7 and day 30 of treatment. The median values are represented by horizontal lines. (*) The Friedman test revealed a significant difference between days 0 and 7 ($P < 0.05$). X-axis: the three moments of sample collection. Negative subjects are not plotted on the chart. Y-axis: CFU quantification (logarithmic scale CFU/g).

4

corticotherapy. There was a statistically significant increase in enzymatic activity ($P < 0.05$) at day 30 of treatment, compared with day 0. Only one sample of the patients #2, #5 and #6 showed *C. parapsilosis* positive or strongly positive proteinase activity after the use of corticoid.

In vitro susceptibility

There was no resistance to fluconazole or amphotericin B in any sample during the period of the study.

Molecular biology assays

In Fig. 3, we display the mean number of DNA copies detected by qPCR at days 0, 7 and 30. *C. albicans* showed a significant increase in DNA copy number from day 0 to day 7 ($P < 0.05$). All the *Candida* spp. species showed similar kinetics, except *C. dubliniensis*, which exhibited a reduction at day 7, followed by an increase in the number of DNA copies at day 30 of treatment (Fig. 3).

Differential gene amplification of *C. albicans* was not observed in any sample during the study period using the comparative Ct method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) to determine target gene copy number in the test isolates relative to the reference gene (*TDH3*).

DNA copies of *Candida* species vs. microcultiive experiments

All the positive samples in the microcultiive showed at least 13.49 copies/50 ng of DNA (*C. parapsilosis*) in the qPCR. However, 21 (31%) *Candida* spp. samples detected by qPCR were not identified by microcultiive. Even cases with 47.7 copies of *C. tropicalis* were negative in the microcultiive. Two samples, collected at day 0 (patients #4 and #9) were negative in the microcultiive and qPCR, as well as one collected at day 7 (patient #4). All other samples presented DNA copies of at least one *Candida* specie in the qPCR.

The Spearman correlation test between the values from qPCR quantification and CFU count was 0.782, indicating a positive and strong correlation ($P < 0.0001$).

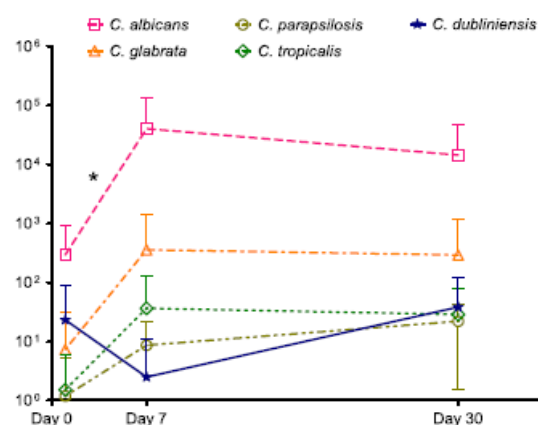


Figure 3 Mean and standard deviation of the quantification of DNA copy number from each *Candida* spp. by day of sample collection. *Significant difference was found only for *C. albicans* between day 0 and day 7. Y-axis: DNA copy number (copies/50 ng of DNA); X-axis: moment of sampling/analysis.

Discussion

Corticosteroids are recommended for the treatment of symptoms associated with immune-mediated diseases such as erosive lichen planus. The major side effects of topical corticosteroids are oral candidiasis or transient burning (4, 20). Topical corticosteroids with greater potency, such as clobetasol propionate, are able to reduce the extent of the lesions and improve symptoms of OLP (4). However, secondary infection with *Candida* occurs in 12–30% of cases (4, 5), and an increased counting of CFU can be noted within 21 days (4). Although clinical studies have already demonstrated candidiasis as a complication of topical corticotherapy, *Candida* spp. were only detected by microcultiive experiments. Moreover, there is no information regarding the kinetics of *Candida* spp. growth assessed by qPCR in the oral mucosa during corticotherapy.

Both quantitative methods employed in our study showed an increase in *Candida* spp., particularly *C. albicans*, after the first 7 days of topical corticotherapy. All studied patients presented *Candida* proliferation, although candidiasis was later observed in only one subject. Although additional studies are necessary to confirm our data, our study demonstrates asymptomatic colonization of the oral mucosa after topical corticosteroid therapy.

Asymptomatic colonization of the oral cavity by *Candida* spp. is frequently found in healthy individuals, and the detection of commensal yeasts is not indicative of infection. The oral candidiasis diagnosis should also be based on medical history and clinical signs and symptoms (21). The asymptomatic carriage of *Candida* spp. can occur even in patients on antifungal therapy (4). An increased candidal load determined by the quantification of CFU/ml of saliva has been described as a parameter to identify an infection by *Candida* spp. (22), but there is no consensus regarding the cut-off values to determine *Candida* infection in an individual. Although levels higher than 400 CFU/ml in saliva culture have been proposed as a cut-off point for candidiasis (22), some authors found higher values in asymptomatic patients (23, 24). Moreover, the *C. albicans* colony density and the incidence of other species seem to be greater in diabetic patients (25) and in inadequate denture wearers (14, 26, 27). In our study, we found positive correlation between CFU counts and the number of DNA copies of the fungi in the qPCR experiments. However, CFU counting showed to be less sensitive than the qPCR in the identification of *Candida* spp., in line with the high-detection sensitivity of qPCR.

The topical corticotherapy was associated with an increase in the number of different *Candida* species in our study. The predominant pathogen is *C. albicans*; however, non-*albicans* *Candida* species, such as *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. glabrata*, are frequently detected, and specific risk factors for particular *Candida* species have been described (28–30). Non-*albicans* *Candida* species are more likely to occur in neutropenic patients or others who have received antifungal therapy with azoles (31). The patients included in our study did not present either of these conditions. We used the reference gene *TDH3* (17) to verify the possibility of *C. albicans* gene amplification due to change of environment; however, this phenomenon was not observed.

Candida spp. can develop virulence factors associated with tissue invasion and evasion of host defense responses (32). Proteinase activity of isolates from individuals with oral candidiasis is higher than that for isolates from 'healthy mouths' (33). In addition, *Candida* phospholipase activity is more frequently found in denture wearers, and a significant correlation was found between higher phospholipase production and adhesion to buccal epithelial cells (14). Although in the present study none of the patients have presented signs or symptoms of oral candidiasis until 30 days of therapy, the analysis of the virulence factors' activity, proteinase and phospholipase, revealed higher number of patients with virulent species after 30 days of topical corticotherapy. *Candida* spp. pathogenicity increased in samples from eight patients. Therefore, *C. albicans* strains associated with oral corticotherapy have higher enzymatic activity even in the absence of clinical disease. Although MIC values >2 µg/ml of fluconazole were correlated with higher phospholipase and proteinase production (14), we found no isolates resistant to fluconazole.

In conclusion, we found increased quantity of *Candida* spp., especially *C. albicans*, in the oral cavity of patients under oral topical corticotherapy used for erosive OLP treatment, even in the absence of clinical evidence of candidiasis. Although increased expression of virulence factors is observed during the period of the medication use, no resistance to fluconazole was identified.

References

- Bow EJ. Invasive fungal infection in haematopoietic stem cell transplant recipients: epidemiology from the transplant physician's viewpoint. *Mycopathologia* 2009; **168**: 283–97.
- Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis* 2010; **14**: e954–66.
- Eisen D, Carozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 2005; **11**: 338–49.
- Lodi G, Tarozzi M, Sardella A, et al. Miconazole as adjuvant therapy for oral lichen planus: a double-blind randomized controlled trial. *Br J Dermatol* 2007; **156**: 1336–41.
- Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB, et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; **103**: S25.e1–12.
- van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med* 2003; **32**: 507–12.
- Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Dis* 2010; **16**: 210–6.
- Marinho AS, Teixeira AB, Santos OS, et al. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Braz J Microbiol* 2010; **41**: 286–94.
- Sanitá PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EM, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: randomized clinical trial. *Int J Prosthodont* 2012; **25**: 232–44.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2093–5.
- Mohan DASV, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 2008; **25**: 208–10.
- Vidotto V, Yumi Koga-Ito C, Milano R, Fianchino B, Pontón J. Correlation between germ tube production, phospholipase activity and serotype distribution in *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 1999; **16**: 208–10.
- Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; **20**: 7–14.
- Lyon JP, de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; **102**: 632–8.
- White PL, Shetty A, Barnes RA. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J Med Microbiol* 2003; **52**: 229–38.
- Khan Z, Mustafa AS, Alam FF. Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect* 2009; **42**: 290–5.
- Yang F, Yan TH, Rustchenko E, et al. High-frequency genetic contents variations in clinical *Candida albicans* isolates. *Biol Pharm Bull* 2011; **34**: 624–31.
- Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2010; **9**: 991–1008.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- Cheng S, Kirtschig G, Cooper S, Thornhill M, Leonardi-Bee J, Murphy R. Interventions for erosive lichen planus affecting mucosal sites. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; **15**: CD008092.
- Manfredi M, Polonelli L, Aguirre-Urizar J, Carozzo M, McCullough M. Urban legends series: oral candidosis. *Oral Dis* 2012; **14**: 245–61.
- Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol* 1980; **12**: 475–6.
- Budtz-Jørgensen E, Theilade E, Theilade J, Zander HA. Method for studying the development, structure and microflora of denture plaque. *Scand J Dent Res* 1981; **89**: 149–56.
- Oliver DE, Shillito EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. *J Oral Pathol* 1984; **13**: 265–70.
- Kadir T, Pisiriciler R, Akyüz S, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiological and systemic factors. *J Oral Rehabil* 2002; **29**: 452–7.
- Lyon JP, da Costa SC, Totti VM, Munhoz MF, de Resende MA. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol* 2006; **52**: 462–7.
- Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol* 2011; **49**: 208–11.
- Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002; **50**: 243–60.
- Nguyen MH, Peacock Je JJ, Morris AJ, et al. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; **100**: 617–23.

- 6
30. Sakharuk NA. The role of various *Candida* species in oral candidiasis etiology in psoriasis and eczema patients. *Stomatologiya (Mosk)* 2013; **92**: 31–3.
 31. Playford EG, Marriott D, Nguyen Q, et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans *Candida* spp. *Crit Care Med* 2008; **36**: 2034–9.
 32. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; **48**: 365–77.
 33. Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol* 2003; **18**: 405–7.

Acknowledgements

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/Brazil and MS/SCTIE/Decit, Brazil. RS Gomez, CC Gomes and MAR Stoianoff are research fellows at CNPq/Brazil.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos prospectivos com maior número de casos podem fornecer evidências sobre sucessão de espécies, desenvolvimento de fatores de virulência e resistência a antifúngicos, que justifiquem o emprego de profilaxia antifúngica durante a corticoterapia tópica.

Apesar do aumento do número de cópias de DNA e de UFC de *C. albicans* durante a corticoterapia tópica, não foram observados sinais e sintomas de candidíase. Portanto, a relevância clínica desses achados não é evidente. A quantificação de *Candida* spp. no dia 30 não foi significativamente superior aos dias 0 e 7. No entanto, houve colonização simultânea por mais de duas espécies na mucosa da maioria dos pacientes e aumento da expressão dos fatores de virulência no dia 30. Dessa forma, podemos sugerir que o corticoide tópico altera o microambiente e favorece a interação de cepas mais virulentas de *Candida*, mas não é suficiente para proporcionar uma infecção clinicamente evidente. O desenvolvimento da infecção por espécies patogênicas de *Candida* resulta do desequilíbrio entre os fatores de virulência dos fungos e a imunidade do hospedeiro, geralmente associado a fatores predisponentes como a corticoterapia (Al-Hashimi *et al*, 2007).

A interação com os mecanismos de defesa do hospedeiro e a alteração do microambiente podem ocasionar alterações no genoma das cepas de *C. albicans*, comprometendo a quantificação através de métodos moleculares (Forche *et al*, 2009). Portanto foi utilizado o método Ct comparativo, considerando as amostras coletadas no dia 0 e o gene TDH3 como referência (Yang *et al*, 2011). A análise dos nossos dados mostra que não houve amplificação gênica devido à corticoterapia. Esse resultado foi também

confirmado pela forte correlação positiva entre os métodos convencional e molecular de quantificação do fungo.

Os benefícios da utilização de antifúngico profilático durante a corticoterapia tópica foram avaliados por Lodi, *et al* (2007) em um ensaio clínico randomizado. O antifúngico profilático não parece influenciar a remissão das lesões erosivas, mas apenas previne o desenvolvimento de candidíase durante o tratamento. No entanto, foi observada colonização assintomática por *Candida* spp. inclusive no grupo tratado com miconazol 2%. Os autores sugerem que a profilaxia antifúngica não é necessária em indivíduos que não apresentem colonização por *Candida* spp. antes da corticoterapia tópica (Lodi *et al*, 2007). Podemos adicionar que a profilaxia antifúngica parece não ser benéfica em pacientes sem fatores predisponentes claros, como tabagismo, higiene bucal deficiente, próteses inadequadas ou alterações sistêmicas descompensadas. Entretanto, as orientações de higiene bucal rigorosa não devem ser negligenciadas.

Diversos métodos fenotípicos de identificação de *Candida* spp. foram desenvolvidos, no entanto, existem limitações que requerem a realização de técnicas de biologia molecular. Apesar de a cultura em CHROMagar *Candida* permitir a identificação de algumas espécies através da cor das colônias, esse método não é capaz de discriminar as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, pois ambas exibem colônias de cor verde (Schoofs *et al*, 1997). Elas também não podem ser distinguidas ao exame microscópico, pois compartilham morfologia semelhante, inclusive a produção de clamidósporos. Foi proposto um método de identificação baseado na tolerância térmica de *C. albicans*, que

consiste em incubar isolados clínicos de *Candida* spp. a 45°C. Apesar de ser um método simples e reprodutível, alguns estudos relataram baixa especificidade (Gales *et al*, 1999). Podemos considerar que a tolerância térmica é um método válido para confirmar a presença de *C. albicans*. Mas não é confiável para identificar *C. dubliniensis* quando o crescimento a 45°C não é detectado, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

O nosso estudo, portanto, ressalta a presença e o aumento da colonização por *Candida* spp. durante a corticoterapia tópica com propionato de clobetasol, ainda que lesões clinicamente evidentes sugestivas de candidíase estejam ausentes. O aumento quantitativo é observado na primeira semana de tratamento. A partir de então, surgem diferentes espécies que se interagem e colonizam simultaneamente a mucosa do hospedeiro. As espécies mais prevalentes nesse momento, como *C. albicans* e *C. parapsilosis*, são capazes de adaptar-se e expressar fatores de virulência. Novos estudos são necessários para avaliar o possível impacto clínico desses achados.

8 CONCLUSÕES

- Existe um aumento significativo da carga de *C. albicans* na primeira semana de uso do propionato de clobetasol.

- No dia 30, foi observada colonização da cavidade bucal por um maior número de espécies simultaneamente. Dessa forma, o corticoide tópico predispõe a mucosa ao aumento individual de espécies de *Candida*, assim como à interação de múltiplas espécies.

- O método molecular de quantificação das espécies de *Candida* é mais sensível do que o método convencional, no entanto, os valores obtidos através de ambos os experimentos se correlacionam positivamente.

- O uso de corticoide tópico não induz resistência ao fluconazol ou à anfotericina B nos isolados clínicos de *Candida* spp.

.- Observou-se aumento progressivo da virulência durante a corticoterapia tópica, sendo que a espécie mais virulenta foi *C. albicans*, seguida por *C. parapsilosis*.

9 REFERÊNCIAS

1. Bow EJ. Invasive fungal infection in haematopoietic stem cell transplant recipients: epidemiology from the transplant physician's viewpoint. *Mycopathologia*. 2009 Dec;168(6):283-97.
2. Budtz-Jørgensen E, Theilade E, Theilade J, Zander HA. Method for studying the development, structure and microflora of denture plaque. *Scand J Dent Res*. 1981 Apr;89(2):149-56.
3. Burkhart NW, Burker EJ, Burker EJ, Wolfe L. Assessing the characteristics of patients with oral lichen planus. *J Am Dent Assoc*. 1996;127:642.
4. Campisi G, Giandalia G, De Caro V, Di Liberto C, Aricò P, Giannola LI. A new delivery system of clobetasol-17-propionate (lipid-loaded microspheres 0.025%) compared with a conventional formulation (lipophilic ointment in a hydrophilic phase 0.025%) in topical treatment of atrophic/erosive oral lichen planus. A Phase IV, randomized, observer-blinded, parallel group clinical trial. *Br J Dermatol*. 2004 May;150(5):984-90.
5. Carbone M, Arduino PG, Carrozzo M, Caiazzo G, Broccoletti R, Conrotto D, Bezzo C, Gandolfo S. Topical clobetasol in the treatment of atrophic-erosive oral lichen planus: a randomized controlled trial to compare two preparations with different concentrations. *J Oral Pathol Med*. 2009 Feb;38(2):227-33.
6. Carbone M, Conrotto D, Carrozzo M, Broccoletti R, Gandolfo S, Scully C. Topical corticosteroids in association with miconazole and chlorhexidine in the long-term management of atrophic-erosive oral lichen planus: a placebo-controlled and comparative study between clobetasol and fluocinonide. *Oral Dis*. 1999 Jan;5(1):44-9.
7. Carbone M, Goss E, Carrozzo M, Castellano S, Conrotto D, Broccoletti R, Gandolfo S. Systemic and topical corticosteroid treatment of oral lichen planus: a comparative study with long-term follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2003 Jul;32(6):323-9.

8. Chaudhary S. Psychosocial stressors in oral lichen planus. *Aust Dent J.* 2004 Dec;49(4):192-5.
9. Conrotto D, Carbone M, Carrozzo M, Arduino P, Broccoletti R, Pentenero M, Gandolfo S. Ciclosporin vs. clobetasol in the topical management of atrophic and erosive oral lichen planus: a double-blind, randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2006 Jan;154(1):139-45.
10. Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LP, Oliveira FE, Costa FO, Xavier SG, Figueiredo-Neves SP, Almeida HC, Bittencourt H, Gomez RS. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):210-6.
11. Crocco, Elisete I., Mimica, Lycia M. J., Muramatu, Laura H., Garcia, Cristina, Souza, Valéria M., Ruiz, Ligia R. B., & Zaitz, Clarisse. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2004 Dec;79(6), 689-97.
12. Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Mar;97(3):351-8.
13. Deslauriers N, Coulombe C, Carré B, Goulet JP. Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1995 Mar;11(1):45-55.
14. Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprasom K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005 Nov;11(6):338-49. Review.

15. Epstein JB, Pearsall NN, Truelove EL. Quantitative relationships between *Candida albicans* in saliva and the clinical status of human subjects. *J Clin Microbiol.* 1980 Sep;12(3):475-6.
16. Falagas ME, Roussos N, Vardakas KZ. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. *Int J Infect Dis.* 2010 Nov;14(11):e954-66.
17. Fathilah AR, Himratul-Aznita WH, Fatheen AR, Suriani KR. The antifungal properties of chlorhexidine digluconate and cetylpyrinidinium chloride on oral *Candida*. *J Dent.* 2012 Jul;40(7):609-15.
18. Forche A, Magee PT, Selmecki A, Berman J, May G. Evolution in *Candida albicans* populations during a single passage through a mouse host. *Genetics.* 2009 Jul;182(3):799-811.
19. Fukushima C, Matsuse H, Tomari S, Obase Y, Miyazaki Y, Shimoda T, Kohno S. Oral candidiasis associated with inhaled corticosteroid use: comparison of fluticasone and beclomethasone. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003 Jun;90(6):646-51.
20. Ghalayani P, Jahanshahi G, Saberi Z. Degranulated mast cells and TNF- α in oral lichen planus and oral lichenoid reactions diseases. *Adv Biomed Res.* 2012;1:52.
21. Girardi C, Luz C, Cherubini K, de Figueiredo MA, Nunes ML, Salum FG. Salivary cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) levels, psychological factors in patients with oral lichen planus.
22. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Jan;87(1):44-9. Erratum in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Apr;87(4):524.

23. Godornes C, Leader BT, Molini BJ, Centurion-Lara A, Lukehart SA. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. *Cytokine*. 2007 Apr;38(1):1-7.
24. Hampf BG, Malmstrom MJ, Aalberg VA, Hannula JA, Vikkula J. Psychiatric disturbance in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1987;63:429-2.
25. Hodgson TA, Sahni N, Kaliakatsou F, Buchanan JA, Porter SR. Long-term efficacy and safety of topical tacrolimus in the management of ulcerative/erosive oral lichen planus. *Eur J Dermatol*. 2003 Sep-Oct;13(5):466-70.
26. Jahanshahi G, Aminzadeh A. A histochemical and immunohistochemical study of mast cells in differentiating oral lichen planus from oral lichenoid reactions. *Quintessence Int*. 2010 Mar;41(3):221-7.
27. Johann S, Soldi C, Lyon JP, Pizzolatti MG, Resende MA. Antifungal activity of the amyirin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Lett Appl Microbiol*. 2007 Aug;45(2):148-53.
28. Kadir T, Pisiriciler R, Akyüz S, Yarat A, Emekli N, Ipbüker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. *J Oral Rehabil*. 2002 May;29(5):452-7.
29. Kapoor C, Wadhwan V, Vaidya S, Malik S. Triology of nitric oxide, mast cell and stress in pathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013 May;17(2):156-62.
30. Khan Z, Mustafa AS, Alam FF. Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009 Aug;42(4):290-5.
31. Khasawneh S, al-Wahadni A. Control of denture plaque and mucosal inflammation in denture wearers. *J Ir Dent Assoc*. 2002;48(4):132-8.

32. Koray M, Dülger O, Ak G, Horasanli S, Uçok A, Tanyeri H, Badur S. The evaluation of anxiety and salivary cortisol levels in patients with oral lichen planus. *Oral Dis.* 2003 Nov;9(6):298-301.
33. Kuriyama T, Williams DW, Lewis MA. In vitro secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Dec;18(6):405-7.
34. Lee DY, Cho KH. The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems. *Arch Dermatol Res.* 2005 Jan;296(7):296-302.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
36. Lodi G, Carrozzo M, Furness S, Thongprasom K. Interventions for treating oral lichen planus: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2012 May;166(5):938-47.
37. Lodi G, Tarozzi M, Sardella A, Demarosi F, Canegallo L, Di Benedetto D, Carrassi A. Miconazole as adjuvant therapy for oral lichen planus: a double-blind randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2007 Jun;156(6):1336-41.
38. Lyon JP, da Costa SC, Totti VM, Munhoz MF, de Resende MA. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol.* 2006 May;52(5):462-7.
39. Lyon JP, de Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Nov;102(5):632-8.
40. Magee BB, Sanchez MD, Saunders D, Harris D, Berriman M, Magee PT. Extensive chromosome rearrangements distinguish the karyotype of the hypovirulent species *Candida dubliniensis* from the virulent *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.* 2008 Mar;45(3):338-50.

41. Manfredi M, Polonelli L, Aguirre-Urizar J, Carrozzo M, McCullough M. Urban legends series: oral candidosis. *Oral Dis.* 2012 Aug 14.
42. Marinho AS, Teixeira AB, Santos OS, Cazanova RF, Ferreira CAS, Cherubini K, Oliveira SD. Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. *Braz. J. Microbiol.* 2010 Jun; 41(2): 286-294.
43. Marinkovich MP, Keene DR, Rimberg CS, Burgeson RE. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn.* 1993 Aug;197(4):255-67.
44. Mayr A, Aigner M, Lass-Flörl C. Caspofungin: when and how? The microbiologist's view. *Mycoses.* 2012 Jan;55(1):27-35.
45. McCartan BE. Psychological factors associated with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1995;24:273–5.
46. McCartan BE, Healy CM. The reported prevalence of oral lichen planus: a review and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008 Sep;37(8):447-53.
47. McCaughey C, Machan M, Bennett R, Zone JJ, Hull CM. Pimecrolimus 1% cream for oral erosive lichen planus: a 6-week randomized, double-blind, vehicle-controlled study with a 6-week open-label extension to assess efficacy and safety. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011 Sep;25(9):1061-7.
48. McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol.* 2013 Nov 19;21C:166-178.
49. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008 Dec 31;25(4):208-10.
50. Oliver DE, Shillitoe EJ. Effects of smoking on the prevalence and intraoral distribution of *Candida albicans*. *J Oral Pathol.* 1984 Jun;13(3):265-70.
51. Patel M, Shackleton JA, Coogan MM, Galpin J. Antifungal effect of mouth rinses on oral *Candida* counts and salivary flow in treatment-naïve HIV-infected patients. *AIDS Patient Care STDS.* 2008 Aug;22(8):613-8.

52. Playford EG, Webster AC, Sorrell TC, Craig JC. Antifungal agents for preventing fungal infections in non-neutropenic critically ill and surgical patients: systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Apr;57(4):628-38.
53. Popovska M, Grchevska L, Popovski V, Atanasovska-Stojanovska A, Minovska A, Belazelkoska Z, Radojkova-Nikolovska V, Mitik K, Strezovska S. T-cell subpopulations in lesions of oral lichen planus. *Prilozi.* 2013;34(2):144-50.
54. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982 Mar;20(1):7-14.
55. Ren B, Dai HQ, Pei G, Tong YJ, Zhuo Y, Yang N, Su MY, Huang P, Yang YZ, Zhang LX. ABC transporters coupled with the elevated ergosterol contents contribute to the azole resistance and amphotericin B susceptibility. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014 Mar;98(6):2609-16.
56. Salim N, Moore C, Silikas N, Satterthwaite J, Rautemaa R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Jan;41(1):65-9.
57. Sardella A, Demarosi F, Oltolina A, Rimondini L, Carrassi A. Efficacy of topical mesalazine compared with clobetasol propionate in treatment of symptomatic oral lichen planus. *Oral Dis.* 1998 Dec;4(4):255-9.
58. Scardina GA, Messina P, Carini F, Maresi E. A randomized trial assessing the effectiveness of different concentrations of isotretinoin in the management of lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Jan;35(1):67-71.
59. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005 Nov;48(6):365-77.
60. Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 2010 Jul;9(7):991-1008.

61. Sharma R, Sircar K, Singh S, Rastogi V. Role of mast cells in pathogenesis of oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011 Sep;15(3):267-71.
62. Shen Z, Gao X, Ma L, Zhou Z, Shen X, Liu W. Expression of Foxp3 and interleukin-17 in lichen planus lesions with emphasis on difference in oral and cutaneous variants. *Arch Dermatol Res*. 2013 Nov 29.
63. Sonthalia S, Singal A. Comparative efficacy of tacrolimus 0.1% ointment and clobetasol propionate 0.05% ointment in oral lichen planus: a randomized double-blind trial. *Int J Dermatol*. 2012 Nov;51(11):1371-8.
64. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):350-65.
65. Swift JC, Rees TD, Plemons JM, Hallmon WW, Wright JC. The effectiveness of 1% pimecrolimus cream in the treatment of oral erosive lichen planus. *J Periodontol*. 2005 Apr;76(4):627-35.
66. Thongprasom K, Luengvisut P, Wongwatanakij A, Boonjatturus C. Clinical evaluation in treatment of oral lichen planus with topical fluocinolone acetonide: a 2-year follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2003 Jul;32(6):315-22.
67. Thornhill MH, Sankar V, Xu XJ, Barrett AW, High AS, Odell EW, Speight PM, Farthing PM. The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2006 Apr;35(4):233-40.
68. Usatine RP, Tinitigan M. Diagnosis and treatment of lichen planus. *Am Fam Physician*. 2011 Jul 1;84(1):53-60.
69. van Boven JF, de Jong-van den Berg LT, Vegter S. Inhaled corticosteroids and the occurrence of oral candidiasis: a prescription sequence symmetry analysis. *Drug Saf*. 2013 Apr;36(4):231-6.

70. van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*. 2003 Oct;32(9):507-12.
71. White, P. L., A. Shetty, and R. A. Barnes. 2003. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. *J. Med. Microbiol*. 52:229–238.
72. Yang F, Yan TH, Rustchenko E, Gao PH, Wang Y, Yan L, Cao YY, Wang QJ, Ji H, Cao YB, Jiang YY. High-frequency genetic contents variations in clinical *Candida albicans* isolates. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(5):624-31.
73. Yap HY, Kwok KM, Gomersall CD, Fung SC, Lam TC, Leung PN, Hui M, Joynt GM. Epidemiology and outcome of *Candida* bloodstream infection in an intensive care unit in Hong Kong. *Hong Kong Med J*. 2009 Aug;15(4):255-61.
74. Yoke PC, Tin GB, Kim MJ, Rajaseharan A, Ahmed S, Thongprasom K, Chaimusik M, Suresh S, Machin D, Bee WH, Seldrup J; Asian Lichen Planus Study Group. A randomized controlled trial to compare steroid with cyclosporine for the topical treatment of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Jul;102(1):47-55.
75. Zhou XJ, Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Seymour GJ. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2002 Jan;31(1):23-7.
76. Zomorodian K, Haghghi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol*. 2011;49:208–11.

10.1 Anexo A - Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa de Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE –11485512.9.0000.5149

Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia
Odontológica
Faculdade de Odontologia– UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 20 de fevereiro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo do impacto de corticoterapia sobre infecção bucal de Candida spp**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

10.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “*Estudo do impacto de corticoterapia sobre infecção bucal de Candida spp.*” A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação freqüente após o transplante que pode causar danos graves à saúde do paciente e que se manifesta na boca em cerca de 80% dos casos. O líquen plano é uma doença dermatológica crônica, auto-imune e que afeta frequentemente a mucosa bucal. O tratamento indicado para as lesões na boca que ocorrem em pacientes com uma dessas doenças é o uso de um corticoide tópico. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a necessidade de introdução de medicação antifúngica no protocolo de atendimento dos pacientes submetidos ao tratamento com corticoide tópico. Para esse estudo, será necessária a coleta de raspado bucal que é realizada com uma escova estéril passada na mucosa bucal e na língua para análise laboratorial e investigação da presença de espécies de *Candida*. As coletas serão realizadas antes e após o tratamento com corticoide tópico.

Este estudo não oferecerá riscos adicionais a sua saúde, além de um possível leve desconforto durante o movimento da raspagem, que deverá ser minimizado pelo emprego da técnica adequada. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível esclarecer aspectos relacionados ao impacto da corticoterapia sobre a infecção por *Candida spp.*, propiciando bases teóricas para adequação do atendimento odontológico a esses pacientes, propiciando melhor qualidade de vida para os mesmos.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Não terá custos ou ressarcimentos para você. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o seu anonimato.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de raspado bucal para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584> / E-mail: rsgomez@ufmg.br / Tel.: 34092477

Co-orientador: Dr^a. Jeane de Fatima Correia Silva Alves

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9313735835963254> / E-mail: jeanecorreia@gmail.com / Tel.: 34092477

Thaís dos Santos Fontes Pereira

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947> / E-mail: thaisfp@hotmail.com / Tel.: 87897472

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG COEP (Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG, CEP: 31270-901, telefone (31) 3409 4592 – coep@prpq.ufmg.br).

Termo de consentimento destinado a indivíduos adolescentes (entre 13 e 18 anos)

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa "*Estudo do impacto de corticoterapia sobre infecção bucal de Candida spp.*" A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação freqüente após o transplante que pode causar danos graves à saúde do paciente e que se manifesta na boca em cerca de 80% dos casos. O líquen plano é uma doença dermatológica crônica, auto-imune e que afeta frequentemente a mucosa bucal. O tratamento indicado para as lesões na boca que ocorrem em pacientes com uma dessas doenças é o uso de um corticoide tópico. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a necessidade de introdução de medicação antifúngica no protocolo de atendimento dos pacientes submetidos ao tratamento com corticoide tópico. Para esse estudo, será necessária a coleta de raspado bucal que é realizada com uma escova estéril passada na mucosa bucal e na língua para análise laboratorial e investigação da presença de espécies de *Candida*. As coletas serão realizadas antes e após o tratamento com corticoide tópico.

Este estudo não oferecerá riscos adicionais a sua saúde, além de um possível leve desconforto durante o movimento da raspagem, que deverá ser minimizado pelo emprego da técnica adequada. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível esclarecer aspectos relacionados ao impacto da corticoterapia sobre a infecção por *Candida spp.*, propiciando bases teóricas para adequação do atendimento odontológico a esses pacientes, propiciando melhor qualidade de vida para os mesmos.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Não terá custos ou ressarcimentos para você. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o seu anonimato.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de raspado bucal para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____ Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584> / E-mail: rsgomez@ufmg.br / Tel.: 34092477

Co-orientador: Dr^a. Jeane de Fatima Correia Silva Alves
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9313735835963254> / E-mail: jeanecorreia@gmail.com / Tel.: 34092477

Thaís dos Santos Fontes Pereira
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947> / E-mail: thaiisfp@hotmail.com / Tel.: 87897472

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG COEP (Av Presidente Antônio Carlos,6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG , CEP: 31270-901, telefone (31) 3409 4592 – coep@prpq.ufmg.br).

Termo de consentimento destinado a responsável por adolescentes (entre 13 e 18 anos)**Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O seu filho (a) _____ está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “*Estudo do impacto de corticoterapia sobre infecção bucal de Candida spp.*”. A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação freqüente após o transplante que pode causar danos graves à saúde do paciente e que se manifesta na boca em cerca de 80% dos casos. O líquen plano é uma doença dermatológica crônica, auto-imune e que afeta frequentemente a mucosa bucal. O tratamento indicado para as lesões na boca que ocorrem em pacientes com uma dessas doenças é o uso de um corticoide tópico. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a necessidade de introdução de medicação antifúngica no protocolo de atendimento dos pacientes submetidos ao tratamento com corticoide tópico. Para esse estudo, será necessária a coleta de raspado bucal que é realizada com uma escova estéril passada na mucosa bucal e na língua para análise laboratorial e investigação da presença de espécies de *Candida*. As coletas serão realizadas antes e após o tratamento com corticoide tópico.

Este estudo não oferecerá riscos adicionais à saúde de seu filho (a), além de um possível leve desconforto durante o movimento da raspagem, que deverá ser minimizado pelo emprego da técnica adequada. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível esclarecer aspectos relacionados ao impacto da corticoterapia sobre a infecção por *Candida spp.*, propiciando bases teóricas para adequação do atendimento odontológico a esses pacientes, propiciando melhor qualidade de vida para os mesmos.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Não terá custos ou ressarcimentos para você. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o seu anonimato.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de raspado bucal para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE_____
NOME DO RESPONSÁVEL_____
ASSINATURA DO PACIENTE_____
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

- Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584> / E-mail: rsgomez@ufmg.br / Tel.: 34092477
- Co-orientador: Dr^a. Jeane de Fatima Correia Silva Alves
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9313735835963254> / E-mail: jeanecorreia@gmail.com / Tel.: 34092477
- Thaís dos Santos Fontes Pereira
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947> / E-mail: thaissfp@hotmail.com / Tel.: 87897472

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG COEP (Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG, CEP: 31270-901, telefone (31) 3409 4592 – coep@prpq.ufmg.br).

Termo de consentimento destinado a responsável por menores de idade (entre 7 e 12 anos)

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho (a) _____ está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “*Estudo do impacto de corticoterapia sobre infecção bucal de Candida spp.*”. A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação freqüente após o transplante que pode causar danos graves à saúde do paciente e que se manifesta na boca em cerca de 80% dos casos. O líquen plano é uma doença dermatológica crônica, auto-imune e que afeta frequentemente a mucosa bucal. O tratamento indicado para as lesões na boca que ocorrem em pacientes com uma dessas doenças é o uso de um corticoide tópico. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a necessidade de introdução de medicação antifúngica no protocolo de atendimento dos pacientes submetidos ao tratamento com corticoide tópico. Para esse estudo, será necessária a coleta de raspado bucal que é realizada com uma escova estéril passada na mucosa bucal e na língua para análise laboratorial e investigação da presença de espécies de *Candida*. As coletas serão realizadas antes e após o tratamento com corticoide tópico.

Este estudo não oferecerá riscos adicionais à saúde de seu filho (a), além de um possível leve desconforto durante o movimento da raspagem, que deverá ser minimizado pelo emprego da técnica adequada. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível esclarecer aspectos relacionados ao impacto da corticoterapia sobre a infecção por *Candida spp.*, propiciando bases teóricas para adequação do atendimento odontológico a esses pacientes, propiciando melhor qualidade de vida para os mesmos.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Não terá custos ou ressarcimentos para você. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o seu anonimato.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de raspado bucal para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

- Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584> / E-mail: rsgomez@ufmg.br / Tel.: 34092477
- Co-orientador: Dr^a. Jeane de Fatima Correia Silva Alves
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9313735835963254> / E-mail: jeanecorreia@gmail.com / Tel.: 34092477
- Thaís dos Santos Fontes Pereira
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947> / E-mail: thaissfp@hotmail.com / Tel.: 87897472

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG COEP (Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG, CEP: 31270-901, telefone (31) 3409 4592 – coep@prpq.ufmg.br).

Termo de consentimento destinado a responsável por crianças com idade inferior a 6 anos de idade

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho (a) _____ está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “*Estudo do impacto de corticoterapia sobre infecção bucal de Candida spp.*”. A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma complicação freqüente após o transplante que pode causar danos graves à saúde do paciente e que se manifesta na boca em cerca de 80% dos casos. O líquen plano é uma doença dermatológica crônica, auto-imune e que afeta frequentemente a mucosa bucal. O tratamento indicado para as lesões na boca que ocorrem em pacientes com uma dessas doenças é o uso de um corticoide tópico. Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar a necessidade de introdução de medicação antifúngica no protocolo de atendimento dos pacientes submetidos ao tratamento com corticoide tópico. Para esse estudo, será necessária a coleta de raspado bucal que é realizada com uma escova estéril passada na mucosa bucal e na língua para análise laboratorial e investigação da presença de espécies de *Candida*. As coletas serão realizadas antes e após o tratamento com corticoide tópico.

Este estudo não oferecerá riscos adicionais à saúde de seu filho (a), além de um possível leve desconforto durante o movimento da raspagem, que deverá ser minimizado pelo emprego da técnica adequada. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível esclarecer aspectos relacionados ao impacto da corticoterapia sobre a infecção por *Candida spp.*, propiciando bases teóricas para adequação do atendimento odontológico a esses pacientes, propiciando melhor qualidade de vida para os mesmos.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Não terá custos ou ressarcimentos para você. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o seu anonimato.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de raspado bucal para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: _____

Data: ___/___/_____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ N.º: _____

- Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584> / E-mail: rsgomez@ufmg.br / Tel.: 34092477
- Co-orientador: Dr^a. Jeane de Fatima Correia Silva Alves
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9313735835963254> / E-mail: jeanecorreia@gmail.com / Tel.: 34092477
- Thaís dos Santos Fontes Pereira
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947> / E-mail: thaissfp@hotmail.com / Tel.: 87897472

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG COEP (Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG , CEP: 31270-901, telefone (31) 3409 4592 – coep@prpq.ufmg.br).