

## Comparação da frequência de *Candida* spp. e níveis de IgA totais e anti-*Candida* na saliva de idosos e adultos-jovens

Luciana Gonçalves SOARES<sup>a</sup>, Antonio Olavo Cardoso JORGE<sup>b</sup>,  
Célia Regina Gonçalves e SILVA<sup>c</sup>, Mariella Vieira Pereira LEÃO<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Universidade de Taubaté, 12020-270 Taubaté - SP, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Odontologia, Universidade de Taubaté, 12020-270 Taubaté - SP, Brasil

<sup>c</sup>Instituto de Biociências, Universidade de Taubaté, 12020-270 Taubaté - SP, Brasil

Soares LG, Jorge AOC, Silva CRG, Leão MVP. Comparison of the frequency of *Candida* spp. and levels of total and anti-*Candida* IgA in saliva of young and elderly people. Rev Odontol UNESP. 2008; 37(2): 97-101.

**Resumo:** Alterações relacionadas às funções das glândulas salivares, uso de próteses dentárias, descuido na higiene bucal e ainda modificações funcionais no sistema imunológico, propiciam na população idosa uma maior tendência a doenças bucais. Dentre essas, evidencia-se a candidose, causada por leveduras do gênero *Candida*. Neste trabalho, quantificou-se e comparou-se a frequência de *Candida* spp. na saliva de 27 indivíduos idosos, com idade acima de 65 anos, e 30 indivíduos adultos-jovens, com idade entre 19 e 27 anos, todos clinicamente saudáveis. As amostras de saliva coletadas foram rapidamente semeadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol para o isolamento e contagem de unidades formadoras de colônias de *Candida* spp. por mL (ufc.mL<sup>-1</sup>). Também foram analisados os níveis de IgA anti-*Candida* e IgA totais salivares, por ELISA. Observou-se que 63% das amostras do grupo de idosos apresentaram crescimento de *Candida*, enquanto que somente 26,6% das amostras do grupo adulto-jovem foram positivas para o crescimento dessa levedura. Os valores médios de ufc.mL<sup>-1</sup> de *Candida* encontravam-se estatisticamente superiores nos idosos. Também se observou que nesse grupo os níveis de IgA anti-*Candida* encontravam-se superiores quando comparados ao grupo adulto-jovem, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Não foram encontradas diferenças nos níveis de IgA salivares totais entre os grupos estudados. Os resultados confirmaram a frequência aumentada de *Candida* spp. na cavidade bucal dos idosos, embora diferenças estatisticamente significativas na resposta secretória total e específica para este microrganismo não tenham sido observadas.

**Palavras-chave:** *Candida*; imunoglobulina A; saliva; idoso.

**Abstract:** Alterations related to the functions of the salivary glands, dentures wear, carelessness in oral hygiene and functional changes in the immune system provide the elderly population greater tendency to oral diseases. Among these, candidosis is the most frequent, caused by yeasts of *Candida* genus. This work quantified and compared the frequency of *Candida* spp. in the saliva of 27 elderly people, aged above 65 years, and 30 young people, aged between 19 and 27 years, all clinically healthy. The collected saliva samples were plated in agar Sabouraud dextrose with chloramphenicol, for the isolation and counting of colonies formation units of *Candida* spp per mL (cfu.mL<sup>-1</sup>). It was also analyzed the levels of IgA anti-*Candida* and total salivary IgA, by ELISA. It was observed that 63% of samples of the elderly group showed the presence of *Candida*, while only 26.6% of the samples of the young group were positive for the growth of this yeast. The average values of cfu.mL<sup>-1</sup> of *Candida* were statistically higher in the elderly group. It also noted that this group had levels of IgA anti-*Candida* higher when compared with the young group, but this difference was not statistically significant. There were no differences in levels of total salivary IgA between the groups. The results confirmed the increased frequency of *Candida* spp. in the oral cavity of the elderly, although statistically significant differences in total and specific secretory response against this microorganism have not been observed.

**Keywords:** *Candida*; immunoglobulin A; saliva; aged.

## Introdução

A saúde bucal da população idosa brasileira encontra-se numa situação precária, sendo evidenciada muitas vezes pelo grande número de indivíduos edêntulos<sup>1,2</sup>.

Alterações nas relações sociais, má nutrição, descuidos relacionados à higiene bucal, entre outros fatores, propiciam, em pessoas de idade mais avançada, uma maior tendência às neoplasias e outras doenças bucais<sup>3-5</sup>.

O envelhecimento também pode ocasionar uma disfunção do sistema imunológico, o que aumenta a susceptibilidade a doenças infecciosas<sup>6</sup>. Verificou-se que a saliva de idosos apresenta menor eficiência na eliminação de patógenos<sup>7</sup> e uma menor concentração de imunoglobulinas A (IgA)<sup>8</sup>. IgA é a principal classe de anticorpo encontrada nas secreções presentes na superfície das mucosas, agindo como uma importante primeira linha de defesa<sup>9</sup>.

Dentre as doenças bucais em idosos, a candidose é a mais freqüente<sup>2</sup>. As leveduras do gênero *Candida* podem fazer parte da microbiota bucal residente de indivíduos saudáveis, porém em determinadas situações específicas, como em casos de uso de próteses, xerostomia, ou deficiências ou disfunções da imunidade, podem tornar-se patogênicas, causando candidose<sup>10</sup>.

Resultados controversos sobre correlação de *Candida* e níveis de IgA anti-*Candida* têm sido relatados. Holmes et al.<sup>11</sup> observaram que indivíduos que apresentavam níveis baixos de IgA específica para *C. albicans* tinham maior aderência de leveduras às células epiteliais, enquanto os indivíduos que mostravam níveis maiores de IgA anti-*Candida* apresentavam uma menor aderência, demonstrando um papel protetor desses anticorpos. Já Jeganathan et al.<sup>12</sup> observaram que pacientes com candidose apresentavam níveis de IgA anti-*Candida* significativamente aumentados quando comparados com o grupo controle, sem candidose.

Com o crescente aumento da expectativa de vida, os problemas geriátricos passam a assumir cada vez mais importância, daí a necessidade de se estudar as infecções mais freqüentes nessa população, bem como sua resposta imunológica.

Neste trabalho, foi investigada a freqüência de *Candida* spp. em idosos e adultos, bem como a resposta imunológica secretória anti-*Candida* nestes indivíduos.

## Material e método

### População estudada

Foram selecionados para constituírem o grupo de idosos 27 indivíduos (13 do gênero masculino e 14 do gênero feminino) com idade acima de 65 anos, institucionalizados, em condições de responderem por seus atos, considerados clinicamente saudáveis por suas instituições. Para o grupo de adultos-jovens foram selecionados 30 indivíduos (15

de cada gênero), com idade entre 19 e 27 anos, também clinicamente saudáveis. Foram excluídos da pesquisa os indivíduos fumantes, usuários de próteses ou aparelhos ortodônticos, em reposição hormonal, e que tenham feito uso de antibióticos nos últimos três meses. Os indivíduos estudados foram esclarecidos sobre o objetivo e os procedimentos do estudo em questão e, por fim, assinaram o termo de livre consentimento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Taubaté no dia 08/10/2004 sob o protocolo nº 391/04.

### Coleta das amostras

Foram coletados aproximadamente 2 mL de saliva, sem estimulação prévia, de cada indivíduo, em coletores descartáveis e estéreis. Parte da saliva foi imediatamente utilizada para análise microbiológica, e 1 mL do volume desta saliva foi transferido para frascos contendo inibidores de proteases (fluoreto de fenilmetilsulfonil) e conservante (azida sódica), para posterior análise imunológica. Estas amostras foram conservadas a -20 °C até o momento do uso.

### Isolamento de leveduras do gênero *Candida*

As amostras de saliva puras e as diluídas (1/10) em solução fisiológica (NaCl 0,9%) foram semeadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) com cloranfenicol (Quimicetina Succinato/ Carlo Erba, 10 µL por mL de meio). Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas e, depois desse período, permaneceram em temperatura ambiente por mais 5 dias. Foi observado o crescimento de colônias características do gênero *Candida*: brancas, cremosas, lisas, regulares e convexas, com aspecto de porcelana. Embora raramente isoladas da cavidade bucal, foram excluídas as colônias com pigmentos alaranjados, características do gênero *Rhodotorula*; mucóides, características do gênero *Cryptococcus*, ou de coloração creme e morfologia cônica, características de *Saccharomyces cerevisiae*. As colônias foram contadas, utilizando-se as placas que continham de 30 a 300 colônias, e confirmadas com a confecção de esfregaços corados por técnica de coloração Gram.

### Análise de anticorpos

### Preparo do antígeno de *Candida*

O antígeno foi preparado de acordo com Koga<sup>13</sup>. Amostras das colônias de leveduras isoladas dos pacientes estudados foram adicionadas em tubos contendo 3 mL de água bidestilada, até a obtenção de uma suspensão comparada à escala 10 de *MacFarland*. A esta suspensão foram adicionados 50 µL de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). Os tubos foram agitados rigorosamente por 1 minuto no vortex para que os antígenos de parede fossem liberados. A seguir, acrescentaram-se mais 50 µL de PMSF e agitaram-se

novamente os tubos por um minuto. Depois disso, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante, correspondente aos antígenos de parede das leveduras, foi usado para sensibilizar as placas de ELISA (Microplaca ELISA PS "U" 96 cav.).

#### Análise dos anticorpos anti-*Candida* pelo método ELISA

Para análise dos anticorpos, utilizou-se o ensaio enzimático ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

Placas de poliestireno com 96 orifícios foram sensibilizadas com 50 µL do antígeno de parede de *Candida albicans*. Para serem usadas, as placas foram lavadas com PBS e os sítios livres da placa de poliestireno, bloqueados com 0,5% de gelatina (PBS-G) por 45 minutos a 37 °C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,1% de Tween-20 (PBS-T).

As amostras de saliva foram diluídas 1/20 em PBS-T-G e adicionadas em duplicata nos orifícios das placas. Estas foram incubadas por 2 horas a 37 °C e, após lavagem com PBS-T, colocou-se o conjugado (anti-IgA marcada com peroxidase (Zymed) em PBS-T-G). As placas foram incubadas por uma hora e, após lavagem abundante com PBS-T, colocaram-se 100 µL do substrato ortofenilenodiamino (OPD-Sigma): 6 mg em 12 mL de tampão citrato-ácido cítrico 0,1 M, pH 5,5 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. A reação foi desenvolvida por 4 minutos, à temperatura ambiente e imediatamente bloqueada com ácido sulfúrico 1N. As densidades ópticas (D.O.) foram lidas no leitor de ELISA (*Lasbsystems Multiskan MS*) no comprimento de onda de 490 nm.

#### Análise de imunoglobulinas totais (IgA) na saliva

Placas de poliestireno com 96 orifícios foram sensibilizadas com 5 mg/mL de anticorpos anti-IgA. As placas foram incubadas por 2 horas, à temperatura de 37 °C e, conservadas a 0 °C até o momento do uso.

A partir daí, realizou-se a técnica ELISA descrita anteriormente.

#### Análise estatística

Os níveis de imunoglobulinas salivares totais e anti-*Candida*, e as unidades formadoras de colônias (ufc.mL<sup>-1</sup>) de ambos os grupos estudados foram comparados utilizando-se a análise de variância ANOVA, teste T não pareado.

## Resultado

#### Análise microbiológica

A idade média do grupo idoso era de 71,81 anos e desvio padrão de 4,55. A do grupo adulto-jovem, de 22,03 e desvio padrão de 1,9. Observou-se que, dos 27 indivíduos analisados do grupo de idosos, 17 (63%) apresentaram crescimento de leveduras do gênero *Candida*; e, no grupo

de adultos, das 30 amostras de saliva analisadas, 8 (26,6%) apresentaram positividade.

Após a contagem de ufc.mL<sup>-1</sup> de *Candida* nas amostras positivas para o crescimento dessa levedura, foi observado que o grupo de idosos apresentava contagens estatisticamente superiores, com valor de  $p = 0,047$  (Tabela 1).

#### Análise imunológica

Observou-se que as amostras de saliva do grupo de idosos apresentaram níveis de anticorpos IgA anti-*Candida* superiores aos do grupo de adultos, no entanto esta diferença não mostrou-se estatisticamente significativa. A média dos valores de densidade óptica (D.O.) obtidos encontra-se na Figura 1.

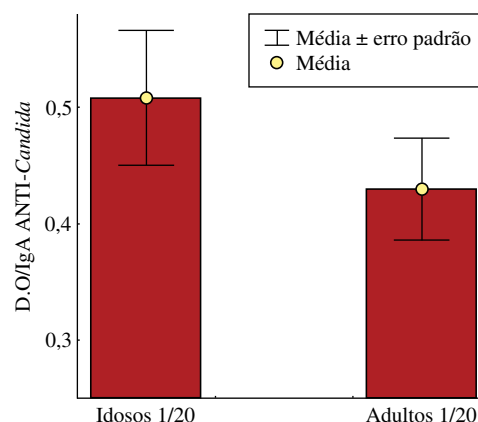
Na análise dos níveis de IgA salivares totais, também não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (Figura 2).

## Discussão

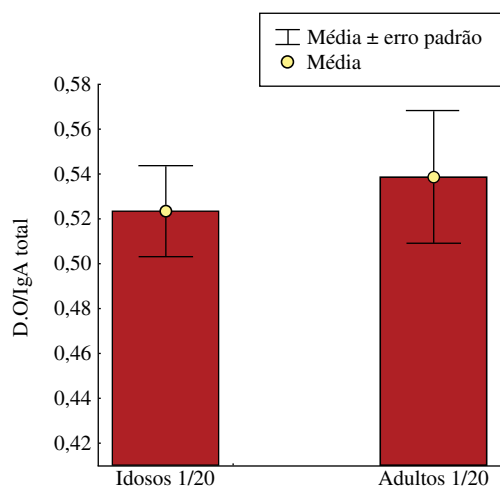
Alterações na cavidade bucal ou disfunções decorrentes de doenças sistêmicas podem levar a um desequilíbrio biológico entre microrganismos bucais e o hospedeiro, acarretando o desenvolvimento de quadros infecciosos. O gênero *Candida* é comumente encontrado em indivíduos saudáveis, sendo principalmente evidenciado na cavidade bucal<sup>14,15</sup>. Jorge et al.<sup>15</sup> estudaram a presença de levedura do

**Tabela 1.** Média e desvio-padrão das contagens de ufc.mL<sup>-1</sup> de *Candida* na saliva dos grupos de idosos e adultos-jovens

	Grupo de idosos	Grupo de adultos-jovens
Média de ufc.mL <sup>-1</sup>	1.129,4	183,75
Desvio padrão	1.510,07	220,22



**Figura 1.** Médias e desvio-padrão dos valores de densidade óptica correspondentes aos níveis de IgA anti-*Candida* na saliva de idosos e adultos.



**Figura 2.** Médias e desvio-padrão dos valores de densidade óptica correspondentes aos níveis de IgA totais na saliva de idosos e adultos.

gênero *Candida* em 570 indivíduos saudáveis, sem fatores predisponentes, e encontraram uma positividade de 37,38%. O envelhecimento, a baixa imunidade, o uso contínuo de próteses, a má higiene bucal, dentre outros fatores, desequilibram a relação *Candida* – hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento de candidose<sup>15,16</sup>.

Neste trabalho, avaliou-se e comparou-se a prevalência de *Candida* spp. em indivíduos idosos e adultos-jovens, saudáveis. Foi observado que 63% dos idosos apresentavam *Candida* spp. em sua cavidade bucal e que apenas 26,6% dos adultos eram portadores desse microrganismo, evidenciando uma maior prevalência dessa levedura no primeiro grupo citado. Também, a média das contagens de ufc.mL<sup>-1</sup> de *Candida* do grupo de idosos foi estatisticamente superior à média do grupo adulto-jovem, demonstrando que, quando presente, *Candida* apresenta-se em maior quantidade nos indivíduos idosos. Não foi realizada a identificação das espécies do gênero *Candida*, uma vez que a intenção do estudo era apenas observar a prevalência do gênero, como um todo. No entanto, vários estudos têm demonstrado que a espécie mais frequentemente isolada, tanto em pacientes saudáveis quanto em pacientes com fatores predisponentes, é *C. albicans*<sup>10,14,15</sup>, sendo essa espécie também mais frequentemente relacionada com os eventos patológicos.

Como já mencionado anteriormente, vários fatores podem favorecer a colonização e o crescimento de *Candida* na cavidade bucal. Por isso, neste estudo, procurou-se homogeneizar os indivíduos estudados selecionando os saudáveis, com uma boa higiene bucal, que não fossem fumantes, que não fizessem uso de próteses dentárias removíveis ou aparelhos ortodônticos, e que não fizessem uso de antibióticos ou hormônios. Dessa forma pôde-se

descartar a influência de vários fatores predisponentes, para que os fatores idade e imunidade pudessem ser mais bem avaliados.

Analisou-se a resposta imunológica secretória para *Candida* e observou-se que os idosos apresentavam níveis de IgA anti-*Candida* maiores que os adultos-jovens. No entanto, estes valores não apresentaram significância estatística. Os níveis maiores de IgA anti-*Candida* encontrados nos idosos provavelmente se devem a estímulos antigênicos aumentados, já que esses indivíduos apresentavam maior quantidade de *Candida* em sua cavidade bucal e, conseqüentemente, maior síntese de imunoglobulinas IgA nessa mucosa. Embora o envelhecimento possa levar a imunodeficiências, aparentemente este fato não interferiu na resposta anti-*Candida*. Evento semelhante foi relatado por Coogan et al.<sup>17</sup>, que observaram que as concentrações e as taxas de secreção de IgA salivares anti-*Candida* estavam mais elevadas em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida, também mais predispostos ao desenvolvimento de candidose bucal, quando comparados aos indivíduos saudáveis.

Em nosso trabalho, foi possível observar que nos grupos estudados os níveis de IgA totais estavam semelhantes. Também Bezerra-Coelho<sup>18</sup> não encontrou diferença significativa entre os níveis de IgA de idosos e adultos. Cole et al.<sup>19</sup>, estudando as médias de IgA total de idosos e crianças, observaram que o grupo idoso apresentou níveis de IgA de 35,1 ± 18,6 mg.dL<sup>-1</sup>, comparáveis aos de indivíduos adultos-jovens saudáveis, que variam de 20 a 40 mg.10 dL<sup>-1</sup><sup>21</sup>. Já Miletic et al.<sup>8</sup>, estudando 48 indivíduos, agrupados como jovens e idosos, observaram que os níveis de IgA foram significativamente menores no grupo idoso. Portanto, embora a redução de muitos parâmetros imunológicos venha sendo freqüentemente observada na população idosa, a imunidade humoral parece manter-se preservada, ainda que os anticorpos possam apresentar uma menor especificidade e afinidade<sup>20</sup>.

Quando presente, a diminuição da eficiência da resposta imunológica não é a única consequência do envelhecimento. A somatória de todas as alterações faz dos indivíduos idosos, pessoas extremamente sensíveis a infecções e, portanto, que necessitam de atenções e cuidados especiais.

## Conclusão

- Os indivíduos do grupo de idosos apresentaram maior prevalência e contagens de ufc.mL<sup>-1</sup> de *Candida* quando comparados ao grupo de adultos-jovens;
- O grupo de idosos apresentou níveis de IgA total salivar semelhante ao do grupo de adultos-jovens;
- O grupo de idosos apresentou níveis de IgA anti-*Candida* superiores ao do grupo adulto-jovem, entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

## Referências

1. Rosa AGF, Fernandez RAC, Pinto VG, Ramos LR. Condições da saúde bucal em pessoas de 60 anos ou mais no município de São Paulo (Brasil). *Rev Saúde Pública*. 1992;26:155–60.
2. Silva DDS, Sousa MLRS, Wada RS. Saúde bucal em adultos e idosos na cidade de Rio Claro, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2004;20:626–31.
3. Avlund K, Holm-Pedersen P, Morse DE, Viitanen M, Winblad B. Social relations as determinants of oral health among persons over the age of 80 years. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31:454–62.
4. Marcenes W, Steele JG, Sheiham A, Walls AWG. The relationship between dental status, food selection, nutrient intake, nutritional status, and body mass index in older people. *Cad Saúde Pública*. 2003;19:809–16.
5. Crivelli MR, Domínguez FV, Adler IL, Keszler A. Frequency and distribution of oral lesions in elderly patients. *Rev Asoc Odontol Argent*. 1990;78(1):55–8.
6. McGlauchlen KS, Vogel LA. Ineffective humoral immunity in the elderly. *Microbes Infect*. 2001;5:1279–84.
7. Kamagata-Kiyoura Y, Abe S, Yamaguchi H, Nitta T. Reduced activity of *Candida* detachment factors in the saliva of the elderly. *J Infect Chemother*. 2004;10:59–61.
8. Miletic ID, Schiffman SS, Miletic VD, Sattely-Miller EA. Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. *Physiol Behav*. 1996;60:243–8.
9. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol*. 2006;208:270–82.
10. Fidel PL Jr. Host defense against oropharyngeal and vaginal candidiasis: site-specific differences. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16(1):8–15.
11. Holmes AR, Bandara BMK, Cannon RD. Saliva promotes *C. albicans* adherence to human epithelial cells. *J Dent Res*. 2002;81:28–32.
12. Jeganathan S, Ufomata D, Hobkirk JA, Ivanyi L. Immunoglobulin A1 and A2 subclass of salivary antibodies to *Candida albicans* in patients with oral candidosis. *Clin Exp Immunol*. 1987;70:316–21.
13. Koga CY. Correlação entre a presença de estreptococos do grupo mutans e *Candida* com níveis de IgA na saliva humana [tese doutorado]. Campinas: Faculdade de Odontologia da UNICAMP; 1997.
14. Moreira D, Spolidório DMP, Rodrigues JAO, Boriollo MFG, Rosa EAR, et al. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba – SP, Brasil. *Pesqui Odontol Bras*. 2001;15:187–95.
15. Jorge AOC, Koga-Ito CY, Gonçalves CR, Fantinato V, Unterkircher CS. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1997;11:279–85.
16. Ellepola AN, Samaranayake LP. Oral candidal infections and antimycotics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11:172–98.
17. Coogan MM, Sweet SP, Challacombe SJ. Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infect Immun*. 1994;62:892–6.
18. Bezerra-Coelho APCG. Estudo da influência do envelhecimento e da perda dos elementos dentais nos níveis totais de imunoglobulina secretória do tipo A na saliva [dissertação mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.
19. Cole M F, Hsu SD, Baum BJ, Bowen WH, Sierra LI, Aquirre M, et al. Specific and nonspecific immune factors in dental plaque fluid and saliva from young and old populations. *Infect Immun*. 1981;31:998–1002.
20. Vasto S, Caruso C. Immunity & ageing: a new journal looking at ageing from an immunological point of view. *Immun Ageing*. 2004;1(1):1–4.

Recebido: 25/07/2006

Aceito: 24/06/2008

