

## ***Candida dubliniensis* – levedura emergente associada à candidose oral**

**Cassiano Francisco Weege NONAKA<sup>a</sup>, George João Ferreira do NASCIMENTO<sup>a</sup>,**

**João Augusto Vianna GOULART FILHO<sup>b</sup>, Kenio Costa LIMA<sup>c</sup>,**

**Eveline Pipolo MILAN<sup>d</sup>**

<sup>a</sup>Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 59056-000 Natal - RN, Brasil

<sup>b</sup>Mestre, Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 59056-000 Natal - RN, Brasil

<sup>c</sup>Professor Doutor, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Preventiva e Social, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 59056-000 Natal - RN, Brasil

<sup>d</sup>Professora Doutora, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 59056-000 Natal - RN, Brasil

Nonaka CFW, Nascimento GJF, Goulart Filho JAV, Lima KC, Milan EP. *Candida dubliniensis* – emergent yeast associated with oral candidosis. Rev Odontol UNESP. 2008; 37(2): 125-131.

**Resumo:** Dentre os microrganismos capazes de determinar o desenvolvimento de processos patológicos em humanos, encontram-se as espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. A presença destas leveduras em pacientes que apresentam condições predisponentes como terapias com múltiplos antimicrobianos, imunossupressores e imunodeficiências, é capaz de determinar numerosos processos patológicos, sejam estes de ordem local ou sistêmica. Apesar da *Candida albicans* ser implicada como principal patógeno relacionado ao desenvolvimento de candidose oral, o isolamento de uma espécie intimamente relacionada, denominada *Candida dubliniensis*, tem sido reportado de forma crescente. Diversos fatores de virulência são descritos para esta nova levedura, assumindo destaque a hidrofobicidade de superfície celular, as aspartil proteinases secretadas (Saps) e compostos enzimáticos extracelulares, como fosfatase ácida, leucina-amilamidase, esterases e  $\alpha$ -mannosidase. Além disso, isolados de *C. dubliniensis* apresentam bombas de efluxo de drogas, codificadas pelos genes *CdCR1* e *CdMDR1*, um dos mecanismos propostos para explicar o desenvolvimento de resistência a quimioterápicos como o fluconazol e, em certos casos, ao cetoconazol e itraconazol. Em decorrência do emergente número de relatos e pesquisas enfatizando o papel da *C. dubliniensis* no desenvolvimento de doença local e sistêmica, o presente trabalho realiza uma revisão da literatura acerca dos aspectos epidemiológicos, métodos de identificação, fatores de virulência e mecanismos de resistência a antifúngicos inerentes a esta levedura.

**Palavras-chave:** *Candida dubliniensis*; candidose oral; virulência; resistência.

**Abstract:** Amongst the microorganisms that can cause pathologic processes in humans are yeasts species belonging to the genus *Candida*. The presence of these yeasts in patients with a number of predisposing conditions such as multiple therapies with antibiotics and immunosuppressors and immunodeficiencies is capable of causing a variety of local and systemic diseases. Although *Candida albicans* remains the most common cause of oral candidosis, the identification of a close related species, named *Candida dubliniensis*, has been increasing steadily. Numerous virulence factors are described for this new yeast, mainly represented by cell surface hydrophobicity, secretory aspartyl proteinases (Saps) and extracellular enzymatic compounds as acid phosphatase, leucine-arylamidase, esterases and  $\alpha$ -mannosidase. Besides, *C. dubliniensis* presents drug efflux pumps, encoded by *CdCR1* and *CdMDR1* genes, one of the proposed mechanisms to explain the development of antifungal drug resistance against fluconazole, and occasionally, ketoconazole and itraconazole. In view of the emergent number of case reports and studies emphasizing the importance of *C. dubliniensis* on the development of local and systemic diseases, the present paper performs a review of the literature about the epidemiology, identification methods, factors of virulence and mechanisms of antifungal resistance inherent to this yeast.

**Keywords:** *Candida dubliniensis*; oral candidosis; virulence; resistance.

## Introdução

Dentre os microrganismos capazes de determinar o desenvolvimento de doenças em humanos, encontram-se as espécies de leveduras do gênero *Candida*. A presença destas leveduras em pacientes que apresentam condições predisponentes como próteses dentárias e terapias com múltiplos antimicrobianos e imunossupressores é capaz de determinar desde infecções superficiais de menores proporções a infecções sistêmicas<sup>1-7</sup>.

O principal patógeno implicado no desenvolvimento de candidose oral é a espécie *Candida albicans*, um fungo dimórfico que pode se apresentar sob a forma leveduriforme de blastóporo (comensal) ou sob a forma micelial de hifa ou pseudo-hifa (patogênica), produzindo clamidoconídios sob condições ambientais específicas<sup>1,2,8,9</sup>. Contudo, a incidência da doença determinada por microrganismos como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*, tem sido observada de forma crescente<sup>6,7,10</sup>.

Embora as razões para esta inversão epidemiológica ainda não estejam completamente esclarecidas, a sensibilidade diminuída a numerosos agentes antifúngicos utilizados rotineiramente tem sido sugerida como mecanismo de seleção de algumas espécies de *Candida* não-*albicans*, levando ao comprometimento clínico, com altas taxas de morbidade e mortalidade<sup>4,11</sup>.

Dentre as espécies não-*albicans*, a *C. dubliniensis* tem sido objeto de intensa investigação, particularmente em decorrência de sua similaridade genotípica e fenotípica com a *C. albicans* e da identificação de cepas resistentes a drogas antifúngicas, como o fluconazol<sup>3,10,12-14</sup>. Apesar da maioria dos isolados de *C. dubliniensis* estarem associados com infecções orofaríngeas em indivíduos HIV-positivos<sup>8,15-17</sup>, o isolamento destas leveduras a partir de diferentes espécimes clínicos tem sugerido um potencial patogênico significativo para esta espécie<sup>4,7,18-20</sup>, mesmo em pacientes HIV-negativos<sup>4,5,21-23</sup>.

Dessa forma, o presente trabalho realiza uma breve revisão da literatura acerca da *C. dubliniensis*, utilizando artigos publicados entre os anos de 1995 e 2007, constantes nas bases de dados Pubmed e Lilacs. São enfocados aspectos epidemiológicos, métodos de identificação, fatores de virulência e mecanismos de resistência a antifúngicos, com o intuito de contribuir para a compreensão da crescente importância desta levedura na candidose oral.

## Considerações gerais e epidemiologia

A *C. dubliniensis* foi descrita, em 1995, como uma nova espécie com potencial patogênico, isolada na cavidade oral de pacientes HIV-positivos ou com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)<sup>5</sup>. Originalmente, a *C. dubliniensis* foi identificada em decorrência do DNA desta espécie hibridizar-se pobremente com sondas de DNA específicas

para *C. albicans*, bem como apresentar padrões cariotípicos incomuns, sugerindo que os genomas destes microrganismos apresentavam diferenças significativas<sup>5,8</sup>.

Apesar das similaridades com a *C. albicans*, a *C. dubliniensis* representa um constituinte pouco numeroso nas microbiotas residentes de indivíduos saudáveis<sup>2,17,24</sup>, com frequências que variam entre 3<sup>23</sup>-8%<sup>4</sup>. Entretanto, a *C. dubliniensis* é um importante patógeno implicado no desenvolvimento de candidose orofaríngea em indivíduos HIV-positivos<sup>2,5,17</sup>. Estudos desenvolvidos na América do Norte e na Irlanda revelaram prevalências de *C. dubliniensis* na cavidade oral de indivíduos HIV-positivos variando entre 11,1-17,5%<sup>8,25</sup> e 18-32%<sup>21</sup>, respectivamente. Por sua vez, análises da microbiota oral de pacientes HIV-positivos, realizadas em países da América do Sul, demonstraram menor prevalência desta levedura, variando entre 1,1-3,9%<sup>17,26-28</sup>.

Blignaut et al.<sup>29</sup> avaliaram a frequência de *C. dubliniensis* na cavidade oral de indivíduos brancos e negros HIV-negativos e verificaram isolados de *C. dubliniensis* apenas em brancos. Além disso, Blignaut et al.<sup>29</sup> identificaram que a proporção de indivíduos brancos HIV-positivos revelando isolados de *C. dubliniensis* (9%) era maior do que a de indivíduos negros HIV-positivos (1,5%).

As razões para esta diferença entre as frequências de isolamento de *C. dubliniensis* da cavidade oral de indivíduos HIV-negativos e HIV-positivos são desconhecidas. É provável que a prevalência da *C. dubliniensis* na cavidade oral de indivíduos saudáveis tenha sido subestimada devido ao uso de métodos ineficientes de identificação ou à coleta em sítios anatômicos não habitados por esta levedura<sup>2,5</sup>.

A despeito das variações epidemiológicas, a *C. dubliniensis* tem se apresentado como uma forma importante de levedura em decorrência de sua distribuição ubíqua e associação com o desenvolvimento de candidose mucosa e sistêmica<sup>4,15,19,21,23</sup>. Contudo, a prevalência real desta levedura em mucosa oral permanece desconhecida<sup>5</sup>.

## Métodos de identificação

Os isolados de *C. dubliniensis* são fenotipicamente semelhantes aos isolados de *C. albicans*, podendo ser identificados de forma incorreta quando analisados sob métodos convencionais, como os exames de atividade de  $\beta$ -glicosidase, padrão de assimilação de carboidratos, coloração da colônia em CHROMagar e crescimento a temperaturas de 42 e 45 °C<sup>10,24,30,31</sup>.

Dentre os métodos de identificação para *C. dubliniensis*, destaca-se a utilização de meios de cultura suplementados com extratos de plantas, como ágar Staib<sup>32</sup>, ágar Pal<sup>33</sup> e ágar tabaco<sup>34</sup>. Nesses substratos, a *C. dubliniensis* desenvolve uma colônia rugosa em decorrência da grande quantidade de pseudo-hifas e clamidoconídios. Por sua vez, as co-

lônias de *C. albicans* são lisas e constituídas apenas por blastoconídios<sup>32-34</sup>. Um método auxiliar para identificação de *C. dubliniensis*, proposto por Alves et al.<sup>35</sup>, consiste em ágar Sabouraud suplementado com 6,5% de NaCl. Nesse meio, designado caldo hipertônico, cepas de *C. albicans* revelaram crescimento significativo ao longo de um período de incubação de 96 horas, ao passo que isolados de *C. dubliniensis* não exibiram qualquer crescimento<sup>35</sup>.

Apesar dos métodos de identificação fenotípicos permitirem a distinção entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, existe a possibilidade de resultados falsos<sup>2,3,24</sup>. Além disso, os meios de cultura suplementados podem não estar prontamente disponíveis e os períodos de incubação necessários podem se estender até 96 horas<sup>5</sup>. Dessa forma, os métodos mais eficientes para identificação da *C. dubliniensis* são aqueles baseados na amplificação diferencial de seqüências nucleotídicas espécie-específicas, utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)<sup>2,5,32,33,36,37</sup>.

A técnica da PCR, com suas inúmeras variações, como *Real Time PCR*<sup>37</sup>, PCR multiplex<sup>7</sup>, PCR-EIA (*Enzyme Immunoassay*)<sup>10</sup>, PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)<sup>3,36</sup>, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)<sup>38</sup> e marcadores moleculares RAPD<sup>12,22</sup>, permite a identificação específica da *C. dubliniensis*, já que os *primers* utilizados não amplificam amostras de DNA de *C. albicans*<sup>4,18,23</sup>.

Dentre essas variações, merece destaque o *Real Time PCR* sem utilização de sondas de hibridização, proposto por Somogyvari et al.<sup>37</sup>. Através da amplificação da região altamente variável ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) e posterior análise de *melting* com auxílio do corante fluorescente SybrGreen, os autores foram capazes de diferenciar as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*, mesmo levando em consideração os diferentes genótipos dessa última espécie. Outro método peculiar que permitiu a rápida identificação de *C. dubliniensis* entre diversas espécies de *Candida* foi o PCR multiplex, realizado por Liguori et al.<sup>7</sup>. Nessa técnica, não houve extração prévia do DNA das amostras coletadas e os *primers* para as diferentes espécies de *Candida* foram colocados em um único tubo para PCR<sup>7</sup>.

Ao analisar elementos repetitivos espécie-específicos no genoma de *C. dubliniensis*, Joly et al.<sup>39</sup> clonaram uma sonda complexa de DNA, denominada de Cd25, a qual revelava coeficientes de similaridade distintos à hibridização *Southern Blot*. Os autores constataram que a espécie *C. dubliniensis* era constituída por dois grupos distintos, designados Cd25 I e Cd25 II. Posteriormente, Gee et al.<sup>40</sup> realizaram seqüenciamento dos nucleotídeos da região ITS do operon dos genes que codificam RNAr e identificaram 4 genótipos distintos para *C. dubliniensis*. Conforme Gee et al.<sup>40</sup>, os isolados do grupo Cd25 I pertenciam exclusivamente ao genótipo 1, ao passo que o grupo Cd25 II constituía três genótipos diferentes (2-4). Além disso, esses

autores observaram que os isolados do genótipo 1 estavam primariamente associados à colonização e infecção em indivíduos HIV-positivos, enquanto que os genótipos 2-4 predominavam em indivíduos HIV-negativos. Contudo, outros estudos<sup>4,10,18</sup> não foram capazes de identificar todos os genótipos descritos, provavelmente em virtude do tamanho amostral ou do tipo de população analisada.

## Fatores de virulência

Os fatores de virulência de espécies de leveduras constituem uma propriedade multifatorial dependente dos diversos fenótipos de virulência, tais como: adesão às células do hospedeiro, formação de hifas, trocas fenotípicas e produção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases e aspartil proteinases secretadas (Saps)<sup>19,41-43</sup>.

O processo de adesão constitui etapa crucial na patogênese das infecções causadas por leveduras. Vidotto et al.<sup>30</sup> compararam in vitro a adesão de *C. albicans* e *C. dubliniensis* às células epiteliais provenientes de mucosa jugal e verificaram maior capacidade de adesão em isolados de *C. albicans*. Entretanto, pesquisas desenvolvidas com metodologia semelhante<sup>11,44</sup> constataram que isolados de *C. dubliniensis* apresentavam maior capacidade de aderência às células epiteliais da mucosa oral do que isolados de *C. albicans*, um achado atribuído à presença de interações hidrofóbicas durante o processo de adesão destes microrganismos.

Os resultados divergentes em relação à adesão epitelial da *C. albicans* e *C. dubliniensis* podem ser decorrentes de variações técnicas referentes aos meios de cultura e às amostras de células epiteliais e de saliva utilizados<sup>41,42</sup>. Assim, visando padronizar e diminuir interferências técnicas, Henriques et al.<sup>42</sup> avaliaram o envolvimento de interações físico-químicas, como tensão e hidrofobicidade superficial, na adesão dessas leveduras a células epiteliais HeLa e constataram que a *C. albicans* exibia uma capacidade adesiva um pouco maior que a *C. dubliniensis*. Por sua vez, Silva et al.<sup>43</sup> encontraram uma correlação inversa entre adesão da *C. dubliniensis* às células HeLa e sensibilidade às toxinas *Killer*, que são compostos produzidos por espécies de *Williopsis* e *Pichia* capazes de criar poros na membrana citoplasmática de leveduras, resultando na morte destes microrganismos.

Hazen<sup>1</sup> observou que os isolados de *C. dubliniensis* não sofreram alterações sobre a hidrofobicidade da superfície celular em razão da temperatura, como observado em isolados de *C. albicans*. Dessa forma, em temperaturas entre 35-37 °C, a *C. albicans* poderia exibir superfície celular hidrofílica, o que se traduziria em vantagem competitiva para *C. dubliniensis*<sup>1</sup>. Estudos demonstraram que índices elevados de hidrofobicidade na superfície celular de leveduras são capazes de facilitar a adesão a células do hospedeiro e proteínas da matriz extracelular, promover resistência à morte

mediada por polimorfonucleares neutrófilos e favorecer a obtenção de nutrientes<sup>1,45</sup>.

Entre os diversos fatores de virulência da *C. dubliniensis*, destacam-se enzimas proteolíticas extracelulares, particularmente as Saps. A principal isoenzima da família das Saps (Sap2p) é capaz de degradar mucinas, constituintes importantes do muco, o qual atua na proteção contra invasão de patógenos que colonizam as superfícies mucosas<sup>45</sup>. Estudos comparativos in vitro sobre a capacidade de produção de fosfolipases e proteinases em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* constataram menores níveis de produção de Saps e ausência de síntese de fosfolipases em *C. dubliniensis*, sugerindo virulência reduzida deste microrganismo<sup>19</sup>. Porém, para Jabra-Rizk et al.<sup>44</sup>, a virulência da *C. dubliniensis* decorreria de sua capacidade em coordenar de forma mais efetiva os processos de adesão ao muco e degradação destas mucoproteínas por meio de Sap2p<sup>44</sup>. Tais propriedades permitiriam o acesso das leveduras às células epiteliais e a criação de novos receptores de superfície, favorecendo a colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro<sup>44</sup>.

Outro aspecto importante em relação aos fatores de virulência consiste na síntese de moléculas de sinalização capazes de coordenar o comportamento de leveduras, denominadas moléculas de *Quorum sensing*. Sabe-se que a *C. albicans* é capaz de excretar farnesol, que tem a propriedade de inibir a conversão levedura-micélio sem interferir na sua taxa de crescimento celular<sup>46</sup>. Embora pouco se saiba sobre o papel do farnesol na patogenidade da *C. albicans*, há evidências de que esta molécula aumente a virulência do fungo. Henriques et al.<sup>47</sup> avaliaram o efeito do farnesol sobre o crescimento e dimorfismo em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis* cultivados em meio RPMI 1640 e observaram que a taxa de crescimento de ambas as leveduras não foi alterada. Porém, o farnesol inibiu consideravelmente a formação de hifas e pseudo-hifas de *C. dubliniensis*<sup>47</sup>. Tal resultado poderia explicar a maior virulência da *C. albicans* quando comparada à *C. dubliniensis* uma vez que não há evidências concretas de que esta última seja capaz de sintetizar farnesol<sup>47</sup>.

Características genotípicas podem fornecer indícios para explicar as diferenças na virulência de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Magee et al.<sup>48</sup> realizaram estudo cariotípico em cepas de *C. dubliniensis* e *C. albicans* e evidenciaram que em determinadas regiões cromossômicas não-homólogas do genoma da *C. dubliniensis* havia maior frequência de translocações cromossômicas quando comparadas com regiões homólogas da *C. albicans*, conferindo à *C. dubliniensis* uma maior instabilidade genômica. Tal achado poderia estar relacionado a uma menor virulência desta levedura quando comparada com a *C. albicans*.

## Resistência a drogas antifúngicas

A resistência de cepas de *C. dubliniensis* às drogas antifúngicas azólicas pode ser induzida em condições in vitro e tem sido constatada em isolados clínicos desta levedura. Em geral, os mecanismos moleculares pelos quais a *C. dubliniensis* adquire resistência aos compostos azólicos são: atividade aumentada das bombas de efluxo de drogas, modificações da enzima alvo destes fármacos e alterações na via de biossíntese do ergosterol, componente importante da membrana citoplasmática de leveduras<sup>2,13,14,49</sup>.

Em decorrência do isolamento inicial da *C. dubliniensis* a partir de amostras coletadas de indivíduos HIV-positivos com candidose oral recorrente, sugeriu-se que a emergência desta levedura estaria associada à introdução de novas modalidades terapêuticas baseadas na utilização de compostos azólicos, como o fluconazol<sup>2</sup>. O primeiro relato de resistência de isolados de *C. dubliniensis* ao fluconazol foi descrito por Moran et al.<sup>16</sup>, os quais observaram que leveduras resistentes ao fluconazol poderiam ser geradas a partir de microrganismos suscetíveis, indicando que esta espécie seria capaz de desenvolver resistência ao fármaco rapidamente.

Entretanto, o papel do fluconazol parece não estar limitado à simples seleção de microrganismos resistentes. Borg-von Zepelin et al.<sup>50</sup> observaram que isolados de *C. dubliniensis* submetidos à ação do fluconazol desenvolviam aderência aumentada às células epiteliais e revelavam níveis elevados de secreção de proteinases. Dessa forma, a quimioterapia com fluconazol poderia atuar como mecanismo seletivo, favorecendo o sobrecrecimento de *C. dubliniensis* em relação à *C. albicans*<sup>2,50</sup>.

Sullivan et al.<sup>2</sup> verificaram que o desenvolvimento de resistência aos componentes azólicos, em isolados de *C. dubliniensis*, baseia-se na formação de bombas de efluxo de drogas, codificadas pelos genes *CdCR1* e *CdMDR1*, homólogos aos genes *CDR1* e *MDR1* existentes na *C. albicans*. Perea et al.<sup>13</sup> analisaram isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol e verificaram expressão aumentada do gene *CdMDR1* em detrimento ao gene *CdCR1*, sugerindo maior importância às bombas de efluxo codificadas pelo primeiro gene. Além disso, Wirsching et al.<sup>14</sup> pesquisaram a ação da cadeia polipeptídica codificada pelo gene *CdMDR1* em isolados de *C. dubliniensis* resistentes ao fluconazol e verificaram que a deleção de ambos os alelos do referido gene tornava os isolados desta levedura suscetíveis ao fármaco.

A resistência cruzada em relação aos compostos azólicos é um achado incomum em isolados de *C. dubliniensis*<sup>2</sup>. Conforme Sullivan et al.<sup>2</sup>, esta deficiência é decorrente da preponderância das bombas Mdr1 nessas leveduras, as quais, ao contrário das bombas de efluxo Cdr1, são específicas para o fluconazol. Contudo, apesar da ausência de relatos clínicos a respeito da resistência da *C. dubliniensis* a outros compostos azólicos, diversos estudos in vitro descrevem

isolados resistentes à ação destes quimioterápicos. Dentre esses, destaca-se o trabalho de Fotedar, Al-Hedaithy<sup>51</sup>, os quais verificaram dentre 7 isolados de *C. dubliniensis*, 100% de suscetibilidade à anfotericina B, 85,7% ao fluconazol e cetoconazol e 71,4% à 5-fluorocitosina.

Além dos resultados obtidos em estudos sobre a deleção do gene *CdMDR1*, Perea et al.<sup>13</sup> observaram mutações pontuais no DNA de isolados de *C. dubliniensis*, as quais determinavam substituições de aminoácidos específicos na cadeia polipeptídica codificada pelo gene *ERG11*, implicado na resistência ao fluconazol. Não obstante, Sullivan et al.<sup>2</sup> verificaram que duas das mutações descritas por Perea et al.<sup>13</sup> eram idênticas às mutações observadas em isolados de *C. albicans* resistentes ao composto azólico, denominadas G307A e G464S.

## Conclusão

A *C. dubliniensis* apresenta-se como levedura emergente associada ao desenvolvimento de candidose oral, até então ignorada em decorrência de suas características fenotípicas similares às da *C. albicans*. Apesar de diversos trabalhos destacarem métodos fenotípicos variados para identificação de *C. dubliniensis* e *C. albicans*, as técnicas mais rápidas e sensíveis para identificação correta desta levedura baseiam-se em análises moleculares, particularmente a PCR.

Diversos aspectos relacionados aos fatores de virulência da *C. dubliniensis* e à resistência a drogas antifúngicas ainda não são completamente compreendidos. À semelhança do observado em outros fungos do gênero *Candida*, as propriedades de hidrofobicidade da superfície celular, a síntese de Saps e a presença de bombas de efluxo de drogas, particularmente através do sistema codificado pelo gene *CdMDR1*, se apresentam como características importantes presentes na *C. dubliniensis*.

Muito embora diversas características relacionadas ao perfil biológico da *C. dubliniensis* já serem conhecidas, ressaltamos o cuidado na comparação entre diversos trabalhos e suas metodologias, além da limitação inerente a cada método de isolamento destas leveduras. Por esta razão, mais pesquisas padronizadas são necessárias para um maior entendimento da importância da *C. dubliniensis* na candidose oral.

## Referências

- Hazen KC. Relationship between expression of cell surface hydrophobicity protein 1 (CSH1p) and surface hydrophobicity properties of *Candida dubliniensis*. *Curr Microbiol.* 2004;48:447-51.
- Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2004;4:369-76.
- Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, Ohshima T, Yamaguchi H. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58:235-7.
- Mosca CO, Moragues MD, Brena S, Rosa AC, Potón J. Isolation of *Candida dubliniensis* in a teenager with denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10(1):25-31.
- Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;253:9-17.
- Tekeli A, Akan OA, Koyuncu E, Dolapci I, Uysal S. Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001 and 2004. *Mycoses.* 2006;49:60-4.
- Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P. Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol.* 2007;60:1035-9.
- Kirkpatrick WR, Revankar SG, Mcatee RK, Lopez-Ribot JL, Fothergill AW, McCarthy DI, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998;36:3007-12.
- Staib P, Morschhäuser J. Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: an enigmatic developmental programme. *Mycoses.* 2006;50:1-12.
- Ellepola AN, Hurst SF, Elie CM, Morrison CJ. Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: comparison with phenotypic identification methods. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18:379-88.
- Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NA. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiol.* 1998;144(Pt 4):829-38.
- Alonso-Vargas R, Garaizar J, Potón J, Quindós G. Utility of random amplified polymorphic DNA in the discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol.* 2000;17:10-3.
- Perea S, Lopez-Ribot JL, Wickes BL, Kirkpatrick WR, Dib OP, Bachmann SP, et al. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2002;46:1695-793.
- Wirsching S, Moran GP, Sullivan DJ, Coleman DC, Morschhäuser J. *MDR1*-mediated drug resistance in *Candida dubliniensis*. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2001;45:3416-21.

15. Sullivan D, Westerneng T, Haynes K, Bennet D, Coleman D. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology*. 1995;141(Pt 7):1507-21.
16. Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC, McCreary CE, Harrington BJ, Shanley DB, et al. Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives in vitro. *Antimicrob Agents Chemoter*. 1997;41:617-23.
17. Hartung de Capriles C, Mata-Essayag S, Pérez C, Colella MT, Roselló A, Olaizola C, et al. Detection of *Candida dubliniensis* in Venezuela. *Mycopathologia*. 2005;160:227-34.
18. Brena S, Rubio MC, Salesa R, Iglesias I, Gil J, Rezusta A, et al. Genotipos de *Candida dubliniensis* en aislamientos clínicos. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:20-3.
19. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. 2005;48:62-7.
20. Tay ST, Chai HC, Na SL, Ng KP, Soo-Hoo TS. Molecular subtyping of clinical isolates of *Candida albicans* and identification of *Candida dubliniensis* in Malaysia. *Mycopathologia*. 2005;159:325-9.
21. Pontón J, Ruchel R, Clemons KV, Coleman DC, Grillot R, Guarro J, et al. Emerging pathogens. *Med Mycol*. 2000;38:225-36.
22. Mariano PLS, Milan EP, Matta DA, Colombo AL. *Candida dubliniensis*: identification in Brazilian yeast stock collection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:533-8.
23. Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2006;48:21-6.
24. Mähneß B, Stehr F, Schäfer W, Neuber K. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses*. 2005;48:55-61.
25. Meiller TF, Jabra-Rizk MA, Baqui A, Kelley JI, Meeks VI, Merz WG, et al. Oral *Candida dubliniensis* as a clinically important species in HIV-seropositive patients in the United States. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88:573-80.
26. Sano A, Vilela MM, Takahashi I, Fukushima K, Takizawa K, Silva MT, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from the oral cavity of an HIV-positive child in Brazil. *Nippon Ishikin Gakkai Zasshi*. 2000;41:177-81.
27. Alves SH, Milan EP, Moretti-Branchini ML, Nishimura K, Fukushima K, Oliveira LO, et al. First isolation of *Candida dubliniensis* in Rio Grande do Sul, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;39:165-8.
28. Milan EP, Sant'ana PL, Melo ASA, Sullivan DJ, Coleman DC, Lewi D, et al. Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2001;41:29-35.
29. Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1838-42.
30. Vidotto V, Mantoan B, Pugliesi A, Pontón J, Quindós G, Aoki S, et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. *Rev Iberoam Micol*. 2003;20:52-4.
31. Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath LL, Murray CK. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar Candida. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2006;5:1.
32. Mesa LM, Arcaya N, Cañas O, Machado Y, Calvo B. Evaluación de los caracteres fenotípicos para diferenciar *Candida albicans* de *Candida dubliniensis*. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:135-8.
33. Al-Mosaid A, Sullivan DJ, Coleman DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4787-9.
34. Khan ZU, Ahmad S, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4796-8.
35. Alves SH, Milan EP, de Laet Sant'Ana P, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic Sabouraud broth as a simple and powerful test for *Candida dubliniensis* screening. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002;43:85-6.
36. Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2590-2.
37. Somogyvari F, Doczi I, Serly J, Ahmad S, Nagy E. Rapid discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using a real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58:367-9.
38. Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, Fluit AC, Savelkoul PHM. Use of amplified length polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1357-62.
39. Joly S, Pujol C, Rysz M, Vargas K, Soll DR. Development and characterization of complex DNA fingerprinting probes for the infectious yeast *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 1999;37:1035-44.
40. Gee SF, Joly S, Soll DR, Meis JF, Verweij PE, Polacheck I, et al. Identification of four distinct genotypes of

- Candida dubliniensis* and detection of microevolution *in vitro* and *in vivo*. J Clin Microbiol. 2002;40:556-74.
41. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. Crit Rev Microbiol. 2006;32:217-26.
42. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells. Mycoses. 2007;50:391-6.
43. Silva GM, Silveira FRX, Pires MFC. Adherence to HeLa cells, typing by killer toxins and susceptibility to antifungal agents of *Candida dubliniensis* strains. Braz Oral Res. 2007;21:87-91.
44. Jabra-Rizk MA, Falkler Jr WA, Merz WG, Baqui AA, Kelley JJ, Meiller TF. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. Rev Iberoam Micol. 2001;18:17-22.
45. De Repentigny L, Aumont F, Bernard K, Belhumeur P. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. Infect Immun. 2000;68:3172-9.
46. Hornby JM, Jensen EC, Lise AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol. 2001;67:2982-92.
47. Henriques M, Martins M, Azeredo J, Oliveira R. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* morphogenesis. Lett Appl Microbiol. 2007;44:199-205.
48. Magee BB, Sanchez MD, Saunders D, Harris D, Berri-man M, Magee PT. Extensive chromosome rearrangements distinguish the karyotype of the hypovirulent species *Candida dubliniensis* from the virulent *Candida albicans*. Fungal Genet Biol. 2008;45:338-50.
49. Pinjon E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. Biochem Soc Trans. 2005;33:1210-14.
50. Borg-von Zepelin M, Niederhaus T, Gross U, Seibold M, Monod M, Tintelnot K. Adherence of different *Candida dubliniensis* isolates in the presence of fluconazole. AIDS. 2002;16:1237-44.
51. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Prevalence of *Candida dubliniensis* among germ tube-positive yeasts recovered from the respiratory specimens in HIV-negative patients. Mycoses. 2004;47:150-5.

Recebido: 03/04/2007

Aceito: 08/06/2008

