



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Dissertação de investigação
Mestrado Integrado em Medicina Dentária

**Influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno
na colonização oral por leveduras nos estudantes da
Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto**

Paula Cristina da Silva Campos

Orientador

Maria Benedita Almeida Garrett de Sampaio Maia Marques

Coorientador

Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira

Porto 2016/2017

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria Benedita Almeida Garrett de Sampaio Maia Marques, orientadora da dissertação de investigação, agradeço todo o apoio, a motivação, a disponibilidade e a ajuda imprescindível nesta investigação. Agradeço também por todos os conhecimentos transmitidos.

À Professora Doutora Maria de Lurdes Ferreira Lobo Pereira, coorientadora da dissertação de investigação, agradeço todo o apoio, a disponibilidade e colaboração durante a realização desta investigação.

À minha família agradeço pelo apoio incondicional que sempre me deram.

Um grande agradecimento também aos meus amigos e a todos os voluntários que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta dissertação.

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	1
Abstract.....	2
Lista de Abreviaturas	3
Introdução/Objetivos	4
Materiais e Métodos	7
Resultados.....	10
Discussão	19
Conclusão	23
Referências bibliográficas	24
ANEXOS	27
Explicação do estudo	28
Consentimento Informado.....	30
Questionário	32
Ficha de recolha de dados	39
Resultados	41
Parecer da Comissão de Ética	50
Declaração da autoria do trabalho apresentado.....	52
Parecer do Orientador	54

Resumo

Introdução: Estudos recentes mostraram a influência do tipo de parto e de aleitamento materno na composição e maturação do bacterioma oral, contudo, ainda se desconhece qual a influência no microbioma oral.

Objetivos: O objetivo deste trabalho foi estudar a influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno na colonização fúngica oral.

Metodologia: Em 200 estudantes saudáveis da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto avaliou-se a colonização por leveduras na cavidade oral através da colheita de saliva não estimulada, durante 5 minutos. A identificação das leveduras foi realizada pela técnica de quantificação em placa, recorrendo à cultura em meio Agar *Sabouraud* suplementado com cloranfenicol e, posteriormente, o meio *ChromAgar Candida* para determinação da espécie. A análise estatística foi realizada recorrendo aos testes qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste-t para amostras independentes.

Resultados: As espécies de *Candida* foram isoladas de 75 indivíduos (37,5%). A presença de leveduras na cavidade oral foi significativamente maior nos indivíduos que nasceram por parto normal em comparação com os que nasceram por cesariana ($p=0,035$). Por outro lado, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a prevalência de leveduras na cavidade oral e a presença ou ausência de amamentação ($p=0,398$).

Conclusão: Os nossos resultados sugerem que o nascimento por parto normal parece promover a colonização oral por leveduras, contudo a amamentação materna não parece ter influência na micologia oral.

Palavras-chave: tipo de parto; aleitamento materno; colonização oral; leveduras; *Candida*

Abstract

Introduction: Recent studies have shown the influence of the type of delivery and breastfeeding on the composition and maturation of the oral bacterioma, however, the influence on the oral mycobioma is still unknown.

Objective: Our aim is to investigate whether mode of delivery and breastfeeding are associated with oral colonization by yeasts.

Methods: In 200 healthy students of the Faculty of Dental Medicine of the University of Porto colonization by yeast in the oral cavity was evaluated by collecting unstimulated saliva for 5 minutes. Yeast identification was performed by plaque quantification using culture on *Sabouraud Agar* medium supplemented with chloramphenicol and *ChromAgar Candida* medium for determination of the species. Statistical analysis was performed using the chi-square test, Fisher's exact test and t-test for independent samples.

Results: *Candida* species were isolated from 75 (37,5%) subjects. The prevalence of yeasts in oral cavity was significantly higher in those who were born by normal delivery compared to those born by caesarean section ($p = 0.035$). On the other hand, no statistically significant differences were found between the prevalence of yeasts in the oral cavity and the presence or absence of breastfeeding ($p = 0.398$).

Conclusion: Our results suggest that delivery mode influences the oral yeast prevalence, specifically, normal delivery appears to promote oral yeast colonization. On the other hand, maternal breast feeding does not seem to influence oral mycology.

Keywords: mode of delivery; breastfeeding; oral colonization; yeasts; *Candida*

Lista de Abreviaturas

CFU – Unidades Formadoras de Colónias

FMDUP – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Ipatimup – Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

ITS - *Internal transcribed spacer*

MIMD – Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Introdução/Objetivos

O microbioma humano é um ecossistema complexo que varia consideravelmente em todo o corpo e entre indivíduos (1). Após o nascimento, a criança é exposta a microrganismos provenientes da mãe, do meio ambiente e da alimentação, desenvolvendo o seu próprio microbioma que continuará a maturar e a evoluir ao longo da vida (2, 3). Estudos recentes sugerem que ainda em ambiente intrauterino o feto é apresentado a microrganismos maternos, sendo este processo importante para a estimulação da tolerância antigénica precoce, permitindo, assim, uma aquisição pós-natal bem-sucedida do microbioma materno (4-6). Curiosamente, o microbioma intra-uterino é mais semelhante ao microbioma oral da mãe, do que ao microbioma materno intestinal ou da pele (7).

O microbioma infantil é influenciado por vários fatores como o tipo de parto, o meio ambiente, a prematuridade e o tipo de aleitamento (materno ou artificial) (3, 8). Para além do seu valor nutricional, o leite materno possui substâncias bioativas que impulsionam a colonização microbiana e o desenvolvimento do sistema imunológico, componentes que normalmente não se encontram nos leites artificiais (3, 9). Adicionalmente, o leite materno também proporciona inúmeros fatores de crescimento, influenciando a colonização e maturação de bactérias na mucosa intestinal (3, 6, 9). Assim, o leite materno é reconhecido como um dos elementos mais importantes no pós-parto para a modulação metabólica e programação imunológica relacionada com a saúde da criança (9). Mais recentemente, foi descrito que o leite materno tem um microbioma específico que varia durante a lactação (9-11). Tipicamente o leite materno inclui bactérias orais tais como as pertencentes aos géneros *Veillonella*, *Prevotella* e *Leptotrichia*, sugerindo que a amamentação pode representar uma fonte significativa de microrganismos orais (12, 13). No entanto, há pouca informação sobre o impacto da amamentação na composição da microbiota oral.

Durante o parto ocorre uma transmissão significativa de microrganismos vaginais ou da pele da mãe para o recém-nascido, durante o parto normal ou cesariana, respetivamente (14, 15). Assim, crianças nascidas por parto normal apresentam em todos os habitats do corpo comunidades bacterianas similares, em termos de composição, às comunidades vaginais, enquanto que as crianças nascidas por cesariana apresentam comunidades bacterianas semelhantes ao encontrado na pele das mães (16).

Existem evidências que sugerem que a realização de um parto por cesariana pode levar a diferenças no estabelecimento inicial da microbiota intestinal e, posteriormente, condicionar o equilíbrio saúde/doença da criança. Por outro lado, a influência do tipo de parto no estabelecimento da microbiota oral da criança está ainda por esclarecer (17).

Têm sido realizados vários estudos com o objetivo de definir qual a influência do tipo de parto e tipo de aleitamento materno no microbioma oral das crianças, tendo sido verificada alguma influência na colonização bacteriana oral (12, 13, 16). Contudo, ainda se desconhece qual a influência na colonização fúngica oral.

Os componentes fúngicos do microbioma oral desempenham um papel significativo na modulação da comunidade oral e também podem contribuir para o desenvolvimento de doenças no hospedeiro. Comparativamente ao componente bacteriano da microbiota, o componente fúngico ou micobioma encontra-se pouco estudado. São vários os fatores que contribuem para esse aspeto, nomeadamente o facto dos fungos apresentarem-se numa proporção significativamente menor do que as bactérias, dificuldade em isolar o material genético dos fungos e muitas espécies são, ainda, incultiváveis utilizando os métodos atuais (18).

Estudos recentes mostraram que a cavidade oral saudável contém um conjunto de espécies de fungos muito mais diversificado do que se pensava anteriormente (18-21). *Ghannoum et al.* mostrou que a cavidade oral de um indivíduo saudável possui mais de 75 géneros de fungos, sendo os mais prevalentes *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, e *Aspergillus*, encontradas em 25-75% dos indivíduos (18, 19). Mais tarde, outros estudos realizados confirmaram esses resultados (20, 21), mostrando que para além das espécies mencionadas por *Ghannoum et al.*, também *Malassezia spp.* é frequente no micobioma oral de um indivíduo saudável e que a prevalência de colonização fúngica é provavelmente de 100% (18, 20).

O facto de um pequeno número de fungos ter um grande efeito sobre a microbiota oral fez com que os fungos passassem a ser denominados como potenciais espécies “chave” (18). As leveduras do género *Candida* são a causa mais comum de infeções fúngicas nos seres humanos, sendo a espécie mais prevalente a *Candida albicans* (22-26). É, geralmente, um microrganismo comensal, embora, em algumas circunstâncias possa tornar-se patogénico, revelando o seu carácter oportunista (23-26). Outras espécies mais comuns capazes de causar doença nos humanos são *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida dubliniensis* (27). A maioria destas espécies de *Candida* crescem como forma de levedura unicelular, enquanto a

Candida albicans também é capaz de formar hifas ou pseudo-hifas que lhe permitem formar biofilmes complexos, o que contribui para a sua patogenicidade em seres humanos (25, 27).

Devido à sua natureza quase ubíqua e facilidade de cultura, a *Candida albicans* é uma exceção no micobioma, na medida em que se encontra bem estudada no contexto das suas interações inter-reinos e conhecesse bem a sua importância para a comunidade microbiológica (18). *Candida albicans* apresenta propriedades e fatores de virulência que promovem a formação de biofilmes e a capacidade de persistir no interior do hospedeiro (24). A mais importante é a propriedade de transição morfológica, com estados morfológicos distintos (levedura, pseudo-hifa, hifa) que ditam as fases de colonização, crescimento e disseminação (24, 25). A forma de levedura tem sido associada à ligação inicial e difusão, enquanto que a forma de hifa filamentosa permite-lhe formar o biofilme e invadir o tecido do hospedeiro (24). Outra propriedade importante de virulência é a adesão mediada por adesinas da parede celular e produção de várias enzimas extracelulares envolvidas na invasão do tecido do hospedeiro e a aquisição de nutrientes (24, 25, 27). Esta situação é ainda agravada pela resistência da *Candida albicans* ao número relativamente limitado de fármacos anti-fúngicos disponíveis (24).

Nos primeiros anos de vida, as crianças apresentam uma maior predisposição à colonização da cavidade oral por microrganismos oportunistas, devido a um sistema imunológico ainda imaturo, microbiota oral normal não estabelecida e maior predisposição a infeções sistémicas, daí a importância de intensificar os estudos relacionados com a transmissão e proliferação de *Candida spp* na cavidade oral (22).

O objetivo deste trabalho é caraterizar a influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno na colonização fúngica oral em indivíduos jovens saudáveis.

Materiais e Métodos

Este estudo, de carácter transversal, foi realizado numa população de 200 estudantes saudáveis, inscritos no Mestrado Integrado de Medicina Dentária (MIMD), na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP), com idades compreendidas entre os 19 e os 29 anos. Os critérios de exclusão incluíram: incapacidade de dar consentimento informado, gravidez e doenças infecciosas orais agudas.

A todos os participantes foi explicado oralmente o estudo e entregue em simultâneo a folha de informação. Aos que aceitaram participar foi pedido o seu consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. Durante a realização deste estudo foram respeitadas as regras de conduta expressas na Declaração de Helsínquia e a Legislação Nacional em vigor, garantindo a necessária confidencialidade das informações pessoais recolhidas. Todos os estudantes participaram no estudo de forma livre e voluntária. A participação no estudo foi efetivada após a assinatura do documento com explicação do estudo (Anexo 1) e da declaração de consentimento informado (Anexo 2).

De forma a garantir o anonimato dos participantes e a confidencialidade dos dados recolhidos foi efetuada a codificação dos questionários de acordo com as regras de proteção de dados. Os resultados só serão apresentados de forma global ou numa referência numérica, nunca se referindo a casos individuais.

A cada participante foi recolhida saliva não estimulada, durante 5 minutos, para um recipiente estéril, graduado e identificado com um código. O mesmo código foi utilizado por cada participante no preenchimento do inquérito. Durante a colheita os participantes foram supervisionados de forma a manterem os tubos sempre fechados, abrindo-os apenas no momento de colocação da saliva. Seguidamente procedeu-se à determinação da concentração salivar de leveduras, do fluxo salivar e do pH da saliva. A determinação do pH salivar foi realizada imediatamente após a colheita da saliva, colhendo mais um pouco de saliva diretamente para um papel de alumínio e medindo o seu valor diretamente com papel indicador de pH (5.0-8.0, *Duotest, Germany*).

Adicionalmente, cada participante respondeu a um inquérito anónimo para a obtenção de dados demográficos, história clínica, hábitos de higiene, hábitos alimentares, alcoólicos e tabágicos, assim como o tipo de parto e o tipo de aleitamento materno do estudante (Anexo 3).

Imediatamente após a colheita de saliva, procedeu-se à análise microbiológica semeando em duplicado 100µl da amostra em meio *Sabouraud* suplementado com cloranfenicol para avaliar a presença de leveduras. As placas de petri foram incubadas a 37°C durante 2/3 dias em aerobiose. Por fim, as colónias foram contadas e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colónias por mL de saliva (CFU/mL). Realizou-se diferenciação entre as colónias leveduriformes e os fungos filamentosos.

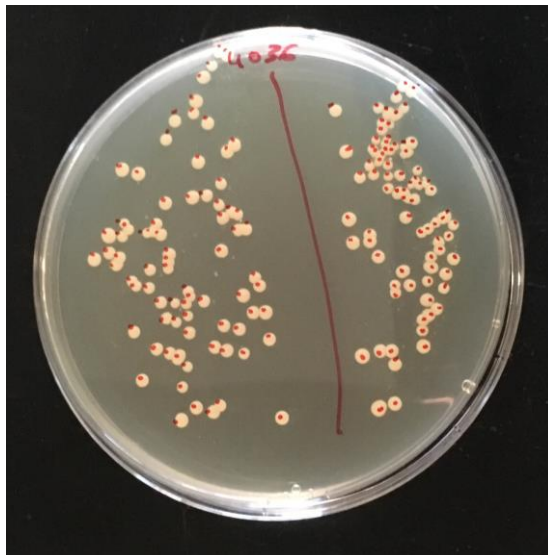


Figura 1 – Contagem das colónias

Repicaram-se os isolados por esgotamento em meio *ChromAgar Candida*, incubando as placas a 37°C durante 2/3 dias em aerobiose. Após o período de incubação, registou-se a cor das colónias dos isolados na respetiva folha de recolha de dados (Anexo 4) para determinação das espécies de *Candida*. Os isolados que não apresentaram cor identificativa foram posteriormente identificados por métodos de biologia molecular, com a colaboração do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (Ipatimup). Foi utilizado um método baseado em hidróxido de sódio para extrair o DNA das leveduras. A identificação destes microrganismos baseou-se na análise das sequências dos genes 18s e ITS (*Internal transcribed spacer*). A amplificação por PCR foi realizada utilizando um grupo de *primers* específicos (EF3, EF4, fung5, ITS1-F, ITS4), num termociclador *Thermo-Hybaidd-PX2*. Os produtos da amplificação foram visualizados num gel de poliacrilamida seguido de coloração com prata. A análise de sequência foi utilizada para identificar fragmentos de genes modificados utilizando um Analisador Genético *ABI-Prism-3100* (*AppliedBiosystems*). Os dados genéticos foram comparados

com uma base de dados que compreende uma ampla coleção de sequências dos genes 18s e regiões ITS obtidas a partir do *Genbank*.

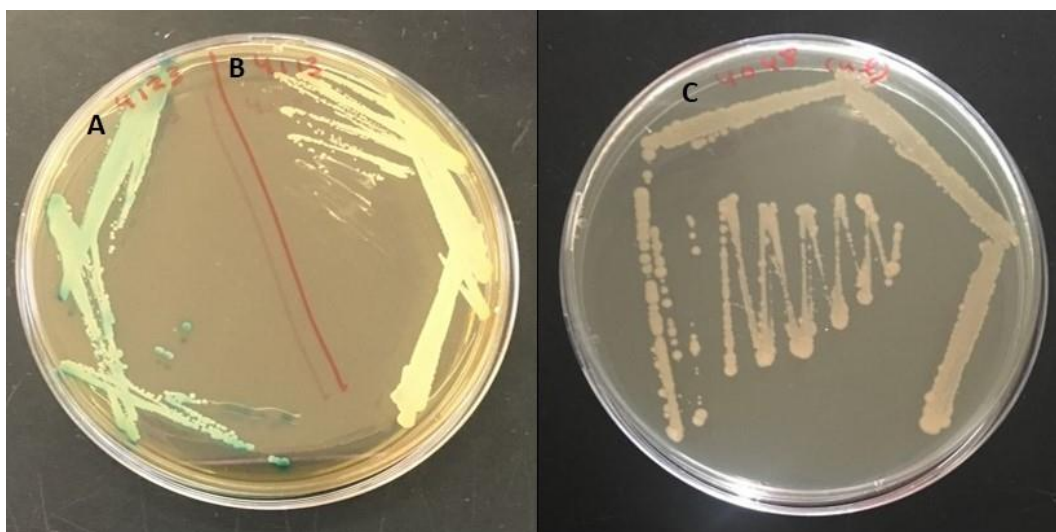


Figura 2 – Determinação das espécies de *Candida* (meio *ChromAgar Candida*): **A.** *Candida albicans*; **B.** *Candida sp.*; **C.** *Candida krusei*.

Análise estatística

Os dados recolhidos foram analisados no programa IBM® SPSS® *Statistics* vs 24 (*Statistical Package for the Social Sciences*) utilizando as técnicas mais adequadas para as variáveis envolvidas.

A análise estatística foi realizada para as variáveis categóricas usando o teste de independência do qui-quadrado ou teste de Fisher (quando as frequências esperadas eram inferiores a 5), e para as variáveis contínuas, usando teste-t para amostras independentes, assumindo ou não variâncias iguais dependendo do resultado do teste de *Levene*.

A regra de decisão utilizada consiste em detetar evidência estatística significativa para valores de probabilidade (valor prova do teste) inferiores a 0,05.

Resultados

Sendo o principal objetivo deste estudo a avaliação da influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno na colonização fúngica oral, realizou-se uma investigação de carácter transversal.

Foi avaliada a prevalência de cada variável na população estudada e posteriormente comparada com a prevalência de fungos na cavidade oral. Também foi avaliada a possível relação existente entre a prevalência de fungos na cavidade oral e outros fatores, nomeadamente a higiene oral, uso de aparelhos, saúde e doenças orais e os hábitos tabágicos.

Os resultados do estudo são apresentados sob a forma de tabelas e figuras, sendo que o número total de indivíduos consta em todos estes elementos, uma vez que determinados participantes não responderam a algumas perguntas do questionário.

1. Caraterização da Amostra de Participantes

Dos 200 indivíduos a quem foi realizada a colheita de saliva, apenas 187 responderam ao questionário.

1.1. Sexo e idade

A amostra final de 187 indivíduos era constituída por 151 indivíduos do sexo feminino e 36 do sexo masculino, cuja proporção pode ser observada na figura 3.

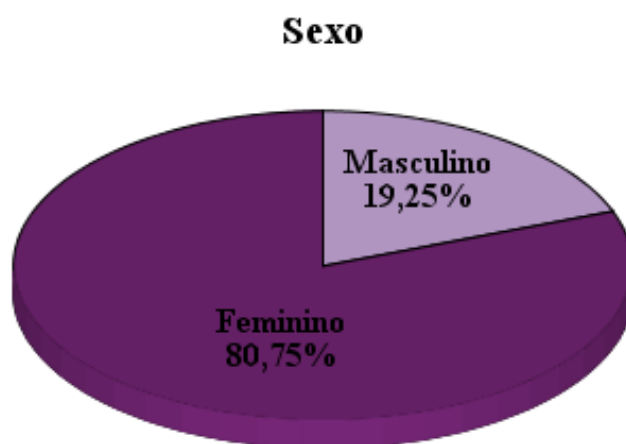


Figura 3 – Distribuição da amostra segundo o sexo dos indivíduos (n=187)

A idade dos indivíduos variou entre os 19 e os 29 anos, com uma média de idade de 21,61 $\pm$ 1,86 anos. A mediana é igual nos dois sexos (21 anos) e realça-se que os valores máximo e mínimo para cada grupo foram próximos, apesar do intervalo de idades no sexo feminino (19-29 anos) ser mais abrangente quando comparado com o sexo masculino (20-27 anos).

1.2. Nível de escolaridade (MIMD)

A figura 4 evidencia a distribuição dos participantes segundo o ano letivo em que se encontravam inscritos aquando da realização da colheita de saliva. Em 2016 foi realizada a colheita aos estudantes do 2º ano do MIMD e em 2017 aos estudantes inscritos no 2º, 4º e 5º ano do MIMD.

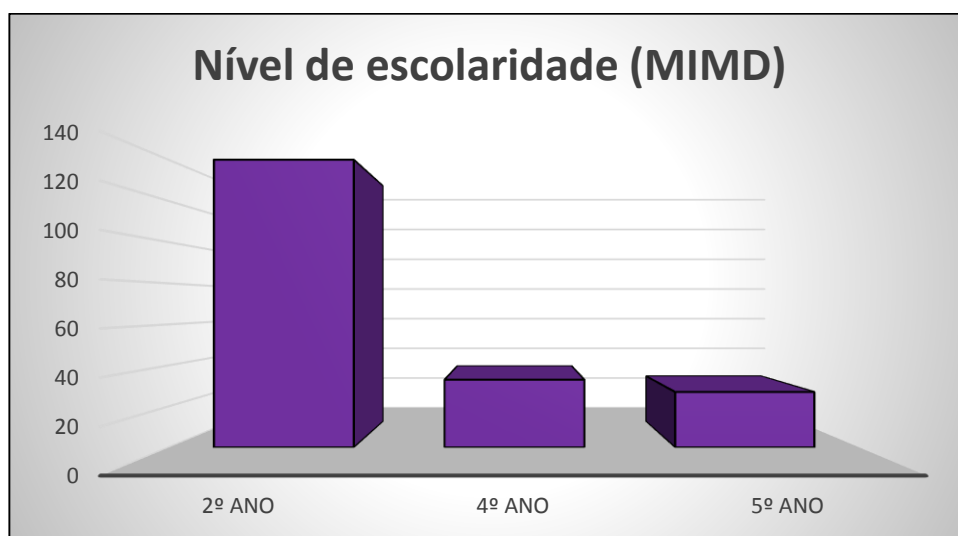


Figura 4 – Distribuição dos participantes segundo o nível de escolaridade no MIMD (n=200)

2. Influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno na prevalência de fungos na cavidade oral

Relativamente à prevalência de fungos na cavidade oral, com a metodologia aplicada, foram identificadas colónias de leveduras em pouco mais de $\frac{1}{3}$ dos 200 participantes do estudo (figura 5).

Prevalência de fungos na cavidade oral

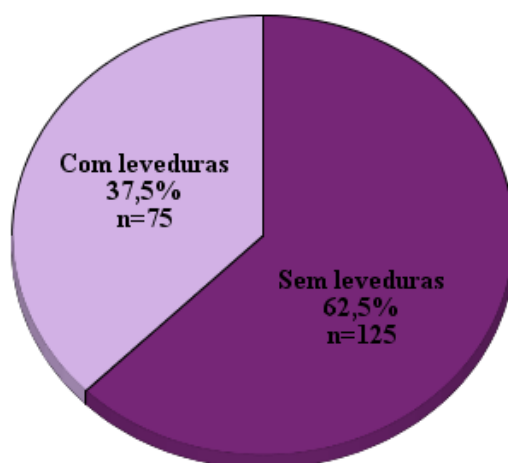


Figura 5 – Distribuição da amostra segundo a prevalência de fungos na cavidade oral (n=200)

A cultura realizada em meio *ChromAgar Candida* permitiu o crescimento e posterior identificação de 86,4% das espécies de *Candida*. A levedura *Candida albicans* foi identificada com maior frequência, estando presente em mais de $\frac{3}{4}$ dos casos (figura 6). A *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanea* foram identificadas através de métodos de biologia molecular.

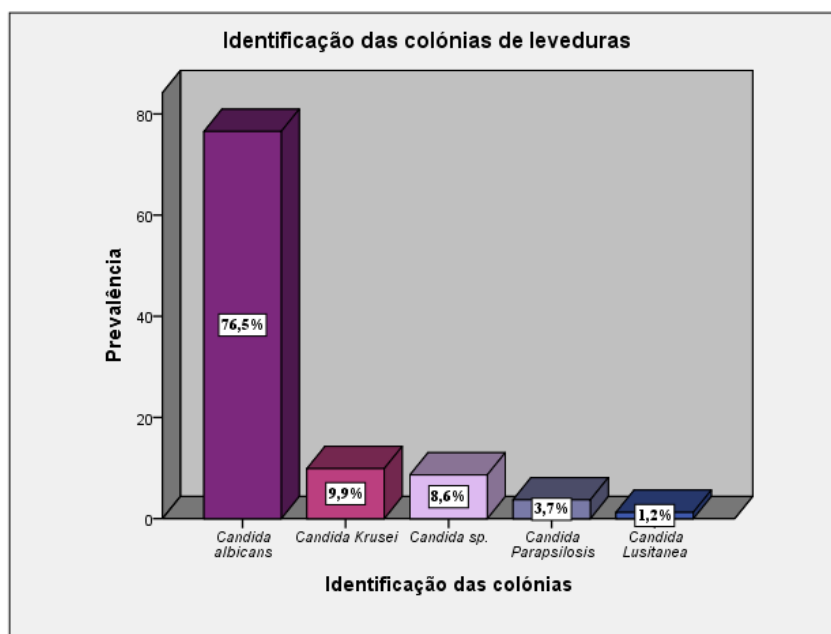


Figura 6 – Identificação das colónias de leveduras

2.1. Método de parto

Com o objetivo de verificar a influência do método de parto na presença de leveduras na cavidade oral realizou-se a comparação das variáveis “Prevalência de fungos na cavidade oral” e “Método de parto”. Apesar de termos 200 participantes, treze casos foram excluídos devido à falta de informação numa das variáveis do estudo.

Da amostra de 187 participantes, 125 nasceram por parto normal e 62 nasceram por cesariana (figura 7).



Figura 7 – Distribuição da amostra segundo o método de parto (n=187)

Na tabela I descrevem-se os resultados obtidos, onde é possível observar que os jovens nascidos por parto normal apresentam uma prevalência de fungos na cavidade oral mais elevada que os jovens nascidos por cesariana. Também, entre os jovens com colonização oral por leveduras, observam-se diferenças estatisticamente significativas quanto à quantidade de leveduras presente na cavidade oral.

Tabela I – Prevalência e quantificação de leveduras orais em jovens nascidos por parto normal e por cesariana.

	Parto Normal	Cesariana	p
Prevalência de leveduras, %	41,6%	25,8%	0,035^a
Quantificação de leveduras, Log CFU/mL	13,68 ± 38,02	1,69 ± 0,62	0,030^b

Os resultados estão expressos em percentagem (%) ou média±desvio padrão. ^a Qui-quadrado, ^b Teste-t para amostras independentes, variâncias iguais não assumidas (teste *Levene*, p=0,011).

2.2. Tipo de aleitamento

De forma a verificar a influência do tipo de aleitamento na presença de leveduras na cavidade oral realizou-se a comparação das variáveis “Prevalência de fungos na cavidade oral” e “Amamentação (Sim/Nunca)”. Dos 200 participantes, quinze casos foram excluídos devido à falta de informação numa das variáveis do estudo.

Da amostra de 185 participantes, 170 foram amamentados e 15 nunca foram amamentados (figura 8).

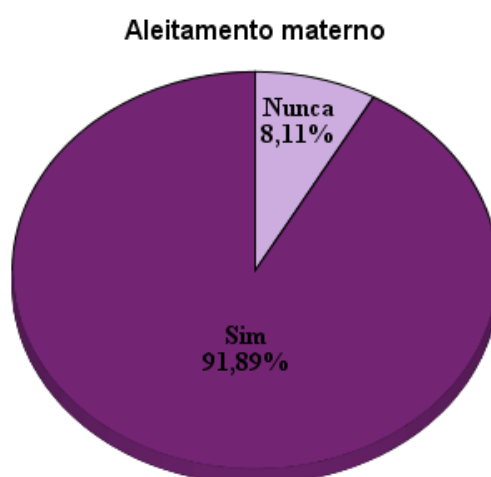


Figura 8 – Distribuição da amostra segundo o tipo de aleitamento (n=185)

Na tabela II descrevem-se os resultados obtidos, onde é possível observar que os jovens amamentados apresentam uma prevalência de fungos na cavidade oral superior aos jovens que nunca foram amamentados. Contudo, essa diferença não é estatisticamente significativa. Para além disso, entre os jovens com colonização oral por leveduras, não se observam diferenças estatisticamente significativas quanto à quantidade de leveduras presente na cavidade oral.

Tabela II – Prevalência e quantificação de leveduras orais em jovens amamentados e que nunca foram amamentados

	Amamentação		
	Sim	Nunca	p
Prevalência de leveduras, %	37,6%	26,7%	0,398 ^a
Quantificação de leveduras, Log CFU/mL	11,34 ± 34,41	2,07 ± 0,58	0,595 ^b

Os resultados estão expressos em percentagem (%) ou média±desvio padrão. ^a Qui-quadrado, ^b Teste-t para amostras independentes, variâncias iguais assumidas (teste *Levene*, p=0,255).

3. Influência de múltiplos fatores na prevalência de fungos na cavidade oral

Após a realização da colheita de saliva, cada participante procedeu à determinação do seu pH salivar e ao fluxo salivar através da divisão do volume colhido (mL) pelo tempo de colheita (min). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a colonização oral por leveduras e o fluxo salivar, na medida em que os participantes com menor fluxo salivar apresentaram uma maior prevalência de leveduras na cavidade oral. Contudo, este resultado não interfere no efeito do tipo de parto sobre a colonização oral por fungos, pois não se observaram diferenças quanto ao fluxo salivar entre participantes nascidos por parto normal ou cesariana ($0,48 \pm 0,23 \text{ mL/min}$ vs $0,40 \pm 0,28 \text{ mL/min}$, $p=0,062$).

Tabela III – Valores de pH e fluxo salivar nos participantes com e sem colonização oral por leveduras

	Colonização oral por leveduras		p
	Sim	Não	
pH	$6,88 \pm 0,44$	$6,97 \pm 0,42$	$0,224^a$
Fluxo salivar, mL/min	$0,37 \pm 0,23$	$0,46 \pm 0,30$	$0,025^a$

Os resultados estão expressos em média±desvio padrão. ^a Teste-t para amostras independentes, variâncias iguais assumidas

Também foi pesquisada a presença de outros fatores considerados relevantes de forma a avaliar a influência destes na presença de leveduras na cavidade oral (Anexo 5). Considerou-se importante avaliar diversos fatores relacionados com a higiene oral do participante (tabela IV) e outros fatores como o uso de aparelhos, saúde e doença oral e hábitos tabágicos (tabela V).

De todos os fatores de risco estudados (tabelas IV e V), a análise da “Frequência de consultas no Médico Dentista” e “Sensação de xerostomia”, para a metodologia aplicada, mostrou diferenças estatisticamente significativas quanto à prevalência de leveduras na cavidade oral. Contudo, estes resultados também não interferem no efeito do tipo de parto sobre a colonização oral por fungos, pois não se observaram diferenças entre participantes nascidos por parto normal ou cesariana quanto à “Frequência de

consultas no Médico Dentista” (Visitam o médico dentista pelo menos 1x por ano: 90,3% vs 88,3%, $p=0,751$) e “Sensação de xerostomia” (0,0% vs 6,8%, $p=0,052$).

Dos 187 participantes que responderam ao questionário foram excluídos 8 casos relativamente à análise da variável “Gengivite” e 28 casos relativamente à “Sensação de xerostomia”, uma vez que os estudantes referiram não saber se apresentavam gengivite ou xerostomia, respetivamente

Tabela IV – Influência de múltiplos fatores relacionados com a higiene oral na colonização oral por leveduras

Fatores de risco	Colonização oral por leveduras	Ausência de colonização oral por leveduras	p
	Pelo menos 1x/ano	Pelo menos 1x/ano	
<i>Frequência de consultas no Médico Dentista (n=187)</i>	95,6%	85,7%	0,036^a
	Pelo menos 2x/dia	Pelo menos 2x/dia	
<i>Frequência de escovagem dentária/dia (n=186)</i>	97,1%	96,6%	1,000 ^b
	Pelo menos 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	
<i>Escovagem do dorso da língua (n=186)</i>	64,2%	54,6%	0,205 ^a
<i>Escovagem das bochechas (n=187)</i>	8,8%	10,9%	0,647 ^a
<i>Escovagem das gengivas (n=187)</i>	63,2%	61,3%	0,798 ^a
<i>Escovagem do palato (n=187)</i>	13,2%	7,6%	0,206 ^a
<i>Uso de fio/fita dentária (n=186)</i>	22,1%	25,4%	0,606 ^a
<i>Uso de raspador de língua (n=186)</i>	4,4%	7,6%	0,540 ^b
<i>Uso de escovilhão (n=186)</i>	11,8%	8,5%	0,465 ^a
	Sim	Sim	
<i>Utilização de escova elétrica (n=186)</i>	10,3%	11,0%	0,878 ^a

Os resultados estão expressos em percentagem (%). ^a Qui-quadrado, ^b Teste exato de Fisher.

Tabela V – Influência de múltiplos fatores na colonização oral por leveduras

Fatores de risco	Colonização oral por leveduras	Ausência de colonização oral por leveduras	p
	Sim	Sim	
<i>Uso de aparelho ortodôntico (n=186)</i>	98,5%	55,9%	0,076 ^a
<i>Uso de aparelho de contenção (n=186)</i>	38,2%	33,9%	0,552 ^a
<i>Uso de goteira (n=186)</i>	23,5%	19,5%	0,515 ^a
<i>Uso de prótese dentária (n=186)</i>	0,0%	1,7%	0,534 ^b
<i>Gengivite (n=179)</i>	4,7%	2,6%	0,668 ^b
<i>Xerostomia (n=159)</i>	10,7%	1,0%	0,008^b
	Não	Não	
<i>Doença periodontal (n=186)</i>	97,1%	97,5%	1,000 ^b
	Fumador diário	Fumador diário	
<i>Hábitos tabágicos (n=186)</i>	13,2%	7,6%	0,213 ^a

Os resultados estão expressos em percentagem (%). ^a Qui-quadrado, ^b Teste exato de Fisher.

Discussão

O microbioma humano inclui uma grande diversidade de fungos, contudo a levedura *Candida* é a mais prevalente. Existem cerca de cento e cinquenta espécies de *Candida*, que podem ser encontradas em diversos ambientes, como o ar, o solo, a água, plantas e em animais, embora, apenas uma pequena parte é capaz de colonizar e causar doença nos seres humanos (25, 27). As infeções fúngicas nos seres humanos são provocadas predominantemente pela espécie *Candida albicans* (22-26). Assim como referido na literatura, também neste estudo a espécie de leveduras mais frequente na cavidade oral dos participantes foi a *Candida albicans* (76,64%).

Atualmente sabe-se que o microbioma infantil é influenciado por múltiplos fatores, nomeadamente o tipo de parto e o tipo de aleitamento, para além de outros (3, 8). Estudos realizados previamente sugerem que estes dois fatores influenciam a colonização bacteriana oral (12, 13, 16), desconhecendo-se ainda a influência na colonização fúngica devido à ausência de estudos publicados. Contudo, está descrito que na colonização da cavidade oral do recém-nascido pós-parto, pode ocorrer o envolvimento de leveduras do género *Candida*, pois durante o parto normal há deglutição de gotículas da secreção vaginal da mãe (22). Nos casos de mães com vulvovaginite por *Candida*, patologia comum no terceiro trimestre de gravidez, a transmissão poderá ser mais facilitada (22). Sendo assim, os recém-nascidos podem adquirir *Candida* durante o parto normal ou mais tarde a partir do meio ambiente (2).

Para a metodologia aplicada neste estudo, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre a prevalência de fungos na cavidade oral e o tipo de parto, para um intervalo de confiança de 95%. Assim, podemos concluir que os indivíduos que nascem por parto normal apresentam uma maior tendência para a colonização oral por leveduras. Essa tendência deve-se, provavelmente, à maior transmissão de *Candida* vaginal logo à nascença, que potencia a sua integração no microbioma oral ao longo da vida. Isto porque, atualmente sabe-se que, durante o parto normal, ocorre uma transmissão significativa de microrganismos vaginais para o recém-nascido (14, 15). Verificou-se também que os participantes que nasceram por parto normal apresentavam maior quantidade de leveduras na cavidade oral do que os nascidos por cesariana. Este facto reforça que o nascimento por parto normal pode potenciar ou facilitar a colonização oral por leveduras. Logo após o nascimento, o recém-nascido entra em contacto com uma

grande variedade de microrganismos, podendo ser colonizado devido ao seu estado de tolerância antigénica (13, 28). Contudo, apenas uma pequena parte desses microrganismos é capaz de colonizar permanentemente o indivíduo (13, 29). O conjunto de colonizadores orais primários parece condicionar a colonização subsequente, o que levará a ecossistemas mais complexos e estáveis na idade adulta (13, 30). Desta forma, as primeiras comunidades microbianas desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da microbiota do adulto (13).

Na literatura científica, a prevalência de fungos na cavidade oral não é consensual, variando de 30% a 100% numa população jovem (18, 20). A metodologia aplicada neste estudo apresenta baixa sensibilidade, o que pode ter interferido com a real deteção de leveduras na cavidade oral dos participantes. Contudo, é importante notar que a prevalência de portadores orais de fungos encontrada no nosso estudo é semelhante ao reportado por outros estudos que utilizam técnicas de cultura tradicionais (31, 32). Esta é a principal limitação deste estudo, sendo importante a realização de estudos futuros utilizando métodos mais sensíveis, como reportado por *Monteiro-da-Silva* (21), ou por biologia molecular (19).

Por outro lado, neste estudo, essa influência não foi verificada para o tipo de aleitamento (materno vs. artificial). Apesar de se verificar que a quantidade média de leveduras na cavidade oral dos participantes amamentados é mais de cinco vezes superior à quantidade média observada nos participantes que nunca foram amamentados, essa diferença não é estatisticamente significativa. Estudos recentes mostraram que o leite materno apresenta um microbioma específico, que varia ao longo da lactação (5). Naturalmente, a amamentação pode representar uma fonte significativa de microrganismos orais. Apesar de existirem poucos estudos sobre o microbioma do leite, a levedura *Candida* não parece estar presente (33). Adicionalmente, alguns fatores imunológicos do leite parecem ter efeitos inibitórios sobre a colonização de *Candida* (2, 34).

Neste estudo, durante a análise de outros fatores foi possível detetar diferenças estatisticamente significativas entre a prevalência de fungos na cavidade oral com três variáveis: “Frequência de consultas no Médico Dentista”, “Sensação de xerostomia” e “Fluxo salivar”. Contudo, quando comparamos estas mesmas variáveis entre participantes nascidos por parto normal ou cesariana não se observaram diferenças, podendo ser inferido que estas variáveis não tiveram influência nos resultados obtidos para o tipo de parto.

Relativamente à frequência de consultas no Médico Dentista, os participantes foram divididos em dois grupos: aqueles que visitam o Médico Dentista regularmente (pelo menos uma vez por ano) e aqueles que realizam consultas menos de uma vez por ano. Neste estudo, verificou-se que os participantes que vão mais vezes ao Médico Dentista apresentam uma maior prevalência de *Candida* na cavidade oral. Contudo, a frequência de participantes que vão menos de uma vez por ano ao Médico Dentista é baixa (10,7%), o que pode levar ao aparecimento de resultados erróneos. De forma a avaliar a real influência da variável “Frequência de consultas no Médico Dentista” na prevalência de leveduras na cavidade oral, teria que ser realizado outro estudo na qual a distribuição da amostra deveria ser equitativa para os dois grupos. Para além disso, existem outros fatores que podem interferir nesta variável, como, por exemplo, o uso de aparelhos ortodônticos ou goteiras. Os pacientes portadores destes aparelhos geralmente realizam consultas regulares de controlo no Médico Dentista. Por outro lado, a presença de aparelhos ortodônticos na cavidade oral aumenta a prevalência de *Candida*, sendo a espécie *Candida albicans* a que é isolada com maior frequência (35). O uso de aparelhos orais dificultam a realização de uma correta higiene oral e podem alterar a função de proteção da saliva, dificultando, por exemplo, a auto-limpeza (36). Neste estudo, 113 jovens usam ou já usaram aparelho ortodôntico (60,8%). Esta condição altera o ambiente microbiológico que leva ao aumento da prevalência de *Candida* na cavidade oral e, alguns pacientes suscetíveis podem passar de não-portadores de *Candida* a portadores de *Candida* após o uso de aparelho ortodôntico (36, 37). Para além disso, através do questionário foi possível verificar que grande parte dos participantes não escovam todas as estruturas da cavidade oral diariamente. A percentagem de jovens que escova, pelo menos, uma vez por dia o dorso da língua é de 58,1%, as bochechas é de 10,2%, a gengiva é de 62,0% e o palato é de 9,6%. A literatura revela que a má higiene oral tem sido frequentemente descrita como um fator predisponente local para a candidíase em indivíduos dentados, embora ainda não haja evidência científica que o comprove (37).

A xerostomia, ou sensação de boca seca, afeta de 14% a 40% de todos os adultos (38). Para a metodologia aplicada neste estudo, verificou-se que os estudantes que referem ter sensação de boca seca apresentam uma maior prevalência de leveduras na cavidade oral.

A hipossalivação pode ser causada por fatores localizados, como patologias associadas às glândulas salivares (sialoadenite, sialolitíase) ou destruição das mesmas por irradiação da cabeça e pescoço no tratamento de carcinomas (38). Outras condições

sistémicas também podem afetar o fluxo salivar, tais como desidratação, doenças auto-imunes (Síndrome de Sjogren, SIDA, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide e esclerodermia), distúrbios hormonais (diabetes não controlada, disfunção da tiroide), distúrbios neurológicos (doença de Parkinson, paralisia de Bell, paralisia cerebral) e doenças psicogénicas, como a depressão (38, 39). De forma geral, a causa mais comum da diminuição da produção salivar é a toma de medicamentos, principalmente em pacientes polimedicados (38). Para além de outras funções, as proteínas salivares possuem propriedades antibacterianas para hidrólise de membranas celulares (lactoferrina, lisozima, lactoperoxidase) e inibem a adesão microbiana (imunoglobulinas) (38, 40). Assim sendo, a diminuição do fluxo salivar resulta num desequilíbrio oral clinicamente significativo que pode manifestar-se com aumento da prevalência de cárie dentária, disgeusia, glossodinia, halitose, entre outras complicações (38, 40). Está também descrito na literatura uma associação com o aumento do risco de infeções oportunistas, como a candidíase oral (38-41). *Navio et al.* observaram grande variabilidade e intervalos amplos nas taxas de fluxo salivar demonstrando que, sob circunstâncias normais, alguns indivíduos saudáveis requerem pouco fluxo salivar para manter a cavidade oral saudável, e propondo que o intervalo normal de fluxo salivar pode variar para cada individuo (38). Dados publicados mostraram que existe uma associação inversa entre as taxas de fluxo salivar e as contagens de *Candida albicans* na saliva (39). Neste estudo, verifica-se que os participantes que têm baixo fluxo salivar apresentam uma maior prevalência de leveduras na cavidade oral o que corrobora os resultados encontrados no nosso estudo.

Uma vez demonstrada a ausência de significância estatística para os múltiplos fatores associados à higiene oral e hábitos, este estudo sugere que o tipo de parto pode potenciar a colonização oral por *Candida*.

Conclusão

De acordo com a metodologia aplicada e com base na análise e discussão dos resultados foi possível concluir que o método de parto pode influenciar a colonização oral por leveduras, em específico os indivíduos que nascem por parto normal apresentam maior propensão para serem colonizados por leveduras na cavidade oral e por apresentaram níveis mais elevados de leveduras relativamente aos indivíduos nascidos por cesariana. Por outro lado, o tipo de aleitamento não parece influenciar a prevalência e a quantidade de leveduras na cavidade oral.

A realização de estudos longitudinais sobre o tema pode ser uma mais-valia, sobretudo se a avaliação da colonização oral por leveduras for realizada logo após o nascimento da criança e ao longo do período de desenvolvimento e maturação da microbiota oral.

Referências bibliográficas

1. Ding T, Schloss PD. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*. 2014;509(7500):357-60.
2. Steckslen-Blicks C, Granstrom E, Silfverdal SA, West CE. Prevalence of oral *Candida* in the first year of life. *Mycoses*. 2015;58(9):550-6.
3. Gomez-Gallego C, Collado MC, Perez G, Ilo T, Jaakkola UM, Bernal MJ, et al. Resembling breast milk: influence of polyamine-supplemented formula on neonatal BALB/cOlaHsd mouse microbiota. *Br J Nutr*. 2014;111(6):1050-8.
4. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJ. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:85.
5. Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Perez-Mongiovi D, Araujo R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv Appl Microbiol*. 2016;97:171-210.
6. Al-Shehri SS, Sweeney EL, Cowley DM, Liley HG, Ranasinghe PD, Charles BG, et al. Deep sequencing of the 16S ribosomal RNA of the neonatal oral microbiome: a comparison of breast-fed and formula-fed infants. *Sci Rep*. 2016;6:38309.
7. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014;6(237):237ra65.
8. Treven P, Mrak V, Bogovic Matijasac B, Horvat S, Rogelj I. Administration of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus gasseri* K7 during pregnancy and lactation changes mouse mesenteric lymph nodes and mammary gland microbiota. *J Dairy Sci*. 2015;98(4):2114-28.
9. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(3):544-51.
10. Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodriguez JM. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(5):523-8.
11. Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012;9(10):565-76.
12. Holgerson PL, Vestman NR, Claesson R, Ohman C, Domellof M, Tanner AC, et al. Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(2):127-36.
13. Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014;11(3):291-301.
14. Lif Holgerson P, Harnevik L, Hernell O, Tanner AC, Johansson I. Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *J Dent Res*. 2011;90(10):1183-8.
15. Ubeja RG, Bhat C. Mode of Delivery and Its Influence on the Acquisition of *Streptococcus* mutans in Infants. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2016;9(4):326-9.
16. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(26):11971-5.
17. Pattanaporn K, Saraithong P, Khongkhunthian S, Aleksejuniene J, Laohapensang P, Chhun N, et al. Mode of delivery, mutans streptococci colonization, and early childhood caries in three- to five-year-old Thai children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2013;41(3):212-23.
18. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol*. 2017.
19. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog*. 2010;6(1):e1000713.

20. Dupuy AK, David MS, Li L, Heider TN, Peterson JD, Montano EA, et al. Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One*. 2014;9(3):e90899.
21. Monteiro-da-Silva F, Araujo R, Sampaio-Maia B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *Med Mycol*. 2014;52(5):498-505.
22. Gouvêa-Mondin MEB, Hofling JF. Colonização da cavidade bucal de crianças por *Candida* spp. - papel na etiologia da cárie dentária. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde*. 2005;23:315-25.
23. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *J Appl Microbiol*. 2017;122(2):321-30.
24. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, Jr., et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infect Immun*. 2016;84(10):2724-39.
25. Saunus JM, Kazoullis A, Farah CS. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections. *Front Biosci*. 2008;13:5345-58.
26. Simões RJ, Fonseca P, Figueiral MH. Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. *Odontologia Clínico-Científica*. 2013;12:19-22.
27. Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res*. 2016;95(4):365-71.
28. Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008;322(5907):1562-5.
29. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007;5(7):e177.
30. Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999;28(1):19-25.
31. Fujiwara N, Tsuruda K, Iwamoto Y, Kato F, Odaki T, Yamane N, et al. Significant increase of oral bacteria in the early pregnancy period in Japanese women. *J Investig Clin Dent*. 2017;8(1).
32. Rio R, Simoes-Silva L, Garro S, Silva MJ, Azevedo A, Sampaio-Maia B. Oral yeast colonization throughout pregnancy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(2):e144-e8.
33. Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD. The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeed Med*. 2009;4(2):57-61.
34. Gonias S, Tuepker M, Heisel T, Autran C, Bode L, Gale CA. Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells. *J Nutr*. 2015;145(9):1992-8.
35. Farronato G, Giannini L, Galbiati G, Cannalire P, Martinelli G, Tubertini I, et al. Oral tissues and orthodontic treatment: common side effects. *Minerva Stomatol*. 2013;62(11-12):431-46.
36. Hibino K, Wong RW, Hagg U, Samaranayake LP. The effects of orthodontic appliances on *Candida* in the human mouth. *Int J Paediatr Dent*. 2009;19(5):301-8.
37. Darwazeh AM, Hammad MM, Al-Jamaei AA. The relationship between oral hygiene and oral colonization with *Candida* species in healthy adult subjects*. *Int J Dent Hyg*. 2010;8(2):128-33.
38. Diaz-Arnold AM, Marek CA. The impact of saliva on patient care: A literature review. *J Prosthet Dent*. 2002;88(3):337-43.
39. Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M, et al. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(2):149-54.

40. Murakami M, Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Nagaoka E. Dry mouth and denture plaque microflora in complete denture and palatal obturator prosthesis wearers. *Gerodontology*. 2015;32(3):188-94.
41. Almstah IA, Wikstrom M, Stenberg I, Jakobsson A, Fagerberg-Mohlin B. Oral microbiota associated with hyposalivation of different origins. *Oral Microbiol Immunol*. 2003;18(1):1-8.

ANEXOS

ANEXO 1

Explicação do estudo

Explicação do estudo

“Influência do tipo de parto e tipo de aleitamento materno na colonização oral por leveduras nos estudantes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto”

1.1 Tipo e caracterização do estudo

Estudo transversal

1.2 Objetivo

Com este estudo pretende-se avaliar a prevalência de indivíduos jovens saudáveis colonizados oralmente por leveduras. Adicionalmente pretende-se tentar compreender se existe uma associação entre o tipo de parto e o tipo de aleitamento materno e a presença de leveduras na cavidade oral.

1.3 Materiais e Métodos

A cada participante será recolhida saliva não estimulada para um recipiente graduado durante 5 minutos. Seguidamente proceder-se-á à determinação do fluxo salivar, do pH da saliva e da concentração salivar de *Candida*. Adicionalmente, será realizado um inquérito anónimo para a obtenção de dados demográficos, história clínica, hábitos de higiene, hábitos alimentares, alcoólicos e tabágicos, assim como o tipo de parto e a história de amamentação do estudante.

1.4 Resultados esperados

O presente estudo espera determinar a prevalência de indivíduos colonizados oralmente por leveduras orais numa população jovem saudável e perceber se existe uma associação com o tipo de parto e o tipo de aleitamento materno.

1.5 Risco/Desconforto

Não é apresentado qualquer risco ou desconforto para os participantes excepto o inerente à colheita de saliva e a resposta a um questionário.

1.6 Parecer Ético

Para a execução deste projeto de investigação foi solicitado o parecer à Comissão de Ética da FMDUP acerca da exequibilidade do mesmo. Durante a sua realização, serão consideradas todas as regras bioéticas descritas na legislação em vigor, nomeadamente quanto ao tratamento e armazenamento de dados onde será garantida a confidencialidade de toda a informação.

Declaro que recebi, li e compreendi a explicação do estudo.

O/A Participante

ANEXO 2

Consentimento Informado

Declaração de Consentimento Informado

Eu, _____ (nome completo), compreendi a explicação que me foi fornecida, por escrito e verbalmente, acerca da investigação com o título “Influência do tipo de parto e tipo de aleitamento materno na colonização oral por leveduras nos estudantes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (FMDUP)”, conduzida pela investigadora Paula Cristina da Silva Campos na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, para a qual é pedida a sua participação. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e para todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que, de acordo com as recomendações da Declaração de Helsínquia, a informação que me foi prestada versou os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de decidir livremente aceitar ou recusar a todo o tempo a sua participação no estudo. Sei que posso abandonar o estudo e que não terei que suportar qualquer penalização, nem qualquer despesa pela participação neste estudo.

Foi-me dado todo o tempo de que necessitei para refletir sobre esta proposta de participação.

Nestas circunstâncias, consinto participar neste projeto de investigação, tal como me foi apresentado pela investigadora responsável sabendo que a confidencialidade dos participantes e dos dados a eles referentes se encontra assegurada.

Mais autorizo que os dados deste estudo sejam utilizados para este e outros trabalhos científicos, desde que irreversivelmente anonimizados.

Data: __/__/__

Assinatura do participante:

A Investigadora:

Paula Campos: 918661732; paula.c21@hotmail.com; Box 63 da clínica FMDUP

A Orientadora:

Benedita Sampaio Maia: 917411727; bmaia@fmd.up.pt

A Co-Orientadora:

Maria de Lurdes Pereira: 933427613; mpereira@fmd.up.pt

ANEXO 3

Questionário

A preencher pelo participante

Código: _____ Sexo: _____ Ano de nascimento: _____ pH: _____

1. Saúde Geral

Patologias: _____

Que medicamentos toma? _____

Usa inaladores corticosteroides orais (p.e. bombas da asma)?

☐ Nunca ☐ Ocasionalmente ☐ Regularmente

Está imunodeprimido? ☐ Sim ☐ Não

Tem diabetes? ☐ Sim ☐ Não

Realiza voluntária ou involuntariamente regurgitação gástrica com frequência?

☐ Sim ☐ Não

Tem micoses nas unhas ou na pele? ☐ Sim ☐ Não

Usa algum método anticoncepcional hormonal? ☐ Sim ☐ Não

Se sim, qual o princípio ativo? _____

Quantas vezes realiza a higienização das mãos num dia?

☐ 1 vez ou menos ☐ 2 a 3 vezes ☐ 4 a 7 vezes ☐ 8 a 12 vezes
☐ 13 ou mais vezes

2. Saúde Oral

Já alguma vez teve manifestação de Herpes Oral? ☐ Sim ☐ Não

Com que frequência visita o seu Médico Dentista?

☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Anualmente ☐ Semestralmente
☐ Trimestralmente ☐ Mensalmente

Quantas escovagens dentárias realiza diariamente?

- ☐ Menos de 1x/dia ☐ 1x/dia ☐ 2x/dia ☐ 3x/dia ☐ 4x/dia
☐ Mais de 4x/dia

Qual o tempo médio de escovagem (em segundos)?

- ☐ 0 a 30 ☐ 31 a 60 ☐ 61 a 90 ☐ 91 a 120 ☐ 121 a 150
☐ > que 150

Na higiene oral diária escova o dorso da língua?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Na higiene oral diária escova as bochechas?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Na higiene oral diária escova a gengiva?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Na higiene oral diária escova o palato?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Utiliza escova elétrica? ☐ Sim ☐ Não

Com que regularidade muda a sua escova dentífrica?

- ☐ Quase nunca ☐ Anualmente ☐ Semestralmente
☐ Trimestralmente

Usa pasta dentífrica:

- ☐ Sem especificação ☐ Branqueadora
☐ Anti-tártaro ☐ Para dentes sensíveis ☐ Anti-cáries ☐ Outras

Usa fio ou fita dentária?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Usa raspador de língua?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Usa escovilhão?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Usa reforços de flúor?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente
☐ Diariamente

Usa colutório (elixires)?

- ☐ Nunca ☐ Anualmente ☐ Semestralmente ☐ Mensalmente
☐ Quinzenalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

O seu colutório tem clorhexidina?

- ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

Já realizou algum tratamento preventivo (selantes de fissura)?

- ☐ Sim ☐ Não
☐ Não sei

Usa ou já usou aparelho ortodôntico?

- ☐ Sim ☐ Não

Usa aparelho de contenção dentário?

- ☐ Sim ☐ Não

Usa goteira?

- ☐ Sim ☐ Não

Usa próteses dentárias?

- ☐ Sim ☐ Não

Tem gengivite?

- ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

Tem doença periodontal? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

Sofre de xerostomia (baixo fluxo salivar)? ☐ Sim ☐ Não ☐ Não sei

3. Hábitos

Sofre ou já sofreu de onicofagia (hábito de roer as unhas)? ☐ Sim ☐ Não

Tem o hábito de roer objetos? ☐ Sim ☐ Não

Tem o hábito de folhear livros recorrendo aos seus dedos molhados em saliva?
☐ Sim ☐ Não

Já realizou sexo oral a mulheres? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Vive ou convive frequentemente com pessoas com mais de 70 anos? ☐ Sim
☐ Não

Realiza respiração bucal? ☐ Sim ☐ Não

Usa ou já usou piercings na língua? ☐ Sim ☐ Não

Qual a frequência dos seus hábitos tabágicos? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ 1 a 5 cig./dia ☐ 6 a 10 cig./dia
☐ 11-20 cig./dia ☐ > 21 cig./dia

Quais os seus hábitos de ingestão de cerveja? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Quais os seus hábitos de ingestão de vinho? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Quais os seus hábitos de ingestão de bebidas brancas? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Quais os seus hábitos de ingestão de café? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ 1 a 2x/semana ☐ 3 a 5x/semana ☐ 1 a 2x/dia
☐ + 2x/dia

Com que frequência utiliza drogas leves (cannabis, haxixe)? ☐ Nunca
☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Com que frequência utiliza ácidos/LSD? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Com que frequência utiliza drogas duras (cocaína, heroína)? ☐ Nunca
☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Com que frequência consome pastilha elástica? ☐ Nunca ☐ Anualmente
☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ 1x/dia ☐ Várias x/dia

A sua pastilha elástica tem açúcar? ☐ Nunca ☐ Sempre ☐ Às vezes
☐ Não sei

A sua pastilha elástica tem xilitol? ☐ Nunca ☐ Sempre ☐ Às vezes
☐ Não sei

Ao longo do dia o que bebe mais frequentemente? ☐ Água ☐ Refrigerantes
☐ Bebidas alcoólicas ☐ Outros

4. Hábitos alimentares

Quantas refeições faz, em média, por dia (incluindo pequeno-almoço, lanche, etc.)? ____

Quantas peças de fruta come, em média, por dia? ____

Quanto doces ingere, em média, por dia (p.e. chocolates, bolos, sobremesas, etc.)? ____

Come regularmente comida picante? ☐ Sim ☐ Não

Qual a proveniência da água que consome regularmente? ☐ Engarrafada
☐ Companhia ☐ Mista

Ingere próbióticos (p.e. iogurtes, actimel, proactivia, etc)? ☐ Nunca
☐ Anualmente ☐ Mensalmente ☐ Semanalmente ☐ Diariamente

Adiciona açúcar a bebidas como leite, café ou chá? ☐ Sim ☐ Não

Qual o seu tipo de alimentação? ☐ Sem restrições ☐ Vegan
☐ OvolacteoVegetariano ☐ Sem ingestão de carne

5. Nascimento e tipo de aleitamento materno

Como nasceu? ☐ Parto normal ☐ Cesariana

Foi amamentado? ☐ Nunca ☐ < 1 mês ☐ 2 a 3 meses ☐ 4 a 6 meses
☐ 7 a 12 meses ☐ >12 meses

ANEXO 4

Ficha de recolha de dados

Ficha de recolha de dados

A preencher pela investigadora:

Código identificativo: _____

Data da colheita: _____

Volume da saliva total recolhida durante 5 min (em mL): _____

Fluxo (mL/min): _____ pH salivar: _____

CFU/mL (esquerda): _____ CFU/mL (direita) _____

Prevalência: _____

Cor das colónias:

- ☐ Leveduras verdes (*Candida albicans*)
- ☐ Leveduras azul metálico (*Candida glabrata*)
- ☐ Leveduras cor-de-rosa (*Candida krusei*)
- ☐ Leveduras de outras cores (*Candida spp.*)
- ☐ Fungos filamentosos
- ☐ *C. parapsilosis*
- ☐ *C. lusitanea*

Observações:

ANEXO 5

Resultados

Tabelas de frequências

Tabela VI – Distribuição da amostra segundo a idade e o sexo dos indivíduos (n=187)

Sexo			
	Masculino	Feminino	Total
n	36	151	187
Média	21,75	21,58	21,61
Mediana	21,00	21,00	21,00
Desvio padrão	1,962	1,838	1,858
Mínimo	20	19	19
Máximo	27	29	29

Tabela VII – Distribuição da amostra segundo o método de parto e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=187)

			Método de parto		
			Parto normal	Cesariana	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	73	46	119
		%	58,4%	74,2%	63,6%
	Com candida	Contagem	52	16	68
		%	41,6%	25,8%	36,4%
Total		Contagem	125	62	187
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela VIII – Média e desvio padrão da contagem de *Candida* para os diferentes métodos de parto

	Método de parto	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Log (contagem de <i>Candida</i>)	Parto normal	52	13,6822	38,01641	5,37633
	Cesariana	16	1,6924	,61528	,15382

Tabela IX – Distribuição da amostra segundo o tipo de aleitamento e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=185)

			Amamentação		
			Nunca	Sim	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	11	106	117
		%	73,3%	62,4%	63,2%
	Com candida	Contagem	4	64	68
		%	26,7%	37,6%	36,8%
Total		Contagem	15	170	185
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela X – Média e desvio padrão da contagem de *Candida* para a existência ou não de amamentação

	Amamentação	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão da Média
Log (contagem de <i>Candida</i>)	Nunca	4	2,0718	,57624	,28812
	Sim	64	11,3371	34,41352	4,37052

Tabela XI – Distribuição da amostra segundo a frequência de consultas no Médico Dentista e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=187)

		Frequência de consultas no Médico Dentista		Total
		Menos de uma vez por ano	Pelo menos uma vez por ano	
Prevalência fungos	Sem <i>Candida</i>	Contagem	17	102
		%	85,0%	61,1%
	Com <i>Candida</i>	Contagem	3	65
		%	15,0%	38,9%
Total		Contagem	20	167
		%	100,0%	100,0%

Tabela XII – Distribuição da amostra segundo o número de escovagens dentárias por dia e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

		Número de escovagens dentárias/dia		Total
		Menos de 2x/dia	Pelo menos 2x/dia	
Prevalência fungos	Sem <i>Candida</i>	Contagem	4	114
		%	66,7%	63,3%
	Com <i>Candida</i>	Contagem	2	66
		%	33,3%	36,7%
Total		Contagem	6	180
		%	100,0%	100,0%

Tabela XIII – Distribuição da amostra segundo a frequência de escovagem do dorso da língua e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Frequência de escovagem do dorso da língua		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem Candida	Contagem	54	65	119
		%	69,2%	60,2%	64,0%
	Com Candida	Contagem	24	43	67
		%	30,8%	39,8%	36,0%
Total		Contagem	78	108	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XIV – Distribuição da amostra segundo a frequência de escovagem das bochechas e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=187)

			Escovagem das bochechas		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem <i>Candida</i>	Contagem	106	13	119
		%	63,1%	68,4%	63,6%
	Com <i>Candida</i>	Contagem	62	6	68
		%	36,9%	31,6%	36,4%
Total		Contagem	168	19	187
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XV – Distribuição da amostra segundo a frequência de escovagem da gengiva e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=187)

			Escovagem da gengiva		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem <i>Candida</i>	Contagem	46	73	119
		%	64,8%	62,9%	63,6%
	Com <i>Candida</i>	Contagem	25	43	68
		%	35,2%	37,1%	36,4%
Total		Contagem	71	116	187
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XVI – Distribuição da amostra segundo a frequência de escovagem do palato e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=187)

			Escovagem do palato		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem Candida	Contagem	110	9	119
		%	65,1%	50,0%	63,6%
	Com Candida	Contagem	59	9	68
		%	34,9%	50,0%	36,4%
Total		Contagem	169	18	187
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XVII – Distribuição da amostra segundo a utilização de escova elétrica e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Utilização de escova elétrica		
			Não	Sim	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	105	13	118
		%	63,3%	65,0%	63,4%
	Com candida	Contagem	61	7	68
		%	36,7%	35,0%	36,6%
Total		Contagem	166	20	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XVIII – Distribuição da amostra segundo a frequência de uso do fio ou fita dentária e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de fio ou fita dentária		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem Candida	Contagem	88	30	118
		%	62,4%	66,7%	63,4%
	Com Candida	Contagem	53	15	68
		%	37,6%	33,3%	36,6%
Total		Contagem	141	45	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XIX – Distribuição da amostra segundo a frequência de uso do raspador de língua e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de raspador de língua		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem Candida	Contagem	109	9	118
		%	62,6%	75,0%	63,4%
	Com Candida	Contagem	65	3	68
		%	37,4%	25,0%	36,6%
Total		Contagem	174	12	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XX – Distribuição da amostra segundo o uso de escovilhão e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de escovilhão		
			Menos de 1x/dia	Pelo menos 1x/dia	Total
Prevalência fungos	Sem <i>Candida</i>	Contagem	108	10	118
		%	64,3%	55,6%	63,4%
	Com <i>Candida</i>	Contagem	60	8	68
		%	35,7%	44,4%	36,6%
Total		Contagem	168	18	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXI – Distribuição da amostra segundo o uso de aparelho ortodôntico e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de aparelho ortodôntico		
			Não	Sim	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	52	66	118
		%	71,2%	58,4%	63,4%
	Com candida	Contagem	21	47	68
		%	28,8%	41,6%	36,6%
Total		Contagem	73	113	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXII – Distribuição da amostra segundo o uso de contenção dentária e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de contenção dentária		
			Não	Sim	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	78	40	118
		%	65,0%	60,6%	63,4%
	Com candida	Contagem	42	26	68
		%	35,0%	39,4%	36,6%
Total		Contagem	120	66	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXIII - Distribuição da amostra segundo o uso de goteira e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de goteira		Total
			Não	Sim	
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	95	23	118
		%	64,6%	59,0%	63,4%
	Com candida	Contagem	52	16	68
		%	35,4%	41,0%	36,6%
Total		Contagem	147	39	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXIV – Distribuição da amostra segundo o uso de prótese dentária e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Uso de próteses dentárias		
			Não	Sim	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	116	2	118
		%	63,0%	100,0%	63,4%
	Com candida	Contagem	68	0	68
		%	37,0%	0,0%	36,6%
Total		Contagem	184	2	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXV – Distribuição da amostra segundo a presença de gengivite e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

				Gengivite			
				Não	Sim	Não sei	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	112	3	3	118	
		%	64,7%	50,0%	42,9%	63,4%	
	Com candida	Contagem	61	3	4	68	
		%	35,3%	50,0%	57,1%	36,6%	
Total		Contagem	173	6	7	186	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	

Tabela XXVI – Distribuição da amostra segundo a presença de doença periodontal e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Doença periodontal		
			Não	Não sei	Total
Prevalência fungos	Sem candida	Contagem	115	3	118
		%	63,5%	60,0%	63,4%
	Com candida	Contagem	66	2	68
		%	36,5%	40,0%	36,6%
Total		Contagem	181	5	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXVII – Distribuição da amostra segundo a presença de xerostomia e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Xerostomia			
			Não	Sim	Não sei	Total
Prevalência a fungos	Sem candida	Contagem	102	1	15	118
		%	67,1%	14,3%	55,6%	63,4%
	Com candida	Contagem	50	6	12	68
		%	32,9%	85,7%	44,4%	36,6%
Total		Contagem	152	7	27	186
		%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabela XXVIII - Distribuição da amostra segundo os hábitos tabágicos e a prevalência de fungos na cavidade oral (n=186)

			Hábitos tabágicos		Total
			Fumador ocasional	Fumador diário	
Prevalência fungos	Sem <i>Candida</i>	Contagem	109	9	118
		%	64,9%	50,0%	63,4%
	Com <i>Candida</i>	Contagem	59	9	68
		%	35,1%	50,0%	36,6%
Total	Contagem		168	18	186
	%		100,0%	100,0%	100,0%

ANEXO 6

Parecer da Comissão de Ética

Exmª Senhora

Estudante **Paula Cristina da Silva Campos**

000026
1 0 -01- 2017

Curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária da
Faculdade de Medicina Dentária da U. Porto

(CC à Orientadora Srª Prof. Doutora Maria Benedita de Almeida Garrett de Sampaio Maia Marques)

Assunto: - Análise do **Projeto de Investigação**, da Estudante Paula Cristina da Silva Campos, intitulado: "Influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno na colonização oral por leveduras nos estudantes da FMDUP", a realizar no âmbito da UC "Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica" do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Faculdade de Medicina Dentária da U. Porto, orientado pela Senhora Professora Doutora Maria Benedita de Almeida Garrett de Sampaio Maia Marques.

Informo V. Exa. que o projeto supra citado foi:

- **Aprovado**, na reunião da Comissão de Ética do dia 9 de janeiro de 2017.

Com os melhores cumprimentos,
O Presidente da Comissão de Ética



António Felino
(Professor Catedrático)

ANEXO 7

Declaração da autoria do trabalho apresentado

DECLARAÇÃO

Monografia de Investigação / Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação / Relatório de Atividade Clínica, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

22/05/2017

Paula Cristina Silva Campos

A investigadora

ANEXO 8

Parecer do Orientador

PARECER

(Entrega do trabalho final de Monografia)

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo(a)
Estudante Paula Cristina da Silva Campos
com o título: Influência do tipo de parto e do tipo de aleitamento materno
na colonização oral por Leveduras nos estudantes da FMDUP,
está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido
e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

22/05/2017

O(A) Orientador(a)

Barbela Sérgio Nunes