



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

DAIANE PEREIRA CAMACHO

ADERÊNCIA *IN VITRO* DE ISOLADOS BUCAIS DE *Candida albicans* EM DIFERENTES MATERIAIS DENTÁRIOS

DAIANE PEREIRA CAMACHO

ADERÊNCIA *IN VITRO* DE ISOLADOS BUCAIS DE *Candida albicans* EM DIFERENTES MATERIAIS DENTÁRIOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C172a Camacho, Daiane Pereira.

Aderência *in vitro* de isolados bucais de *Candida albicans* em diferentes materiais dentários / Daiane Pereira Camacho. – Londrina, 2014.
149 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Tese (Dourado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* – Teses. 2. Virulência (Microbiologia) – Teses.
3. Candidíase – Teses. 4. Patologia bucal – Teses. 5. Prótese dentária fixada por implante – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579:582.28

DAIANE PEREIRA CAMACHO

**ADERÊNCIA *IN VITRO* DE ISOLADOS BUCAIS DE *Candida albicans*
EM DIFERENTES MATERIAIS DENTÁRIOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Cléverson de Oliveira e Silva
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Ricardo Sérgio Couto Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 15 de Agosto de 2014.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, situado no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, PR. Os recursos financeiros foram provenientes do CNPq, CAPES, Fundação Araucária e PROPPG/UEL

Dedico

*Ao meu marido **Giovani**, o meu maior amor, companheiro e amigo. Agradeço pela idéia inicial deste trabalho, pelos ensinamentos na área de odontologia e principalmente pelo apoio prestado no decorrer desta jornada.*

*Aos meus pais, **Elaine** e **Oswaldo**, meus exemplos de vida, que sempre me incentivaram e compreenderam tantos momentos em que estive ausente. Agradeço por sempre apontarem o melhor caminho e apoiarem minhas escolhas, além de serem exemplos de amor incondicional... A eles meu eterno amor e gratidão.*

*Às minhas irmãs **Suélem** e **Franciele**, companheiras em qualquer situação, nos momentos felizes e nos tristes, nas conquistas e nas derrotas, minhas melhores amigas...*

*À minha avó **Rosa** e avô **Edevanir**, pessoas fundamentais em minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que sempre esteve presente em minha vida, auxiliando e conduzindo os meus passos para o eterno aprendizado.

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pelo direcionamento e dedicação na orientação, pela amizade e carinho, pelo comprometimento com o ensino e com a pesquisa. Principalmente, agradeço por ter me recebido com tanta generosidade e confiança, mostrando-me a importância que tem cada indivíduo para o sucesso de um grupo. Guardarei sempre profunda admiração e gratidão pelo tempo de convivência e aprendizado.

À Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, pela co-orientação segura e sensata, paciência e dedicação sempre calma e precisa, ajudando-me a transpor os inúmeros obstáculos encontrados durante o desenvolvimento do trabalho, contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço pela amizade e confiança, pelo exemplo de dignidade e competência, grande responsável por esta conquista, sempre motivando e procurando ajudar. Mais que uma amiga, uma segunda Mãe.

À professora Dra. Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade pela colaboração na realização deste trabalho, por me receber em seu laboratório com muito carinho e atenção, por sua simpatia e ensinamento.

Aos Laboratórios de Genética e Biologia Molecular de Fungos, do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina e de Micologia Médica, do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá, pela estrutura fornecida para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos os docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos conhecimentos transmitidos.

À Universidade Estadual de Londrina.

A todos os colegas de laboratório com quem convivi durante estes anos, pela grande oportunidade de aprendizado que tive com cada um. Em especial agradeço à Emanuele Julio Galvão de França, Joyce Cristine Cardoso Boscariol, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça e Thelma Sley Pacheco Cellet pela amizade, apoio e auxílio no desenvolvimento das metodologias deste trabalho. E ainda à Alane Tatiana Pereira Moralez, Márcia Regina Terra, Helena Peggau de Goes, Daniel Fávero, Marcelo Tempesta Oliveira, Thalita Caroline Herek, Hugo Felix Perini e ao técnico Osvaldo Lopes dos Santos pelo companheirismo e bons momentos que compartilhamos no laboratório.

Aos amigos de turma de Doutorado em Microbiologia, principalmente ao Alexandre Tadachi Morey, Luís Eduardo Azevedo Marques Lescano e Martha Viviana Torres Cely, os quais eu nunca esquecerei.

Ao técnico Osvaldo Capello, por sua simpatia e presteza na obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura.

Aos meus familiares e amigos por todo carinho, compreensão e o imenso apoio. Em especial ao meu primo Giovani Salim Camacho pelos belíssimos desenhos que estão neste trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na realização de mais um sonho.

MUITO OBRIGADA!

“Tudo posso naquêle que
mê fortaleçê.”

Filipenses 4:13

CAMACHO, Daiane Pereira. **Aderência *in vitro* de isolados bucais de *Candida albicans* em diferentes materiais dentários.** 2014. 149f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

Atualmente, diferentes técnicas e materiais têm sido empregados para reabilitação bucal por meio de próteses dentárias ou implantes. A aderência inicial e a colonização por micro-organismos às superfícies rígidas como implante é um pré-requisito para a formação do biofilme que pode ocasionar infecções bucais. O papel da levedura *Candida albicans* na patogênese de lesão peri-implantar está associado a sua característica de micro-organismo oportunista. Sua transição de comensal para agente infeccioso depende tanto de fatores de virulência da levedura como da susceptibilidade do hospedeiro. Entretanto, os processos biológicos que podem levar à falha dos implantes após a confecção das próteses ainda são pouco compreendidos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a aderência *in vitro* de isolados bucais de *Candida albicans* em diferentes materiais dentários, diferenciação celular ao nível ultraestrutural, determinar a produção de biofilme e o padrão de expressão de genes *ALS*. Foram utilizados seis isolados clínicos e uma cepa padrão *Candida albicans* para a avaliação do perfil de aderência e a diferenciação celular dos isolados sobre a superfície de diferentes materiais dentários, produção de biofilme, bem como o padrão de expressão de genes da família *ALS*. Os isolados avaliados apresentam eficiência quanto à formação de biofilme. Todos os isolados apresentaram elevado potencial de aderência aos materiais confeccionados em resina composta microhíbrida com nanopartículas e liga metálica de Níquel-Cromo, enquanto que os menores valores de aderência foram observados nos materiais em porcelana feldspática e resinas acrílicas. Observou-se uma diversidade no padrão de aderência e diferenciação celular, entre os isolados, de forma isolado-dependente. Os isolados foram classificados conforme o perfil de adesão às superfícies dos materiais, seguindo quatro variações sendo estas: aderência difusa, localizada, agregativa e pseudo-hifal. As maiores taxas de aderência dos isolados bucais de *Candida albicans* foram relacionadas principalmente às superfícies hidrofóbicas. Foi observado um padrão complexo de expressão de genes da família *ALS* por isolados em modelo de aderência *in vitro* em diferentes materiais dentários. Considerando os isolados individualmente, os transcritos mais frequentes em células aderidas aos diferentes materiais avaliados foram dos genes *ALS1*, *ALS2*. A indução de determinados genes *ALS*, no nosso caso *ALS1* e *ALS4*, em função do material no qual o isolado estava aderido foi isolado-dependente; já a repressão de genes *ALS7* e *ALS9* parece ser dependente do material dentário, uma vez que em determinados tipos de materiais nenhum dos seis isolados analisados produziram transcritos relacionados as adesinas *Als7* e *Als9*. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam o potencial de aderência e consequente formação de biofilme por *Candida albicans* de origem bucal. Entretanto a variação no padrão de expressão dos genes *ALS* nos diferentes materiais testados ocorreu de forma isolado-dependente. Desta forma, nossos dados podem contribuir para o entendimento do processo da peri-implantite, corroborando com seu caráter multifatorial, sugerindo que este processo é dependente do material dentário utilizado nos implantes, bem como da capacidade do micro-organismo em desenvolver a infecção, via expressão diferenciada de genes associados a patogênese.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Virulência. Candidíase oral. Prótese sobre implantes.

CAMACHO, Daiane Pereira. ***In vitro* adherence of oral isolates of *Candida albicans* in different dental materials.** 2014. 149p. Thesis (Doctorate Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

Currently, different techniques and materials have been used for oral rehabilitation by means of dental prostheses or implants. The initial adhesion and colonization by microorganisms to surfaces as rigid implant is a prerequisite for the formation of biofilms that can cause oral infections. The role of the yeast *Candida albicans* in the pathogenesis of peri-implant lesions is associated with its characteristic of opportunistic microorganism. His transition from dinner to infectious agent depends on both the yeast virulence factors such as host susceptibility. However, the biological processes that can lead to failure of the implants after the making of dentures are still poorly understood. In this context, the present study aims to evaluate the *in vitro* adherence of oral isolates of *Candida albicans* in different dental materials, cell differentiation at the ultrastructural level, determine the biofilm production and the pattern of expression of *ALS* genes. Six clinical isolates and strains *Candida albicans* a standard for evaluating the profile of adhesion and cellular differentiation on the surface of isolates of different dental materials, biofilm production were used as well as the pattern of expression of the *ALS* gene family. The isolates exhibit efficiency for the formation of biofilm. All isolates showed high potential for adhesion to materials made of composite resin microhibridra with nanoparticles and metal alloy Nickel-Chrome, while the lowest values were observed in grip materials feldspathic porcelain and acrylic resins. There was a diversity in the pattern of cell adhesion and differentiation among the isolates of isolated dependent manner. The isolates were classified according to the profile of adhesion to the surfaces of materials, and these following four variations: diffuse adherence, localized, aggregative and pseudohyphal. The highest rates of adherence of oral isolates of *Candida albicans* were primarily related to hydrophobic surfaces. A complex pattern of expression of the *ALS* gene isolated from a family of adhesion *in vitro* model for different dental materials was observed. Considering the isolated individual, the most frequent transcripts in cells adhered to different materials evaluated were of *ALS1*, *ALS2* genes. The induction of certain genes *ALS*, *ALS1* and *ALS4* in our case, depending on the material which was isolated was isolated-dependent adhered; since the repression of genes *ALS7* and *ALS9* appears to be dependent on the dental material, since in certain types of materials none of the six strains tested produced transcripts related to Als7 and Als9 adhesins. The results of this study confirm the potential of adhesion and subsequent biofilm formation by *Candida albicans* oral origin. However, the variation in the expression pattern of different genes in *ALS* was tested materials insulators dependent manner. This were, our data may contribute to the understanding of the peri-implant process, corroborating its multifactorial character, suggesting that this process is dependent on the material used in dental implants as well as the ability of the microorganism to develop the infection, via differential expression of genes associated with pathogenesis.

Keywords: *Candida albicans*. Virulence. Oral candidiasis. Implant prosthesis.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** - Materiais utilizados e respectivas características 75
- Tabela 2** - Padrão de aderência de seis isolados bucais de *Candida albicans* sobre materiais usados na implantodontia..... 76

ARTIGO 2

- Tabela 1** - Oligonucleotídeos que foram empregados nas análises da expressão dos genes *ALS* de *Candida albicans* 112
- Tabela 2** - Porcentagem da expressão dos genes *ALS* por isolados de *Candida albicans*..... 113
- Tabela 3** - Porcentagem da expressão dos genes *ALS* por isolados de *Candida albicans* e entre os diferentes materiais testados 114
- Tabela 4** - Padrão da expressão dos genes *ALS7* e *ALS9* em células aderidas e células planctônicas, por isolados de *Candida albicans*..... 115

ARTIGO 3

- Table 1** - Screening with twenty clinical isolates of *Candida albicans* obtained from elderly users of prosthesis plus a *Candida albicans* ATCC 90028 strain using some virulence factors 141
- Table 2** - Clinical characteristics of the four volunteers users of dental users of dental prosthesis who selected yeasts were obtained 142
- Table 3** - Adherence of *Candida albicans*, from the oral cavity of healthy elderly, to Buccal Epithelial Cells related to the size and percentage of germ tube..... 143

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Demonstração esquemática de um implante instalado na região do segundo pré-molar superior direito já com uma prótese sobre o implante instalado sobre o mesmo, reabilitando completamente a região antes desdentada 23
- Figura 2** Demonstração esquemática dos corpos de prova utilizados no presente estudo como partes de materiais realmente possíveis de serem utilizados nas reabilitações com implantes osseointegráveis 25

ARTIGO 1

- Figura 1** - Desenho esquemático dos corpos de prova confeccionados em seis tipos de materiais. Área total de 129,32 mm² 77
- Figura 2** - Padrão de aderência em materiais. A: Aderência *difusa*, B: Aderência *localizada*, C: Aderência *agregativa*, D: Aderência *pseudo-hifal*. Aumento 2.400X..... 78
- Figura 3** - Número de leveduras aderidas, expresso em UFC mm⁻², nos materiais testados em ensaios de aderência *in vitro* de seis isolados clínicos e uma cepa padrão *Candida albicans* ATCC 90028, após 3 horas de incubação. *As diferenças são estatisticamente significativas (p<0,001) comparando a aderência entre os diferentes isolados sobre cada material. ^ΔDiferença significativa entre os isolados sobre resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (p<0,05) 79
- Figura 4** - Padrão de aderência dos isolados de *Candida albicans* sobre a resina composta microhíbrida com nanopartículas (RC), após 12 horas de incubação. Aderência agregativa: *Candida albicans* ATCC 90028 (5 μm) (A), podendo ser observado ligação entre as leveduras (2 μm) (B), (seta); Aderência difusa: isolados CA12 (C), CA07 (D) e CAE (E); Aderência agregativa: isolados CAD (F); Aderência pseudo-hifal: isolados CA04 (G) e CAJ (H). Observa-se presença de matriz extracelular de aspecto granular recobrando as células. As barras representam 10 μm. 80

- Figura 5** - Padrão de aderência dos isolados de *Candida albicans* sobre a liga metálica de Níquel-Cromo (Ni-Cr), após 12 horas de incubação. Aderência difusa: isolados CA12 (A), CA07 (B), CAD (C) e *Candida albicans* ATCC 90028 (D); Aderência agregativa: isolado CAE (E), observando-se leveduras intimamente ligadas em aumento 24.000X (F), (seta); Aderência pseudo-hifal: isolados CA04 (G) e CAJ (H). As barras representam 10 µm 81
- Figura 6** - Média dos valores do ângulo de contato com a água (a), rugosidade superficial (b) para PF (porcelana feldspática), RAAQ (resina acrílica ativada quimicamente), RAAQv (resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo), RAAT (resina acrílica ativada termicamente), RC (resina composta microhíbrida com nanopartículas) e Ni-Cr (Liga metálica de Níquel-Cromo). Erro padrão das médias de dez medições são apresentados em barras. * $P < 0,001$, em comparação entre os materiais testados utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. **Diferença significativa entre PT e Ni-Cr ($p < 0,01$); Δ diferença significativa entre RAAQ e RAAQv; RAAQ e RAAT nos dois testes ($p < 0,05$) 82
- Figura 7** - Imagens de topografia tridimensional obtidas por Microscopia de Força Atômica dos materiais confeccionados em porcelana feldspática (A); resina acrílica ativada quimicamente (B); resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (C); resina acrílica ativada termicamente (D); liga metálica de Níquel-Cromo (E). Área de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 83
- Figura 8** - Análise ultraestrutural dos materiais sem aderência. A: não houve aderência do isolado CAE sobre superfície de porcelana feldspática (PF); B: não houve aderência do isolado CAD sobre superfície da resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (RAAQv) 84

ARTIGO 2

- Figura 1** - Desenho esquemático dos corpos de prova confeccionados em seis tipos de materiais 116
- Figura 2** Formação de biofilme sobre superfície de poliestireno por isolados de *Candida albicans* obtido através da leitura em absorvância a 405 nm em

- leitora de microplaca, após 24 horas de incubação. As barras representam o erro padrão. *Diferença estatisticamente significativa entre os isolados ($p < 0,001$). 117
- Figura 3** - Número de células aderidas, expressos em UFC/mm², nos materiais testados por ensaios de aderência *in vitro* dos seis isolados de *Candida albicans*, após 3 horas de incubação. ^ΔDiferenças significativas ($p < 0,001$) quando comparamos a aderência entre os isolados. *As diferenças são estatisticamente significativas entre os isolados sobre resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo ($p < 0,05$)..... 118
- Figura 4** - Análise ultraestrutural de células de *Candida albicans* aderidas nos diferentes materiais dentários após incubação por 12 horas. (A) Isolado CA04 aderido sobre porcelana feldspática, (B) isolado CA04 aderido sobre resina acrílica ativada quimicamente, (C) isolado CA04 aderido sobre resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo, (D) isolado CAD aderido sobre resina acrílica ativada termicamente, (E) isolado CAJ aderido sobre resina composta microhíbrida com nanopartículas e (F) isolado CAJ aderido sobre liga metálica de Níquel-Cromo. As barras representam 20 μ m 119
- Figura 5** - Análise ultraestrutural de isolados de *Candida albicans* aderidos sobre a resina composta microhíbrida com nanopartículas, após incubação de 12 horas. (A) isolado CA12, (B) isolado CA07, (C) isolado CAE, (D) isolado CAD, (E) isolado CA04 e (F) CAJ. Observa-se matriz extracelular granular (insertes). As barras representam 20 μ m 120
- Figura 6** - Variação no padrão de aderência e diferenciação celular dos isolados de *Candida albicans* sobre a liga metálica de Níquel-Cromo. Blastocónídeos dos isolados CA12 (A), CA07 (B), CAD (D); blastocónídeos aderidos em grupos e ligação entre as leveduras (seta), representado pelo isolado CAE (C) e formas filamentosas observadas nos isolados CA04 (E) e CAJ (F). As barras representam 20 μ m 121
- Figura 7** - Triagem de transcritos de *ALS1* (RTALS1F e RTALS1R) e *ALS4* (RTALS4F e RTALS4R) através da técnica RT-PCR. A presença de transcritos dos genes *ALS1* e *ALS4* são caracterizadas pela observação de uma banda de 318 pb e uma de 356 pb, respectivamente, tanto em células aderidas quanto em células planctônicas. (A) *ALS1*– presença da banda

em células aderidas do isolado CAJ (liga metálica de Níquel-Cromo) e ausência da banca em células planctônicas. (B) *ALS4* – presença da banda em células aderidas do isolado CA04 (resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo) e ausência da banca em células planctônicas. 1– Controle de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder; 2– 13 triagem de transcritos de *ALS1* dos isolados bucais de *Candida albicans* (CA12, CA07, CAE, CAD, CA04 e CAJ); 14–25 triagem de transcritos de *ALS4* dos mesmos isolados 122

ARTIGO 3

- Figure 1** - Flow-chart of the study 144
- Figure 2** - a) Clinical aspect of pseudomembranous candidiasis: presence of small yellow-whitish plates on the surface of the oral mucosal, with a plate bigger which can be removed, from confluent plates with an erythematous base. b) Clinical aspect of Oral Candidiasis due prosthesis use: presence of chronic erythema with edema of the mucosal in contact with the denture 145
- Figure 3** - Standard adherence of *Candida albicans* isolates (a: CA 07), (b: CA 11), (c: CA 26) and (d: CA 36) on Buccal Epithelial Cells, through optical microscopy, staining Papanicolaou (400X) 146
- Figure 4** - Number of colony-forming units of yeasts through *in vitro* adherence assay on thermally activated acrylic resin (TAAR) of four isolates of *Candida albicans*, after 6 hours of incubation. CA 07 and CA 11 (obtained from colonization) were significantly more effective in adhering than CA 26 and CA 36 obtained from lesions ($p < 0.001$). On the other hand, there was no statistical difference between the yeasts of the same group ($p > 0.05$) 147
- Figure 5** - Illustration of *Candida albicans* obtained from volunteers users of dental prosthesis regarding pattern of adherence on thermally activated acrylic resin (2.400X). Note the variation in the number of yeasts attached (a = CA 07), (b = CA 26) 148

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ALS	<i>Agglutinin-like sequence</i>
BEC	Buccal Epithelial Cells
CA	<i>Candida albicans</i>
CFU	Colony-forming units
CP	Corpo de prova
CO	Candidíase oral
CSH	Cell Surface Hydrophobicity
COPEP	Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
DM	Diabetes mellitus
DO	Densidade óptica
GT	Germ tube
HSC	Hidrofobicidade da Superfície Celular
Hwp1	<i>hyphal wall protein</i>
LEPAC	Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscópio de Força Atômica
Ni-Cr	Liga metálica de Níquel-Cromo
No.	Número médio
OC	Oral candidiasis
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
PF	Porcelana Feldspática
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
Ra	Rugosidade superficial
RAAQ	Resina acrílica ativada quimicamente
RAAQv	Resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo
RAAT	Resina acrílica ativada termicamente
RC	Resina composta microhíbrida com nanopartículas
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction

SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SSE	Solução Salina Estéril
SEM	Scanning Electron Microscope
TAAR	Thermally Activated Acrylic Resin
YNB	Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	REABILITAÇÃO COM IMPLANTE OSSEOINTEGRÁVEL	23
3.2	MATERIAIS DENTÁRIOS	25
3.2.1	CERÂMICAS	25
3.2.2	RESINA ACRÍLICA	26
3.2.3	RESINA COMPOSTA	27
3.2.4	LIGA METÁLICA.....	28
3.3	MUCOSITE PERI-IMPLANTAR E PERI-IMPLANTITE	29
3.4	CANDIDÍASE ORAL.....	31
3.5	<i>Candida albicans</i>	33
3.6	FATORES DE VIRULÊNCIA	34
3.6.1	ADERÊNCIA EM SUPERFÍCIE ABIÓTICA E BIOFILME	36
3.6.2	EXPRESSÃO GÊNICA: GENES DA FAMÍLIA <i>ALS</i>	38
	REFERÊNCIAS	42
	ARTIGOS	52
	ARTIGO 1 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ADERÊNCIA DE ISOLADOS BUCAIS DE <i>Candida albicans</i> SOBRE SUPERFÍCIES DE DIFERENTES MATERIAIS UTILIZADOS NA CONFEÇÃO DE PRÓTESES SOBRE IMPLANTES	53
	ARTIGO 2 ADERÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE <i>Candida albicans</i> EM DIFERENTES MATERIAIS DENTÁRIOS: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES <i>ALS</i>	85

ARTIGO 3 THE ROLE OF <i>Candida albicans</i> IN THE DEVELOPMENT OF ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS OF DENTAL PROSTHESIS	123
CONCLUSÕES	149

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do Século XX, vários autores propuseram diferentes técnicas e materiais para reabilitação bucal por meio de implantes dentários. Entretanto, foi em 1952 quando o fisiologista Per-Ingvar Brånemark descobriu casualmente a intimidade entre a superfície do titânio e os tecidos ósseos como processo de osseointegração, o que representa o primeiro passo da implantodontia moderna. Após os achados de Brånemark, muito se tem pesquisado, devido ao desenvolvimento de diversos sistemas de implantes osseointegrados e a sua comercialização cada vez maior.

Em 1979, Schnitman & Shulman fizeram as primeiras recomendações quanto aos critérios de avaliação dos implantes. Esses critérios sofreram modificações e, assim, foram estabelecidos os conceitos de sucesso e sobrevivência dos implantes. É importante salientar que o termo sobrevivência significa a permanência do implante instalado, enquanto que o conceito de sucesso considera a qualidade da função e a relação com o tecido ósseo de suporte sendo de grande valor para a avaliação dos implantes osseointegrados. Existem vários fatores de risco relacionados ao sucesso dos implantes osseointegráveis, entre eles, doenças sistêmicas, uso de medicação diária, abuso no consumo de substâncias nocivas à saúde, complicações nos tratamentos e técnicas cirúrgicas inadequadas. Entretanto, a manutenção da osseointegração depende, entre outros fatores, da preservação da saúde dos tecidos marginais, que pode ser afetada pela presença de biofilme microbiano aderido. O conceito de sucesso seria, portanto, uma definição mais ampla e de maior valor para a avaliação dos implantes osseointegrados (SMITH; ZARB, 1989; ALBREKTSSON; ZARB, 1993).

Muitos autores têm demonstrado que tanto a qualidade quanto a quantidade do biofilme aderido são importantes no sucesso, em longo prazo, dos implantes dentários. A aderência inicial e a colonização por micro-organismos às superfícies rígidas como material

restaurador ou implante é um pré-requisito para a formação do biofilme, que pode, eventualmente, ocasionar infecções bucais como mucosite peri-implantar ou peri-implantite.

O papel da levedura *Candida albicans* na patogênese de lesão peri-implantar está associado a sua característica de micro-organismo oportunista. Sua transição de comensal para agente infeccioso depende tanto de fatores de virulência da levedura como da susceptibilidade do hospedeiro. Estudos recentes revelam que os implantes dentários podem ser considerados reservatórios potenciais desta espécie na cavidade bucal, que por sua vez leva a candidíase oral. *C. albicans* é a espécie predominante tanto na colonização quanto nos processos infecciosos bucais ou sistêmicos.

Um dos atributos de *C. albicans* diretamente relacionado com patogenicidade compreende a capacidade de aderência tanto em superfícies bióticas quanto abióticas. A família de genes *ALS* (*agglutinin-like sequence*) codificam glicoproteínas de superfície celular envolvidas no processo de adesão. Várias proteínas *ALS* apresentam função de adesinas numa variedade de condições e substratos. A colonização das mucosas garante a aproximação e o contato inicial entre a parede celular da levedura e superfície da célula do hospedeiro ou de superfícies não biológicas como a dos materiais das próteses. Alguns genes têm sido apontados como reguladores do processo de aderência, entre eles destacam-se os da família *ALS* que são diferencialmente regulados por diversas condições fisiológicas, tais como alterações no meio de cultivo, formato celular e estágio de desenvolvimento, merecendo ser avaliados.

Dada a relevância da candidíase oral em usuários de próteses e mesmo considerando que a aderência é um dos primeiros passos para a formação de biofilmes, o que coloca as próteses de materiais sintéticos entre os principais fatores de risco de infecções bucais causadas por *C. albicans*, pouco é conhecido sobre a interação entre leveduras bucais e

materiais odontológicos usados em próteses sobre implantes dentários, estudos que abordem este contexto assumem especial importância a fim de serem elucidados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aderência *in vitro* de isolados bucais de *Candida albicans* em diferentes materiais dentários e o padrão de expressão de genes *ALS*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de aderência *in vitro* e a diferenciação celular ao nível ultraestrutural dos isolados de *C. albicans* sobre superfícies de seis materiais utilizados na confecção de próteses sobre implantes;
- Avaliar as características dos materiais e possíveis interações com as leveduras;
- Avaliar o padrão de expressão de genes da família *ALS* em isolados de *C. albicans* pelo emprego da metodologia de RT-PCR;
- Avaliar o potencial de virulência dos isolados: formação de biofilme, hidrofobicidade de superfície celular, produção de tubo germinativo, capacidade de aderência em células epiteliais bucais e associar com a presença de Candidíase oral.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 REABILITAÇÃO COM IMPLANTE OSSEINTEGRÁVEL

A reabilitação com implante osseointegrável visa devolver conforto, segurança, comodidade e melhorar a estética através de uma reabilitação funcional de um, vários ou todos os dentes perdidos de uma arcada. Ela possui uma grande variedade de aplicações, podendo substituir as antigas próteses fixas suspensas, através dos implantes unitários, e as próteses removíveis de extremidades livres, através da instalação de implantes nas regiões mais posteriores da arcada.

A reabilitação proporcionada pela implantodontia é dividida em duas etapas na sua execução: uma fase cirúrgica, que é o preparo do rebordo ósseo, caso seja necessário, através da realização de enxertos, regularizações, etc., e a instalação do pino de implante propriamente dito. A segunda fase é a protética, que se caracteriza pela confecção da prótese sobre os implantes, figura 1.

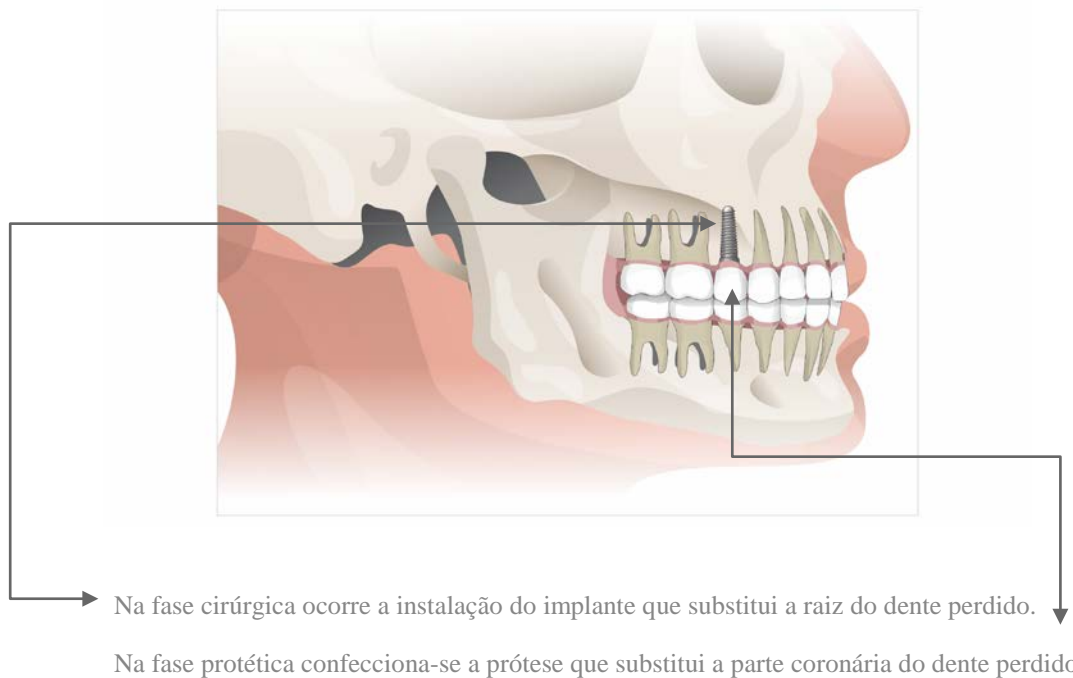


Figura 1 - Demonstração esquemática de um implante instalado na região do segundo pré-molar superior direito já com uma prótese sobre o implante instalada sobre o mesmo, reabilitando completamente a região antes desdentada.

A prática do uso de implantes osseointegrados revolucionou a reabilitação oral. Pacientes desdentados totais podem usufruir de próteses mais estáveis e pacientes com perdas parciais podem utilizar mecanismo menos invasivo em relação às próteses tradicionais, que necessitam de desgastes dos dentes adjacentes ao espaço edêntulo para promover a reabilitação.

Os benefícios imediatos são a melhora estética do sorriso, melhor capacidade mastigatória e funcional aliada a um aumento da auto-estima do paciente. Atualmente a implantodontia apresenta altos índices de previsibilidade e sucesso com técnicas modernas e atuais, além de constantes pesquisas e estudos de avaliação, que visam proporcionar cada vez mais segurança e tranquilidade ao paciente.

A atual preocupação da implantodontia está em favorecer o uso do implante recém instalado o mais rápido possível sem comprometer o procedimento cirúrgico realizado, assim como o processo de cicatrização (CORNELINI, 2005). Após a adequada cicatrização (em torno de 3 a 6 meses), o implante está apto a receber uma prótese definitiva.

Os implantes atuais são de titânio e substituem as raízes dentárias naturais perdidas e as próteses instaladas sobre os implantes podem ser provisórias ou definitivas, total ou parcial, unitária ou múltipla, parafusada ou cimentada e para a escolha são avaliadas questões como o volume ósseo disponível, a oclusão e a exigência estética do paciente (DAVARPANA, 2003). Independentemente do tipo de prótese sobre implante empregada, o material utilizado em sua confecção deve apresentar: estabilidade; insolubilidade; dureza, resiliência e resistência ao desgaste; apresentar sabor ou odor agradável; ser atóxico ou não irritante aos tecidos bucais; permitir adequado polimento para evitar fraturas. O material ideal deve reproduzir adequadamente as características dos dentes e dificultar a aderência de micro-organismos patogênicos que se acumulam na forma de biofilmes microbianos (ANUSAVICE, 1996).

3.2 MATERIAIS DENTÁRIOS

Os materiais mais utilizados para a confecção das próteses sobre implantes são: para próteses provisórias, resina acrílica e resina composta, e para as próteses definitivas, ligas metálicas (principalmente níquel-cromo), cerâmica (principalmente porcelana feldspática) e resina acrílica, figura 2.

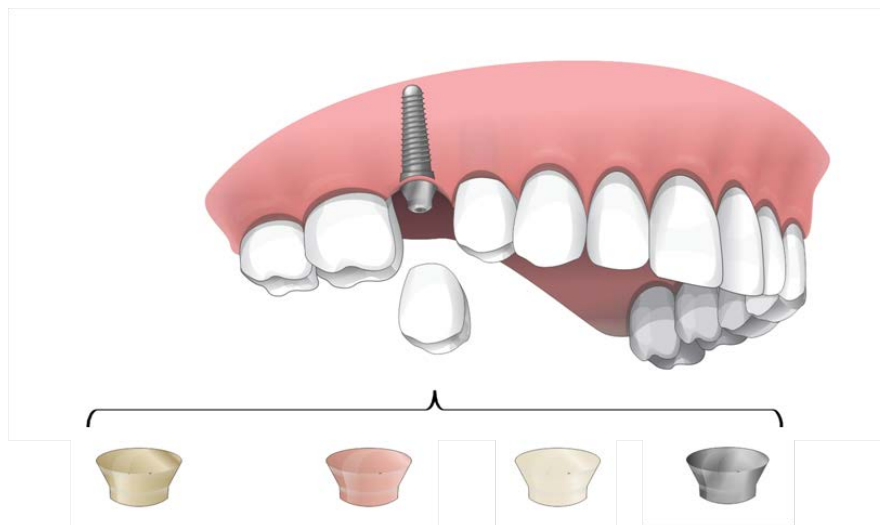


Figura 2 - Demonstração esquemática dos corpos de prova utilizados no presente estudo como partes de materiais realmente possíveis de serem utilizados nas reabilitações com implantes osseointegráveis.

3.2.1 CERÂMICAS

As cerâmicas odontológicas constituem o material que melhor reproduz as propriedades ópticas do esmalte e dentina, como fluorescência, opalescência e translucidez. Os vários componentes combinados resultam em duas fases principais: a fase vítrea, ou matriz de vidro e a fase cristalina, ou mineral. A fase vítrea é formada durante o processo de cocção e possui propriedades típicas de um vidro, como: friabilidade, padrão de fratura não direcional e alta tensão superficial no estado fluido. A fase cristalina inclui sílica ou quartzo e óxidos metálicos (pigmentos) (GOMES et al., 2008). A matriz vítrea é composta por uma cadeia

básica de óxido de silício (SiO_4), sendo que a proporção Si:O está relacionada com a viscosidade e expansão térmica da porcelana (HENRIQUES et al., 2008). Modificações do tipo e da quantidade de cristais melhoram as propriedades mecânicas e ópticas e ampliam seu uso (GOMES, 2008).

Porcelana é um tipo específico de cerâmica, composta basicamente por uma mistura de três minerais naturais: caolim, quartzo e feldspato, sendo um material friável que não suporta deformação plástica sob estresse. As principais vantagens são a alta resistência à compressão, biocompatibilidade, estabilidade química e propriedades estéticas favoráveis, além da condutibilidade térmica e do coeficiente de expansão térmica, que são similares ao da estrutura dentária (AKSOY et al., 2006; AL-WHADNI, 2006; GOMES, 2008).

As próteses metalo-cerâmicas representam a principal utilização da porcelana feldspática em peças unitárias ou múltiplas e também sobre implantes, porém a dificuldade com a translucidez e o acentuado desgaste dos dentes antagonista são algumas das desvantagens desse material (CRAIG, 2004; SÁ, 2008).

Para o acabamento final da porcelana feldspática, é necessária aplicação de uma camada de glaze sobre a superfície, com a finalidade de remover possíveis irregularidades e aumento da lisura superficial, aumento da resistência mecânica, redução da aderência de biofilme microbiano, aumento do molhamento, redução da tensão superficial e redução do desgaste dos dentes antagonistas (AKSOY et al., 2006; AL-WHADNI, 2006).

3.2.2 RESINA ACRÍLICA

As resinas acrílicas são compostos orgânicos classificados como polímeros, fornecidas como um sistema pó/líquido. Para sua manipulação a proporção indicada é três partes de pó para uma parte de líquido. Sua polimerização pode acontecer através, de reações

químicas (a temperatura atmosférica ou à vácuo), por adição térmica ou por adição de luz, e dessa forma classifica-se em: resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ), resina acrílica ativada termicamente (RAAT) e resina acrílica fotoativada. A capacidade de sorção e solubilidade são duas das principais propriedades das resinas acrílicas e estão relacionadas às propriedades polares dos polímeros e à presença física de espaços. A redução da rugosidade, através do acabamento e polimento é fundamental, pois superfícies rugosas promovem nichos, onde micro-organismos são protegidos das forças mastigatórias e dos procedimentos de higiene bucal. Apesar de suas qualidades, as resinas ainda mostram-se um material com resistência questionável, devido principalmente ao grande número de fraturas dos artefatos confeccionados com esse material, sendo que essas fraturas podem ser evitadas, conhecendo bem o material, suas indicações e limitações, respeitando todas suas necessidades de manipulação e pela utilização de princípios protéticos adequados, durante a confecção das próteses (CAMACHO et al., 2014).

3.2.3 RESINA COMPOSTA

A resina composta é um material altamente estético, formada por matriz orgânica, matriz inorgânica, agente de união e inibidores/ativadores de polimerização. Por apresentar uma fase orgânica e outra inorgânica, pode também ser denominado compósito (CONCEIÇÃO, 2007). A matriz orgânica é a porção quimicamente ativa que apresenta componentes com diferentes pesos moleculares (BIS-GMA, BIS-EMA, UDMA), responsáveis pelas características propriamente ditas de uma resina. São monômeros que estabelecem ligações cruzadas durante a reação de polimerização, conferindo resistência ao material (BARATIERI, 2001; BUSATO, 2002; MONDELLI, 2003). Já a matriz inorgânica é composta por partículas de cargas, geralmente quartzo, sílica coloidal ou vidro de fluorsilicato de alumínio que contribuem para as propriedades mecânicas da resina composta. Outros

componentes não tóxicos como zircônio, estrôncio e fluoreto de cálcio podem ser incorporados para favorecer a radiopacidade do material (BARATIERI, 2001; BUSATO, 2002; MONDELLI, 2003). Para que haja união entre a matriz orgânica e a inorgânica utiliza-se um agente adesivo estável, geralmente o 3-metacriloxipropiltrimetoxi silano. Ele forma uma interface adesiva que favorece a dissipação das tensões e mantém as propriedades físicas e mecânicas da resina, evitando deslocamento das partículas pela superfície ou ainda penetração de água no interior da matriz (CONCEIÇÃO, 2007).

Para finalizar a estrutura do material, é necessário que agentes desencadeadores da reação de polimerização estejam presentes, para isso são introduzidos os iniciadores excipientes (geralmente o monometiléter-hidroquinona) que impedem que o BIS-GMA polimerize de forma espontânea e também favorece o tempo de trabalho (CONCEIÇÃO, 2007). A reação de polimerização só será ativada pela presença de luz halógena ou LED com comprimento de onda em torno de 400 a 500 nanômetros. A partir daí, a ativação do iniciador desencadeia a quebra dos monômeros. Radicais livres possibilitam a formação de ligações cruzadas entre eles formando os polímeros (RODRIGUES NETO, 2007).

A diversidade de resinas disponíveis no mercado é vasta e o seu tipo está intimamente relacionado com a correta indicação do material. São classificadas segundo o tamanho de partículas inorgânicas, quanto ao escoamento e quanto à forma de polimerização (BUSATO, 2002).

3.2.4 LIGA METÁLICA

Liga metálica é uma mistura de dois ou mais metais ou não metais diferentes que visam modificar propriedades originais inerentes a cada elemento. Os metais mais utilizados são: ouro, prata, paládio, platina, níquel, cromo, cobalto, molibdênio, berílio e titânio

(BOTTINO, 1999). Elas podem ser homogêneas ou heterogêneas, monofásicas ou multifásicas, binárias ou terciárias. Na Odontologia, são utilizadas para fabricar infraestrutura de coroas, próteses parciais removíveis, restaurações e implantes (WATAHA, 2002).

Os requisitos desejáveis de uma liga são: facilidade de fundição e soldagem, resistência à corrosão e manchamento, baixa contração, mínima reatividade com o material de revestimento, alta resistência mecânica, à deflexão e ao desgaste, dureza, biocompatibilidade, fácil acabamento e polimento, baixo custo, módulo de elasticidade favorável e baixa condutibilidade térmica (ANUSAVICE, 1996). Há grande dificuldade para conciliar todos os requisitos, por isso é importante preparar a liga segundo as necessidades essenciais de cada material, levando em consideração qual é o seu papel na boca.

A principal liga utilizada em infraestrutura de coroas tradicionais ou sobre implantes é a de níquel-cromo, pois apresenta elevada dureza, baixa densidade, menor peso e alta resistência à tração, sendo superior ao ouro, mas com custo inferior. O níquel apresenta grande potencial alérgico principalmente em mulheres, mas com o acréscimo de 20% de cromo há perda de sua propriedade alergênica, tornando-se estável e resistente à corrosão no meio bucal. O cromo aumenta a temperatura de fusão favorecendo a sinterização da cerâmica de cobertura. A liga de níquel-cromo contém em torno de 60% a 80% de níquel, 16 a 27% de cromo e 4 a 10% de molibdênio formando óxidos estáveis na superfície como o Cr_2O_3 através do fenômeno de passivação. Essa reação impede que ocorra a corrosão (SOUSA, 2010).

3.3 MUCOSITE PERI-IMPLANTAR E PERI-IMPLANTITE

Existem diferentes fatores que interferem no processo da osseointegração e que interagem entre si, o que dificulta a determinação da real participação de cada um isoladamente. Além disso, o sucesso da osseointegração está diretamente relacionado aos

fatores sistêmicos e ao controle das condições clínicas pré-, trans- e pós-operatórias. Uma vez osseointegrado, o sucesso do tratamento com implantes e consequente manutenção da osseointegração depende, primordialmente, da saúde dos tecidos peri-implantares, que pode ser afetada pela presença e manutenção do biofilme, tornando-se indispensável uma adequada e rotineira higienização (MARTINS et al., 2011).

Com o desenvolvimento e uso dos implantes dentários, além dos benefícios clínicos dessa modalidade de tratamento, alguns problemas surgiram, dentre os quais destacam-se a presença do biofilme microbiano ao redor dos mesmos, fato este que pode levar à infecções ao redor dos tecidos peri-implantares, que são denominadas de peri-implantites. A falha de implantes pode ser produzida pela técnica cirúrgica incorreta, condição do osso, trauma oclusal ou infecções como as peri-implantites, que têm sido associadas com bactérias Gram negativas, bacilos entéricos, *Staphylococcus aureus* ou *Candida spp*, uma vez que estes micro-organismos podem levar à perda futura do implante (SLOTS, 1981; PIOVANO, 1999; LEONHARDT et al., 1999; MEISTER, 2005).

Zitzmann & Berglundh (2008), através do levantamento de estudos transversais e longitudinais com 50 indivíduos (ou mais) tratados com implantes e tempo de função de no mínimo 5 anos, concluíram que a peri-implantite foi diagnosticada em 56% dos indivíduos e em até 43% dos implantes. Mucosite peri-implantar ocorreu em aproximadamente 80% dos indivíduos, e em 50% dos implantes.

Mucosite peri-implantar é a inflamação restrita à fibromucosa ao redor do implante, que pode levar ao sangramento provocado ou espontâneo, desconforto na alimentação e higienização, mas que na maioria dos casos é reversível. Ocorrendo a remoção do biofilme microbiano, o equilíbrio é restabelecido. Já o termo peri-implantite é utilizado para descrever um processo inflamatório caracterizado por perda óssea ao redor de um

implante, ou seja, afeta o osso de suporte do implante com perda de volume ou altura, não havendo reversão do problema e podendo culminar com a perda do implante. Esta perda pode ser produzida por sobrecarga, infecções por bactérias ou ambas (LANG et al., 1997; RENVERT; PERSSON, 2009). Clinicamente, se apresenta com inflamação, hiperplasia gengival, sangramento e/ou supuração à sondagem, bolsa infra-óssea e mobilidade do implante (FERREIRA et al., 2010). Tanto a mucosite, como a peri-implantite, também são ocasionadas pela falta de higienização adequada (ZITZMANN; BERGLUNDH, 2008). O risco de desenvolver peri-implantite é determinado por diversos fatores como microbiota patogênica presente, padrão oclusal, resposta imune individual e qualidade e quantidade óssea ao redor do implante. Outros fatores tais como tabagismo, diabetes mellitus, preexistência de cárie, doença periodontal e padrão de higiene inadequado estão intimamente relacionados ao desenvolvimento da doença (MOMBELLI; LANG, 1998; BEHNEKE et al., 2000; ZAPAROLI et al., 2006; SANTAMARIA et al., 2010; FURRER et al., 2011).

Os implantes dentários podem ser considerados reservatórios potenciais de micro-organismos patogênicos na cavidade bucal, que podem dar origem a doenças como a candidíase oral devida a *Candida albicans* (BÜRGERS et al., 2010). Próteses de vários tipos e finalidades têm sido consideradas entre as principais causas da candidíase oral (TOTTI et al., 2004; TAGUTI et al., 2005; HARRIOTT et al., 2010). A aderência e colonização microbiana foram consideradas fatores chaves no insucesso dos implantes dentários (ROMEIRO et al., 2009). A peri-implantite não ocorre sem prévia aderência microbiana e subsequente colonização (GATEWOOD et al., 1993).

3.4 CANDIDÍASE ORAL

A Candidíase oral (CO) é umas das patologias bucais mais comuns e tem sido atribuída ao uso de próteses. CO é causada por leveduras do gênero *Candida* spp. que fazem

parte da microbiota normal da cavidade bucal, mas que pode ser importante agente infeccioso. *Candida albicans* é a espécie predominante tanto na colonização quanto nos processos infecciosos (ZAOUTIS et al., 2005; PAPPAS 2006; HOLLEY et al., 2009). *C. albicans* é uma levedura oportunista e sua transição de comensal para agente infeccioso depende tanto de fatores de virulência do micro-organismo como da susceptibilidade do hospedeiro (TOTTI et al., 2004).

A incidência de CO varia de acordo com a idade e vários fatores predisponentes como Diabetes mellitus (DM), Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), xerostomia, antibioticoterapia, prótese dentária, uso de drogas, dieta rica em carboidratos, tabagismo, Síndrome de Cushing, tumores malignos e imunossupressão (AKPAN ; MORGAN, 2002, SAMARANAYAKE et al., 2002; SOUSTRE, 2004; ARIAS et al., 2007). Autores têm sugerido que o uso da prótese dentária é fator predisponente para a CO por estar associada à irritação mecânica que pode causar trauma no palato (COELHO et al., 2000; COELHO et al, 2004; WILLIAN et al., 2013). Essa ruptura da barreira orgânica da mucosa facilita a maior interação entre as leveduras presentes em colonização e as células/tecidos do hospedeiro. Esse cenário, favorecido pela capacidade de invasão dessas leveduras é que resultam em processos infecciosos ou CO. Outro mecanismo importante é a má higienização bucal, pois o acúmulo de detritos alimentares serve como substrato nutricional estimulando o super crescimento de micro-organismos, atuando como um reservatório de agentes capazes de causar infecções (CUMMING et al., 1990; HOAD-REDDICK et al., 1990; PIETROKOVSKI et al., 1995).

Contudo, não está totalmente estabelecido o papel das leveduras neste processo patológico, a maioria dos autores atribui a CO unicamente à debilidade ou fatores do hospedeiro. Em adição, está muito bem descrito o potencial de virulência de *C. albicans* (CHANDRA et al., 2001; DOUGLAS, 2003; DAMBROSO et al., 2009; RAUT et al., 2010; FARIAS-PAIVA et al., 2010), porém não há estudos comprovando que *C. albicans* possuem

atributos de virulência que as tornam capazes de causar CO, independentemente de fatores ligados à debilidade do hospedeiro.

3.5 *Candida albicans*

Entre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* pertence ao reino Fungi, filo *Ascomycota*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Saccharomycetales* e família *Candidaceae* (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy). Fungos ubíquos na natureza, podem ser encontrados em solos, plantas, ambientes aquáticos e em animais. Das mais de 150 espécies, cerca de 20 já foram relatadas como agentes etiológicos de um amplo espectro de infecções em humanos (PFALLER et al., 2007, 2008; HA et al., 2011; NUCCI et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Candida albicans é um fungo dimórfico, que se apresenta sob formas leveduriformes (blastoconídios) no estado saprofítico, estando associado à colonização assintomática, ou como formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras), observadas em processos patogênicos ou induzidas em laboratório. Além disso, sob condições de crescimento subótimas, pode apresentar formação de clamidoconídeo (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Dessa forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, podendo ser considerado, a rigor, um organismo “polimórfico” (CHAFFIN et al., 1998; LACAZ et al., 1991). Essa levedura faz parte da microbiota oral e sua colonização é reconhecida como fator predisponente para infecções fúngicas invasivas (BAYRAM; BALCI, 2006).

O material genético diplóide está organizado em 8 cromossomos (1-7 e cromossomo R), e o genoma haplóide é constituído de 14.851 kb (kilobases), contendo 6.419 ORFs (open reading frame, sequências de leituras, ou seja, genes codificantes) com mais de 100 codons de tamanho e 224 introns, (JONES et al., 2004; BRAUN et al., 2005;

ODDS et al., 2007). Sistemas ou plataformas de microarray também já foram desenvolvidos para *C. albicans*, o que permite analisar a expressão gênica de todos os genes simultaneamente, nas diversas condições fisiológicas (CAO et al., 2005; <http://genome.wustl.edu/activity/ma/calbicans/>).

C. albicans é a levedura mais frequentemente isolada do organismo humano, tanto como micro-organismo comensal ou como patógeno oportunista. Esta levedura pode apresentar patogenicidade quando da presença de diversos fatores predisponentes (JORGE, 2007).

Fatores específicos que afetam a colonização bucal por *C. albicans* são a saliva, o pH, a aderência, a hidrofobicidade da superfície celular, a formação de hifas e a expressão de enzimas específicas (WEBB et al., 1998). Além disso, esta espécie é relativamente tolerante a imunidade inata celular (JÄRVENSIVU et al., 2004).

A aderência é considerada um fator de virulência extremamente importante de leveduras, pois a colonização e infecção dos tecidos bucais estão diretamente relacionadas à sua capacidade de aderência (BURFORD-MASON et al., 1988; CALDERONE; BRAUN, 1991).

3.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Embora o sistema imune do hospedeiro seja o principal fator responsável pelo equilíbrio entre a transição de comensalismo com a patogenicidade, vários atributos de virulência de *C. albicans*, como habilidade de transição morfológica (tubo germinativo), hidrofobicidade de superfície celular (HSC) ou superfícies abióticas, hidrolases, capacidade em aderir e formação de biofilme têm sido sugeridos como importantes fatores de virulência e podem contribuir para a persistência da colonização e do desenvolvimento de infecções oportunistas fúngicas.

Existem estudos que revelam que *C. albicans* na forma de hifas tem capacidade de escapar às células fagocíticas (BERMAN, 2006; SUDBERY et al., 2004). E ainda, a presença de tubo germinativo em *C. albicans* está associada com maior capacidade de invadir tecidos (GHANNOUM, 2000) e também de conferir à levedura maior aderência às superfícies de células (CONSOLARO et al., 2005) e superfície abióticas (KEMMELMEIER et al., 2011).

A habilidade de transição morfológica de *C. albicans* (a espécie mais importante do gênero *Candida* spp.) tem sido sugerida como importante fator de virulência. As hifas têm maior capacidade de aderir e penetrar nas células epiteliais humanas do que os blastoconídios (HAMER et al., 2000) Esta transição representa uma resposta do fungo as alterações nas condições ambientais e possibilita sua adaptação a diferentes nichos biológicos, consequentemente permitindo a disseminação fúngica nas células humanas (CHAFFIN et al., 1998).

A expressão da HSC por leveduras do gênero *Candida* spp. tem sido relacionada com virulência aumentada provavelmente por estimular fenômenos de aderência, germinação e resistência à fagocitose (HAZEN et al., 2001). Embora a presença de adesinas seja reconhecida como um dos mecanismos mais fortes envolvidas na capacidade de leveduras aderirem e formar biofilme, vários investigadores demonstraram que a hidrofobicidade tem papel importante na aderência (JABRA-RIZKI et al., 2001).

A aderência das leveduras as células epiteliais bucais é reconhecida como um passo essencial na colonização microbiana e um evento chave na iniciação do processo patogênico, uma vez que a colonização prévia é aceita como fator predisponente ao processo infeccioso (KAMAI et al., 2002). Os mecanismos de aderência destas leveduras aos tecidos humanos são variados e acontecem como resultado dos sistemas de reconhecimento celular *Candida* - hospedeiro, que são extremamente complexos e envolvem uma variedade de componentes ligantes- receptores (GRIMAUDO; NESBITT, 1997).

Existem evidências de que *C. albicans* pode produzir mais de uma estrutura adesiva, sendo que uma manoproteína está primariamente atribuída a esta função (DOUGLAS, 1985). A ligação de *C. albicans* a superfícies mucosas tem sido demonstrada como um importante passo no processo infeccioso, particularmente na cavidade oral e vaginal (JABRA-RIZKI et al., 2001). Consequência da capacidade de um micro-organismo aderir é a sua capacidade de formar biofilme, que ocorrem em resposta a uma variedade de condições, incluindo alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental (O'TOOLE et al., 2000).

3.6.1 ADERÊNCIA EM SUPERFÍCIE ABIÓTICA E BIOFILME

A adesão é evento fundamental no estabelecimento e desencadeamento do processo infeccioso. A colonização das mucosas garante a aproximação e o contato inicial entre a parede celular da levedura e superfície da célula do hospedeiro ou de superfícies não biológicas como a dos materiais das próteses (POLAQUINI et al., 2006).

Após a levedura aderir à superfície, outros micro-organismos podem interagir, promovendo a formação de uma comunidade microbiana plural, em que há uma dependência metabólica de grau variável entre seus constituintes, caracterizando assim a estrutura conhecida como biofilme (BARBIERE et al., 2007). Biofilme é uma comunidade microbiana que resulta da aderência do micro-organismo a uma superfície, multiplicação e organização das células, secreção de polissacarídeo extracelular, maturação do biofilme e colonização de outros locais (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008).

A aderência inicial e a colonização por micro-organismos às superfícies rígidas como material restaurador ou implante é um pré-requisito para a formação do biofilme, que pode, eventualmente, ocasionar infecções bucais como mucosite peri-implantar ou peri-implantite (GATEWOOD et al., 1993). Entre os atributos relacionados com o potencial

patogênico da *C. albicans*, bem como de outras leveduras do mesmo gênero, está a grande capacidade de adesão destes micro-organismos (CALDERONE; BRAUN, 1991; RAMAGE et al., 2005; TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUCK, 2008), podendo levar à formação de biofilme. A capacidade de formação do biofilme pode ser considerada um potente fator de virulência, podendo estar presente em todas as espécies de *Candida* (REX, 1996). Como os biofilmes geralmente são mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e às drogas antimicrobianas do que às células dispersas, eles representam um fator predisponente de infecção para muitos pacientes (BAILLIE; DOUGLAS, 1998; DONLAN, 2001).

O biofilme está relacionado com o metabolismo da levedura, quantidade de nutrientes para a replicação celular e a superfície de contato. Biofilmes podem se formar em inúmeras superfícies, como teflon, plásticos, látex e silicone (COSTERTON; LEWANDOWSKI, 1995; DONLAN, 2002).

A formação de biofilme em *C. albicans* vem sendo descrita como um processo gradual que se inicia com a aderência a um substrato, seja ao próprio tecido do hospedeiro ou ao dispositivo médico ou odontológico (BÜRGERS et al., 2010), resultando na formação de uma confluenta camada basal de células que se dividem e produzem hifas, com projeções tubulares direcionadas para a região superior do biofilme (SOLL, 2008). Estas células, durante o desenvolvimento do biofilme, produzem uma matriz extracelular estável de substâncias poliméricas (DOUGLAS, 2003; CHANDRA et al., 2001; SOLL, 2008). O estágio final do desenvolvimento do biofilme é a maturação, quando ocorre menor crescimento das leveduras e elevado crescimento das hifas, nesta fase ocorre o envolvimento do biofilme pela matriz extracelular. A estimulação da produção da matriz extracelular durante o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* ainda é de causa desconhecida, o que se sabe, no entanto, é que a composição da matriz inclui: carboidratos, proteínas, fósforo, glicose e hexosaminas (BAILLIE, DOUGLAS, 2000; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

Em resumo, os diferentes estágios que fazem parte do processo de desenvolvimento do biofilme incluem: estágio da aderência, célula-substrato e célula-célula; estágio de formação e desenvolvimento das hifas; e estágio de maturação, no qual ocorre a produção da matriz extracelular que vai envolver e proteger as células do biofilme. Nos estudos de Blankenship e Mitchell (2006) sobre *quorum-sensing* sugeriu-se um novo estágio no ciclo de vida do biofilme de *C. albicans*; o estágio da dispersão, no qual células filhas se desenvolvem como células não aderentes, podendo ser facilmente liberadas do biofilme.

A base molecular da formação e do desenvolvimento do biofilme destes fungos ainda não está completamente compreendida, porém, já está bem estabelecida que a interação da *C. albicans* com as células do hospedeiro ou superfícies inertes resulta em alterações na expressão de diferentes genes. Diferentes estudos têm descrito mudanças nos níveis de expressão gênica durante o desenvolvimento do biofilme (MARCHAIS et al., 2005, MURILLO et al., 2005). Estudos sobre a base genética da produção de biofilme têm se beneficiado significativamente com os avanços recentes observados na biologia molecular e genômica. Isto tem sido particularmente observado com *C. albicans*, cujo genoma já foi totalmente sequenciado (JONES et al., 2004; ODDS; BROWN; GOW, 2004; BRAUN et al., 2005; <http://candida.bri.nrc.ca>).

3.6.2 EXPRESSÃO GÊNICA: GENES DA FAMÍLIA *ALS*

C. albicans apresenta adesinas na parede celular que permitem a ligação a diferentes proteínas das células hospedeiras, como fibronectina, laminina, colágeno e fibrinogênio (CALDERONE; FONZI, 2001; DRANGINIS et al., 2007; GOZALBO et al., 1998; KLOTZ et al., 2001).

O envolvimento de alguns genes no processo de adesão, formação e desenvolvimento do biofilme parece estar bem estabelecido (RAMAGE et al., 2005; NOBILE; MITCHELL 2006). Dentre os vários grupos de genes implicados neste fenótipo, constatou-se que os da família *ALS* (*agglutinin-like sequence*) presentes em *C. albicans* e espécies relacionadas desempenham papel chave neste processo, por codificar proteínas com características de glicoproteínas de adesão à superfície da célula (HOYER; PAYNE; HECHT, 1998; HOYER et al., 1998). Já foi demonstrado que genes *ALS* têm expressão aumentada durante a formação do biofilme (CHANDRA et al., 2001; GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; GREEN et al., 2004; O'CONNOR et al., 2005). Assim como os genes da família *ALS* são descritos como os responsáveis pela adesão e consequente formação de biofilmes, a glicoproteína *hyphal wall protein 1* (Hwp1) expressa na superfície das hifas, promovendo a adesão de *C. albicans* às células epiteliais (WILLIAMS; LEWIS, 2011; WILLIAMS et al., 2011; HENRIQUES et al., 2006; ZHU; SUNDSTROM, 2002). Para *C. albicans*, a Als1p e Als5p são responsáveis pela adesão, nomeadamente às células epiteliais bucais humanas e à fibronectina (HENRIQUES et al., 2006).

O gene *ALS1* em *C. albicans* foi descrito pela primeira vez por Hoyer et al. (1995) e, desde então, pesquisadores vêm tentando entender sua relação com o restante da família *ALS* e explorando suas proteínas e funções. A família *ALS* presente em *C. albicans* inclui oito genes (*ALS1-ALS7* e *ALS9*) que codificam diversas glicoproteínas de superfície (HOYER et al., 2008). Cada gene da família *ALS* apresenta uma estrutura similar composta por três domínios: um domínio 5', na extremidade N, composto por 1299 a 1308pb, que apresenta 55-90% de similaridade entre os diferentes genes da família; um domínio central variável, organizado em *tandem repeats*, com *motifs* de 108pb que se repetem ao longo do domínio; e um domínio 3', extremidade C, que é relativamente variável em tamanho e sequência de nucleotídeos entre os genes da mesma família (HOYER; HECHT, 2001). Os genes da família

ALS estão localizados em três cromossomos distintos: *ALS1*, *ALS2*, *ALS4*, *ALS5* e *ALS9* estão localizados no cromossomo 6, *ALS6* e *ALS7* estão localizados no cromossomo 3, e *ALS3* no cromossomo R (HOYER et al., 1995; HOYER; PAYNE; HECHT, 1998; HOYER; HECHT, 2001).

O tamanho de um mesmo gene *ALS* frequentemente varia dentro de uma mesma espécie e entre alelos de uma mesma cepa devido a diferenças no número de cópias dos *motifs* de 108pb organizados em *tandem repeat*, presentes no domínio central de cada gene (HOYER; HECHT, 2001). É comum, por exemplo, uma mesma cepa apresentar padrões diferentes (duas bandas) para o gene *ALS1* devido à variabilidade do número de repetições dos *motifs* na região do domínio central em cada alelo (HOYER, 2001).

Os genes *ALS* exibem diversos níveis de variabilidade, incluindo espécie-específica e alelo-específica, diferenças de tamanho para um mesmo gene, diferenças na regulação gênica espécie-específica, ausência de um gene *ALS* particular em certos isolados, e regiões codificadoras adicionais em outros (HOYER; HECHT, 2001). Estudos moleculares sobre a expressão de genes de *ALS* demonstraram que os mesmos são regulados e expressos diferencialmente em função de processos fisiológicos celulares, tais como o estágio de crescimento e morfologia da célula, ou seja, predominantemente leveduriforme ou na forma de hifas e pseudo-hifas (HOYER et al., 1995; HOYER et al., 1998; HOYER; PAYNE; HECHT,1998). Constatou-se que destes genes, o *ALS1*, que codifica glicoproteínas de superfície celular, apresenta-se em alta expressão em células do biofilme de *C. albicans* (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2004). O gene *ALS3* também mostrou alta expressão, porém, aparentemente associado à produção de hifas de *C. albicans* (HOYER et al., 1998). Nailis et al. (2006) compararam a expressão gênica de *ALS1* e *ALS3* entre as células do biofilme de *C. albicans* formadas sobre superfície de silicone e as células em suspensão (planctônicas) e constataram um significativo aumento da expressão de *ALS1* nas células do biofilme,

e uma diminuição da expressão de *ALS3*. Por outro lado, em um estudo de Nobile et al. (2008) concluíram, após vários testes com mutantes *als1/als1 als3/als3*, que *ALS3* e *ALS1* são essenciais para a formação do biofilme *in vivo* e a redução na expressão dessas proteínas acarreta na formação de um biofilme frágil.

Em outros estudos, o papel do produto do gene *ALS1* na aderência das *C. albicans* às células humanas, Fu et al. (1998, 2002) constataram que o gene *ALS1* codifica uma proteína de superfície celular responsável pela aderência as células endoteliais e epiteliais, e o rompimento de ambas as cópias deste gene acarretou em redução de 35% na aderência às células endoteliais, e o aumento da expressão de *ALS1* elevou a aderência para 125%. Zhao et al. (2005) demonstraram que a redução na expressão da proteína *Als2* acarretou na redução da biomassa do biofilme, sugerindo que *Als2* contribui com os estágios mais avançados do desenvolvimento do biofilme e não com o estágio da aderência.

Num modelo experimental de infecção de cateter *in vivo*, *ALS1* e *ALS3* também apresentaram funções redundantes; e a alta expressão de outros genes da família – *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* e *ALS9* – foram capazes de substituir parcial ou completamente a ausência de *ALS1* e/ou *ALS3* facilitando o desenvolvimento do biofilme nesse tipo de modelo experimental, enquanto que *ALS2* e *ALS4* não foram capazes, e ainda, todos os genes *ALS* puderam ser substituídos por *ALS3* ou *ALS1* em modelos *in vivo* e *in vitro* (NOBILE et al., 2008).

Portanto, os genes da família *ALS* que têm sido apontados como reguladores do processo de aderência e são diferencialmente regulados por diversas condições fisiológicas, tais como alterações no meio de cultivo, formato celular e estágio de desenvolvimento, merecem ser avaliados a fim de contribuir para o melhor entendimento da capacidade do micro-organismo em desenvolver a infecção, bem como identificar quais são os genes *ALS* envolvidos no processo de aderência às superfícies abióticas.

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T; ZARB, GA. Current interpretations of the osseointegrated response: clinical significance. **Journal of Prosthodontics**, v. 6, n. 2, p. 95–105, 1993.
- AKPAN A, MORGAN R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal** 78: 455–459, 2002.
- AKSOY, G.; POLAT, H.; POLAT, M.; COSKUN, G. Effect of various treatment and glazing (coating) technique on the roughness and wettability of ceramic dental restorative surfaces. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.53, p.254–259, 2006.
- AL-WAHADNI, A. An in vitro investigation into the surface roughness of 2 glazed, unglazed and finished ceramic materials. **Quintessence International**, v. 37, n. 4, p. 311–317, 2006.
- ANUSAVICE, K. J. Phillips science of dental materials. **Philadelphia Saunders Company**, p. 237–271, 1996.
- ARIAS WINGETER M, GUILHERMETTI E, SHINOBU CS, TAKAKI I, SVIDZINSKI TIE Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p.272–276, 2007.
- BAILLIE. G. S.; DOUGLAS, L. J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p.1900-5190, 1998.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, n.3, p.397-403, 2000.
- BARATIERI, L. N. et.al. **Odontologia restauradora – Fundamentos e Possibilidades**, 1. ed, São Paulo, 2001.
- BARBIERI, D. S. V.; VICENTE V. A.; FRAIZ F. C.; LAVORANTI O. J.; SVIDZINSKI, T. I. E.; LAMEIRA R. P. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 624–631, 2007.
- BAYRAM, A.; BALCI, I. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. **BMC Infectious Diseases**, v.25, n.6, p.155, 2006.
- BEHNEKE, A.; BEHNEKE, N.; D'HOEDT, B. Treatment of peri-implantitis defects with autogenous bone grafts: six-month to 3-year results of a prospective study in 17 patients. **The International Journal Oral & Maxillofacial Implants**, v. 15, n. 1, p. 125–138, 2000.
- BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 595–601, 2006.
- BOTTINO, M. A.; GUIMARÃES, M. V. M.; COSTA, V.; SANTOS, D. R. Oxidação e

corrosão na união dos implantes osseointegrados com diferentes ligas metálicas. **Revista da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos**, v.2, n.1, 1999.

BUSATO, A. L. S.; HERNANDEZ, P. A. G.; MACEDO, R. P. **Dentística Restauradora Estética**. Editora Artes Médicas, São Paulo, 2002.

BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**. v.9, p.588–594, 2006.

BRAUN, B.R.; VAN HET HOOG, M.; D'ENFERT, C.; MARTCHENKO, M.; DUNGAN, J.; KUO, A.; et al. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. **PLoS Genetics**, v.1, p.36-57, 2005.

BURFORD-MASON, A. P.; WEBER, J. C.; WILLOUGHBY, J. M. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy subjects. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 26, p. 49–56, 1988.

BÜRGERS, R.; HAHNEL, S.; REICHERT, T. E.; ROSENTRITT, M.; BEHR, M.; GERLACH, T.; HANDEL, G.; GOSAU, M. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2307–2313, 2010.

CALDERONE, R. A.; BRAUN, P. C. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 1-20, 1991.

CAMACHO, D. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FURLANETO, M. C.; LOPES, M. B.; CORRÊA, G. O. Resinas acrílicas de uso odontológico à base de polimetilmetacrilato. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 6, n. 3, p.63–72, 2014.

CAO, Y.Y. et al. Microarray analysis of differential gene expression in *Candida albicans* biofilm exposed to farnesol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.584–589, 2005.

CHAFFIN, W. L.; LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J. P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, n.1, p.130-80, 1998.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; MCCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.5385–5394, 2001.

COELHO, C. M.; ZUCOLOTO, S.; LOPES, R. A. Denture-induced fibrous inflammatory hyperplasia: a retrospective study in a school of dentistry. **International Journal of Prosthodontics**, v. 13, n. 2, p. 148–151, 2000.

COELHO, C. M.; SOUSA, Y. T.; DARE, A. M. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 31, n. 2, p. 135–139, 2004.

CONCEIÇÃO, E. N. **Dentística: saúde e estética**. 2. ed. Editora Artmed, Porto Alegre,

2007.

CONSOLARO, M. E. L.; ALBERTONI, T. A.; SVIDZINSKI, A. E.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 501–507, 2005.

CORNELINI, R.; CANGINI, F.; COVANI, U.; WILSON, J. R, T. G. Immediate Restorations Implants placed in to fresh extraction sockets for single-tooth replacement: a prospective clinical study. **The international Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 25, n. 5, p. 438–447, 2005.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, ZBIGNIE. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v.49, p.711–714, 1995.

CRAIG, R. G. **Materiais Dentários Restauradores**, 11. ed. São Paulo: Editora Santos, 2004.

CUMMING, C. G.; WIGHT, C.; BLACKWELL, C. L.; WRAY, D. Denture stomatitis in the elderly. **Oral Microbiology Immunology**, v. 5, n. 8, p. 82–85, 1990.

DAMBROSO, D.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SVIDZINSKI, A. E.; DALALIO, M. M. O.; MOLITERNO, R. A. Radiotherapy effect on frequency of *Candida* spp. and on virulence of *C. albicans* isolated from the oral cavity of head and neck cancer patients. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 30, p. 25–32, 2009.

DAVARPANA, M.; MARTINEZ, H.; KEBIR, M.; TECUCIANU, J. F et.al. **Manual de Implantodontia Clínica**. Editora Artmed, São Paulo, 2003.

DRANGINIS, A. M.; RAUCEO, J. M.; CORONADO, J. E.; LIPKE, P. N. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 282–294, 2007.

DONLAN, R. M. Biofilm formations: a clinically relevant microbiological process. **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1387–1392, 2001.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**. v.8, n.9, p.881–890, 2002.

DOUGLAS, L. J. Adhesion of pathogenic *Candida* species to host surfaces. **Microbiological Sciences**, v.2, p.243–47, 1985.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends Microbiology**, v.11, p.30-36, 2003.

FARIAS-PAIVA, L. C.; PATUSSI, E. V.; DONATTI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to an intrauterine contraceptive device. **Microscopy Microanalysis**, v. 16, n. 5, p. 537–49, 2010.

FERREIRA, G. R.; FAVERANI, L. P.; GOMES, P. C. M.; ASSUNÇÃO, W. G.; GARCIA JÚNIOR, I. R. Complicações na reabilitação bucal com implantes osseointegráveis. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 31, n. 1, p. 51–55, 2010.

FU, Y.; et al. Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n.4, p.1783–1786, 1998.

FU, Y.; IBRAHIM, A. S.; SHEPPARD, D. C.; CHEN, Y. C.; FRENCH, S. W.; CUTLER, J. E.; FILLER, S. G.; EDWARDS J. R.. *Candida albicans Als1p*: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway. **Molecular Microbiology**, v.44, p.61–72, 2002.

FURRER, S. K.; ISHIKIRIAMA, B. L. C.; OLIVEIRA, T. M.; ALMEIDA, A. L. P. F.; AMADO, F. M.; SANTOS, C. F.; FIGUEIREDO, C. M. Peri-implantite: alternativas de tratamento. **Revista Implant News**, v.8, n.3, p. 297–304, 2011.

GATEWOOD, R. R.; COBB, C. M.; KILLOY, W. J. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. **Clinical Oral Implants Research**, v. 4, n. 2, p. 53–64, 1993.

GARCIA-SANCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G.; GHIGO, J.M.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryotic Cell**, v.3, p.536–545, 2004.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.1, p. 122–143, 2000.

GOMES, E. A.; ASSUNÇÃO, W. G.; ROCHA, E. P.; SANTOS, P. H. Cerâmicas odontológicas: o estado atual. **Cerâmica**, n. 54, n. 331, p. 319–325, 2008.

GREEN, C. B.; CHENG, G.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.; GHANNOUM, M. A.; HOYER, L. L. RT-PCR detection of *Candida albicans* *ALS* gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. **Microbiology**, v.150, p. 267–275, 2004.

GRIMAUDO, N.J.; NESBITT, W.E. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. **Oral Microbiology and Immunology**, v.12, p.168–173, 1997.

GOZALBO, D.; GIL-NAVARRO, I.; AZORIN, I.; RENAU-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, J. P.; GIL, M. L. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. **Infection and Immunity**, v.66, p. 2052–2059, 1998.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p.181–195, 2011.

HAMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. *Malaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ formation by *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v.38, p.355–62, 2000.

HARRIOTT, M. M.; LILLY, E. A. RODRIGUEZ, T. E.; FIDEL, JR P.L. NOVERR, M. C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, p.3635–3644, 2010.

HAZEN, K. C.; WU, J. G.; MASUOKA, J. Comparison of hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* **Infection and Immunity**, v.69, p.779–86, 2001.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 32, p. 217–226, 2006.

HENRIQUES, A. C. G; et al. Cerâmicas Odontológicas: aspectos atuais, propriedades e indicações. **Odontologia Clínica Científica**, v. 7, n. 4, p. 289–294, 2008.

HOAD-REDDICK, G.; GRANT, A. A.; GRIFFITS, C. S. Investigation into the cleanness of dentures in an elderly population. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 64, n. 1, p. 48–52, 1990.

HOLLEY, A.; DULHUNTY, J.; BLOT, S.; LIPMAN, J.; LOBO, S.; DANCER, C.; RELLO, J.; DIMOPOULOS, J. Temporal trends, risk factors and outcomes in *albicans* and non-*albicans* candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 554–557, 2009.

HOYER, L. L.; SCHERER, A. R.; SHATZMAN A. R.; LIVI, G. P. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. **Molecular Microbiology**, v.15, p.39–54, 1995.

HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; HECHT, J. E. The ALS2 and ALS4 genes of *Candida albicans* and localization of Als proteins to the fungal cell surface. **Journal Bacteriology**, v. 180, n. 20, p.5334–5343, 1998.

HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; BELL, M.; MYERS, A. M.; SCHERER, S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. **Current Genetics**, v.33, p.451–459, 1998.

HOYER, L. L. The ALS gene family of *Candida albicans*. **Trends Microbiology**, v.9, n.4, p.176-180, 2001.

HOYER, L. L.; HECHT, J. E. The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. **Yeast**, v.18, p.49–60, 2001.

HOYER, L. L.; GREEN, C. B.; OH, S. H.; ZHAO, H. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family - a sticky pursuit. **Medical Mycology**, v.46, p.1–15, 2008.

JABRA-RIZKI, M. A. et al. Cell surface hydrophobicity associated adherence of *Candida dubliniensis* to human bucal epithelial cells. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.18, p.17–22, 2001.

JÄRVENSIVU, A.; HIETANEN, J.; RAUTEMAA, R.; SORSA, T.; RICHARDSON, M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms *in vivo*. **Oral Diseases**, v.10, n. 2, p. 106–112, 2004.

JONES, T.; FEDERSPIEL, N. A.; CHIBANA, H.; DUNGAN, J.; KALMAN, S.; MAGEE, B. B.; NEWPORT, G.; THORSTENSON, Y. R.; AGABIAN, N.; MAGEE, P. T.; DAVIS, R. W.; SCHERER, S. The diploid genome sequences of *Candida albicans*. **PNAS**. v. 101, p.7329–7334, 2004.

JORGE, A. O. Human oral microbial ecology and dental caries periodontal diseases. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 7, n. 2, p. 180–98, 2007.

KAMAI, Y.; KUBOTA, M.; KAMAI, M.; HOSOKAWA, T.; FUKUOKA, T.; FILLER, S.G. Contribution of *Candida albicans* *ALS1* to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. **Infection and Immunity**, v.70, p.5256–5258, 2002.

KEMMELMEIER, E. G.; VIDIGAL, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Increased virulence of *Candida albicans* after antineoplastic chemotherapy **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 257–262, 2011.

KLOTZ, S. A.; PENDRAK, M. L.; HEIN, R. C. Antibodies to alpha5 beta1 and alpha(v)beta3 integrins react with *Candida albicans* alcohol dehydrogenase. **Microbiology**, 147, 3159–3164, 2001.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos actinomicetos de interesse médico**. Editora Sarvier, São Paulo. p.8, 1991.

LANG, N. P.; MOMBELLI, A.; TONETTI, M. S. Clinical trials on therapies for peri-implant infections. **Annals of Periodontology**, v. 2, n. 1, p. 343–56, 1997.

LEONHARDT, Ä.; RENVERT, S.; DAHLÉN, G. Microbial findings at failing implants. **Clinical Oral Implants Research**, v. 10, n. 5, p. 339–45, 1999.

MARCHAIS, V.; KEMPF, M.; LICZNAR, P.; LEFRANÇOIS, C.; BOUCHARA, J. P.; ROBERT, R.; COTTIN, J. DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to adherence to polystyrene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p.25–32, 2005.

MARTINS, V. Osseointegração: análise de fatores clínicos de sucesso e insucesso. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 32, n.1, p. 26–31, 2011.

MONDELLI, J. **Estética e Cosmética em clínica restauradora**, Quintessence, 2003.

MEISTER, L. M. B. *Candida* spp em sulco periimplantar e *in vivo* de *Candida albicans* através da interface implante – abutment. [Dissertação]. Taubaté: UNITAU; 2005.

MOMBELLI, A.; LANG, N. P. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. **Journal of Periodontology**, v. 17, n. 63–76, 1998.

MURILLO, L.A., et al. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v.4, p.1562–1573, 2005.

- NAILIS, H.; COENYE, T.; VAN NIEUWERBURGH, F.; DEFORCE, D.; NELIS, H. J. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, p. 25, 2006.
- NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 9, p.1382–1391, 2006.
- NOBILE, C.J.; et al. Complementary adhesion function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**, v.18, p.1017–1024, 2008.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? **Clinical Infectious Diseases**, v.33, p.1959–1967, 2001.
- NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.
- O'CONNOR, L.; et al. Quantification of *ALS1* gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the Light Cycler. **Molecular and Cellular Probes**, v.19, p.153–162, 2005.
- ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. **Genome Biology**, v.5, n.7, p. 230, 2004.
- ODDS, F.C.; et al. Molecular phylogenetics of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.6, p.1041–1052, 2007.
- O'TOOLE, G. A.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Revista de Microbiologia**, v. 54, p.49–79, 2000.
- PAPPAS, P. G, Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 485–506, 2006.
- PFALLER, M. A. Epidemiology of candidiasis. **Journal of Hospital Infection**, v.30, p.329–338, 1995.
- PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133–163, 2007.
- PIETROKOVSKI, J.; AZUELOS, J.; TAU, S.; MOSTAVOY, R. Oral findings in elderly nursing home residents in selected countries: oral hygiene conditions and plaque accumulation on denture surfaces. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 73, n. 2, p.136–41, 1995.
- PIOVANO, S. Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections. **Anaerobe**, v. 5, p. 221–227, 1999.
- POLAQUINI, S. R. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives Oral Biology**, v. 51, p. 482–490, 2006.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v.4, n.4, p.633–638, 2005.

RAUT, J.; RATHOD, V.; KARUPPAYIL, S. M. Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi** v. 51, n. 3, p. 131–136, 2010.

RENVERT, S.; PERSSON, G. R. Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 10 p. 9–14, 2009.

REX, J.H. Editorial response. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p.467–470, 1996.

RODRIGUES NETO, E.; ELOSSAIS, A. A.; CHAVEZ, O. F. M.; PEREIRA, N. R. S.; SILVA, P. G. Estudo comparativo de aparelhos fotopolimerizadores para determinar o grau de conversão de resinas compostas utilizando o espectrofotômetro de infravermelho, **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.55, n.4, p.357–361, 2007.

ROMEIRO, R. L, MAJEWSKI, M.; MOLINA, F.; JUNQUEIRA, J. C.; OLIVEIRA, L.; JORGE, A. O. C. Aderência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* à superfície de implantes lisos e rugosos. **Revista Implant News**, v. 6, n.1, p. 33–37, 2009.

SÁ, J. C, ALVES JÚNIOR, C.; ALVES, M. B. M. Coroas metalocerâmicas: vantagens, limitações e fatores laboratoriais protéticos que afetam a união entre o metal e a porcelana. **Revista Associação Brasileira de Odontologia Nacional**, v.16, n.3, p.185–189, 2008.

SAMARANAYAKE, L. P.; FIDEL, P. L.; NAGLIK, J. R.; SWEET, S. P.; TEANPAISAN, R.; COOGAN, M. M. Fungal infections associated with HIV infection. **Oral Diseases**, v, 8, n. 2, p. 151–160, 2002.

SANTAMARIA, M. P.; CASATI, M. Z.; NOCITI, J. R, F. H.; SALLUM, A. W.; SALLUM, E. A. Conceito atual das doenças peri-implantares: parte básica e implicações clínicas. **Revista Implant News**, v. 7, n. 3, p.123–128, 2010.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN. L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v.14, n.7, p.582–590, 2008.

SILVA S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288–305. 2012.

SLOTS, J. Selective Medium for Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, p. 606–609, 1981.

SMITH, DE; ZARB, GA. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 62, n. 5, p. 567-72, 1989.

SOLL, D. R. *Candida albicans* biofilms: is adhesion sexy? **Current Biology** v.18, p.717–720, 2008.

SOUSA, L. L.; FELIPE, H.; CODARO, E. M.; NAKAZATO, R. Z. Estudo microestrutural e eletroquímico de ligas Ni-Cr-Mo usadas em próteses dentárias depois de diferentes processos de refundição. **Corrosão e Protecção de Materiais**, Lisboa, v. 29, n.2, p.42–48, 2010.

SOUSTRE, J.; RODIER, M. H.; IMBERT-BOUYER, S.; DANIAULT, G.; IMBERT, C. Caspofungin modulates in vitro adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 3, p. 522–525, 2004.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 317–324, 2004.

SUNDSTROM, P. Adhesion in *Candida* spp. **Cellular Microbiology**, v. 4, p. 461–469, 2002.

TAGUTI, I. R. I. E.; CONSOLARO, M. E. L.; GUEDES, T. A.; DONATTI, L.; PATUSSI, E. V.; SVIDZINSKI, T. I. E. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 195–203, 2006.

TOTTI, M. A. G.; SANTOS, E. B.; ALMEIDA, O. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n.3, p. 202–207, 2004.

TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUCK, J.D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. v.214, n. 4, p.606–625, 2008.

WATAHA, J. C. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 83, p.223–234, 2002.

WEBB, B. C.; THOMAS, C. J.; WILLCOX, M. D.; HARTY, D. W.; KNOX, K. W. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Australian Dental Journal**, v. 43, p. 45–50, 1998.

WILLIAMS, D.; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, DOI: 10.3402/jom.v3i0.5771, 3, 2011.

WILLIAMS, D.W.; KURIYAMA, T.; SILVA, S.; MALIC, S.; LEWIS, M. A. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Journal of Periodontology**, v. 55, p. 250–265, 2011.

WILLIAMS, D. W.; JORDAN, R. P. C.; WEI, XIAO-QING.; ALVES, C. T.; WISE, M. P.; WILSON, M. J.; LEWIS, M. A. O. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology** v. 5, p. 1–8, 2013.

ZAPAROLI; A. C. R.; BALLARDIN, L.; RIVALDO, E. G.; FRASCA, L. C. F.; POCZTARUK, R. L.; FERNANDES, E. L. Osseointegração periimplantar em pacientes fumantes. **Stomatos**, v. 12, n. 23, p. 41–48, 2006.

ZHAO, X.; OH, S. H.; YEATER, K. M.; HOYER, L. L. Analysis of the *Candida albicans* *Als2p* and *Als4p* adhesins suggests the potential for compensatory function within the *ALS* family. **Microbiology**, v.151, p.1619–1630, 2005.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J. A.; WALSH, T. J.; FEUDTNER, C. The epidemiology and attributable outcomes of candidaemia in adults and children hospitalised in the United States: a propensity analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p.1232–1239,2005.

ZITZMANN, N. U.; BERGLUNDH, T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 8, p. 286–291, 2008.

ARTIGOS

ARTIGO 1

ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ADERÊNCIA DE ISOLADOS BUCAIS DE *Candida albicans* SOBRE SUPERFÍCIES DE DIFERENTES MATERIAIS UTILIZADOS NA CONFEÇÃO DE PRÓTESES SOBRE IMPLANTES

RESUMO

Os implantes dentários podem ser considerados reservatórios potenciais de re-infecções na cavidade bucal por *Candida albicans*. Este estudo tem como objetivo avaliar o perfil de aderência *in vitro* e diferenciação celular ao nível ultraestrutural de isolados bucais de *C. albicans* sobre superfícies de seis materiais, utilizados na confecção de próteses sobre implantes, além disso, correlacionar os resultados às diferenças nas características de cada material incluindo rugosidade, ângulo de contato e topografia das superfícies. Foram utilizados seis isolados clínicos e uma cepa padrão *C. albicans* ATCC 90028 para a avaliação do perfil de aderência e a diferenciação celular dos isolados sobre a superfície dos materiais dentários. Os isolados deste estudo apresentaram capacidade de aderir aos diferentes tipos de materiais dentários. Entre os isolados avaliados, o maior número de leveduras aderidas por mm^2 ocorreu sobre os materiais confeccionados em resina composta microhíbrida com nanopartículas e liga metálica de Níquel-Cromo. As menores taxas de aderência foram observadas para os materiais porcelana feldspática e resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo. Ressalta-se que não foram observadas leveduras aderidas sobre as superfícies destes materiais. Observou-se uma diversidade no padrão de aderência e diferenciação celular, entre os isolados, de forma isolado-dependente. Os isolados foram classificados conforme o perfil de adesão às superfícies dos materiais, seguindo quatro variações sendo estas: aderência difusa localizada, agregativa e pseudo-hifal. A maioria dos

isolados apresentou padrão de aderência difuso. Comparando estes achados às características dos materiais, observou-se que os materiais com maior rugosidade e principalmente de caráter hidrofóbico foram os que apresentaram maior aderência de leveduras sobre suas superfícies. Desta maneira, ressalta-se que a interação entre a levedura e os materiais dentários são eventos multifatoriais, uma vez que, apesar de toda discussão envolvendo características do micro-organismo e do material, outros fatores certamente estão envolvidos no evento de aderência.

Palavras chave: Candida albicans, aderência, próteses sobre implantes, hidrofobicidade, rugosidade.

INTRODUÇÃO

Os implantes dentários podem ser considerados reservatórios potenciais de micro-organismos patogênicos na cavidade bucal, que podem dar origem a doenças como a candidíase oral (CO) devido a *Candida albicans* (BÜRGERS et al., 2010). Próteses de vários tipos e finalidades têm sido consideradas entre as principais causas da CO (TOTTI et al., 2004; TAGUTI et al., 2005; HARRIOTT et al., 2010). A aderência e colonização microbiana foram consideradas fatores chaves no insucesso dos implantes dentários (ROMEIRO et al., 2009). A peri-implantite não ocorre sem prévia aderência microbiana e subsequente colonização (GATEWOOD et al., 1993).

O uso de implantes osseointegrados revolucionou os tratamentos odontológicos e a reabilitação oral (ESPOSITO et al., 1998). Atualmente, pacientes desdentados parciais ou totais podem ser tratados de modo conservador e com grande previsibilidade através das próteses sobre implantes. As próteses provisórias podem ser confeccionadas em resina acrílica

(quimicamente ou termicamente ativadas) e resina composta e representam papel primordial no tratamento com implantes. Estes dispositivos atuam reabilitando a região durante a fase de cicatrização e favorecendo as condições teciduais para a prótese definitiva (ATTARD; ZARB, 2005; SON; JANG, 2011; CAMACHO et al., 2014). Em relação às próteses fixas definitivas sobre implantes (unitárias ou múltiplas), elas são normalmente confeccionadas com uma infraestrutura em níquel-cromo recobertas por porcelana. Embora as *overdentures* (prótese total removível retida por implantes) são confeccionadas totalmente em resina acrílica ativada termicamente e as próteses do tipo protocolo (prótese total fixa parafusada sobre implantes) são confeccionadas com uma estrutura metálica recobertas por resina acrílica termoativada. Independentemente do tipo de prótese sobre implante empregado, o material utilizado em sua confecção deve apresentar estabilidade, insolubilidade, dureza, resiliência e resistência ao desgaste, apresentar sabor ou odor agradável, ser atóxico ou não irritante aos tecidos bucais e permitir adequado polimento para evitar fraturas. O material ideal deve reproduzir adequadamente as características dos dentes e dificultar a aderência de micro-organismos patogênicos que se acumulam na forma de biofilmes microbianos (ANUSAVICE, 1996; LI et al., 2012), pois estudos relatam que aderência depende do tipo de micro-organismo e das propriedades físico-químicas da superfície do implante (GATEWOOD et al., 1993).

Apesar da relevância da CO em usuários de próteses e mesmo considerando que a aderência é um dos primeiros passos para a formação de biofilmes (BÜRGERS et al., 2010; LI et al., 2012; MONTEIRO et al., 2013), o que coloca as próteses de materiais sintéticos entre os principais fatores de risco de infecções bucais causadas por leveduras, pouco é conhecido sobre a interação entre leveduras bucais e materiais odontológicos usados em próteses sobre implantes dentários.

Este estudo foi delineado com o objetivo de avaliar o perfil de aderência *in vitro* e sua diferenciação celular ao nível ultraestrutural de isolados bucais de *C. albicans* sobre

superfícies de seis materiais utilizados na confecção de próteses sobre implantes, e correlacionar estes resultados às diferenças nas características de cada material incluindo rugosidade, ângulo de contato e topografia das superfícies.

MATERIAIS E MÉTODOS

Micro-organismos em estudo

Neste estudo foram empregados seis isolados de *C. albicans* (CA12, CA07, CAE, CAD, CA04, CAJ) obtidos da cavidade bucal de indivíduos atendidos na Clínica de Odontologia da Faculdade Ingá, Maringá – Paraná, e uma cepa padrão *C. albicans* ATCC 90028. Estas amostras são mantidas no estoque de leveduras do Setor de Micologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da UEM sob o Parecer nº 0092-11 e todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Resolução 466/12 CNS.

Obtenção das amostras, cultura e identificação das leveduras isoladas

Amostras de saliva foram coletadas após bochecho com 10 mL de água mineral durante 30 segundos e depositadas em tubos cônicos. Posteriormente, foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Alíquotas de 10 µL do sedimento foram semeadas com alça bacteriológica na superfície do meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, USA), suplementado com cloranfenicol, incubadas a 37°C por 48–72 horas para avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Foram realizadas triagens por coloração das colônias crescidas em meio cromogênico CHROMagar® *Candida*

(CHROMagar Company, Paris, France). A seguir, as leveduras foram identificadas como *C. albicans* baseando-se na micromorfologia em ágar fubá (Oxoid, Basingstok, UK) acrescido de Tween 80 a 1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); prova do tubo germinativo; assimilação e fermentação de carbono e nitrogênio segundo os métodos clássicos (KURTZMAN; FELL, 1998). A identificação de *C. albicans* foi confirmada por PCR com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (FURLANETO et al., 2011).

Materiais usados em próteses sobre implantes odontológicos avaliados no estudo

Foram avaliados seis materiais, representando os mais frequentemente utilizados na prática clínica diária. Marca comercial, fabricante e composição dos materiais selecionados para este estudo estão elencados na tabela 1.

Confecção dos corpos de prova com os materiais avaliados

Utilizando-se uma matriz metálica como molde, foram confeccionados vinte e quatro corpos de prova (CP) de cada material avaliado, descritos na tabela 1, totalizando cento e quarenta e quatro CP. Cada um apresentando área total de 129,32 mm² (7,0 mm no maior diâmetro, 4,0 mm no menor, 3,5 mm de altura), conforme figura 1. Todos os materiais foram proporcionados e manipulados segundo instruções dos fabricantes e os CP foram confeccionados, por um técnico experiente, seguindo todas as etapas laboratoriais de acordo com as indicações para cada material, até a obtenção final de cada CP, simulando fielmente a realidade clínica encontrada pelo cirurgião dentista. Após obtenção dos CP, realizou-se a desinfecção em água corrente com detergente neutro, secados com papel absorvente e desinfetados por imersão em solução de glutaraldeído 2,0% por 10 minutos, seguidos de lavagem abundante em água esterilizada e secas novamente, evitando assim qualquer tipo de

contaminação microbiana. Os CP foram acondicionados em recipientes fechados e identificados, por material, para realização das análises propostas neste estudo.

Estudo da aderência *in vitro* de *Candida albicans* sobre diferentes materiais

Preparo da suspensão de leveduras

Para cada experimento, os isolados foram cultivados em SDA a 37°C por 18–24 horas. Duas a três colônias de cada uma das amostras de leveduras foram suspensas em solução salina estéril (SSE) em tubo de vidro (13×100 mm), que foi submetido à agitação em vórtex (AP56, Phoenix, Brasil). Em seguida, foram preparadas suspensões com concentração de aproximadamente 1×10^7 leveduras mL⁻¹ por contagem em câmara de Neubauer.

Quantificação da aderência

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Camacho et al. (2007a), usando técnicas estritamente assépticas, os CP de cada material em estudo foram colocados em tubo eppendorf contendo 1,0 mL da suspensão previamente padronizada e incubados a 37°C por 3 horas sob agitação contínua de 120 rpm em Incubadora Shaker Refrigerada. Em seguida, os CP, que continuaram no mesmo tubo eppendorf, foram lavados três vezes com SSE para remoção das leveduras fracamente ou não aderidas. Com auxílio de uma pinça, cada um foi transferido para outro tubo eppendorf contendo 1,0 mL de SSE e 0,5 g de pérolas de vidro (Roni Alzi, 1–2 mm de diâmetro). O tubo foi submetido à agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos para remoção das leveduras aderidas aos corpos de prova. 1,0 mL desta suspensão de leveduras aderidas foi repassado para outro eppendorf e em seguida, 20 µL foram semeados em placa contendo SDA, a qual foi incubada a 37°C por 24 horas para contagem do número de colônias crescidas. A quantificação da aderência foi determinada a partir do

número unidades formadoras de colônias por mm^2 (UFC mm^{-2}). Cada um dos seis materiais foi avaliado com os seis isolados em ensaios repetidos em dias distintos, os dados foram expressos em número médio (No.) de UFC mm^{-2} .

Padrão de aderência por microscopia eletrônica de varredura

Para a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizados quarenta e dois CP, sendo um material testado para cada isolado, e realizado varredura em vinte campos diferentes do mesmo material.

Cada CP foi incubado a 37°C por 12 horas em 1,0 mL da suspensão previamente padronizada (1×10^7 leveduras mL^{-1}) sob agitação contínua a 120 rpm em Incubadora Shaker Refrigerada. Em seguida, foram realizadas lavagens com SSE, para a remoção das leveduras fracamente ou não aderidas.

As leveduras aderidas aos CP foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% dissolvido em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a 4°C , por aproximadamente 18 horas e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. O material foi desidratado com série alcoólica de concentração crescente, seco ao ponto crítico (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC), recoberto com uma camada de ouro (Sputter Coater SDC 050 - BALTEC) e observado ao microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina – Paraná.

A partir da análise das imagens por MEV (Figura 2), propôs-se uma classificação do padrão de aderência *in vitro* de *C. albicans* aos diferentes materiais testados, seguindo os autores que descreveram aderência de *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC). Aderência *difusa* quando as células de levedura aderem isoladamente à superfície do material, observa-se

somente blastoconídeos ovalados ou na presença de tubos germinativos; aderência *localizada* quando grupos de leveduras aderem a regiões localizadas do material; aderência *agregativa* caracterizada por grumos de leveduras que se arranjam como “cachos de uva” ou “tijolos empilhados” ligando-se à superfície do material, podendo ser observado leveduras intimamente ligadas (NATARO et al., 1987; SCALETSKY et al., 1996; ALIKHANI et al., 2006; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013). E ainda, propôs-se uma classificação de aderência específica para fungos: aderência *pseudo-hifal* quando observa-se aglomerado de pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras sobre a superfície do material.

Caracterização das superfícies dos materiais

Determinação da hidrofobicidade de superfície dos materiais dentários pela técnica de ângulo de contato

Os ângulos de contato com a água (gota séssil) foram medidos através da deposição de três gotas de 0,5 µL água ultrapura (Milli-Q[®]), em temperatura ambiente, sobre a superfície de cada material testado, sendo realizada a medição pela projeção do ângulo, através da iluminação da gota depositada sobre o material, utilizando o equipamento Contact Angle Meter, Model CAM-MICRO, da marca Tanteq da UEM. Admite-se que uma superfície sólida está completamente molhada quando $\theta = 0^\circ$ e, que um líquido não molha esta superfície quando $\theta > 90^\circ$. Para a análise do ângulo de contato utilizou-se dez CP para cada material.

Determinação da rugosidade

Os materiais foram submetidos à leitura da rugosidade superficial por meio da utilização de um rugosímetro (Surftest SJ 400, Mitutoyo America, EUA) da UEL, calibrado a cada medição com valores de cut-off (λ_c) e velocidade da leitura, de 0,8 mm e 0,1 mm seg^{-1} , respectivamente. O valor médio da rugosidade superficial (R_a) foi analisado usando dez CP de cada material testado, escolhidos aleatoriamente. Para cada CP foi obtido uma média de R_a resultante de três leituras da rugosidade de superfície, realizadas nos sentidos 12h, 3h e 6h.

Determinação da topografia superficial

Para análise da topografia superficial de três CP, de cada material, utilizou-se o microscópio de força atômica (MFA) (Shimadzu, modelo SPM-9500J3) da UEM. Foram obtidas três imagens de cada material em varredura $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, de modo a obter valores médios e reprodutíveis do parâmetro de rugosidade (RMS) e compará-los aos valores médios da rugosidade superficial (R_a).

Análise estatística

Foi realizada a análise estatística de todos os ensaios utilizando o *software* Graph Pad Prism[®] versão 5.0 (Graph Pad Software Inc.), aplicando o teste de análise de variância (ANOVA) com o teste Tukey para comparações entre os diferentes materiais e os isolados de *C. albicans*. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação da aderência *in vitro* em materiais dentários

A aderência microbiana é um parâmetro importante na fisiopatogenia de várias doenças infecciosas como a candidíase oral e peri-implantite. Considerando que estas doenças estão associadas à formação de biofilme, é interessante conhecer a interação de leveduras bucais nas primeiras horas após contato com materiais usados em implantes, ou seja sobre a aderência, que é a primeira etapa para a formação do biofilme. A escolha de *C. albicans* foi em razão de ser a espécie mais frequentemente isolada na cavidade bucal humana. Segundo Ramage et al. (2002), ocorre em 10 a 50% dos indivíduos saudáveis, como o caso dos voluntários que forneceram as leveduras avaliadas neste estudo.

A figura 3 mostra os dados relativos ao perfil de aderência de seis isolados clínicos bucais de *C. albicans* sobre os diferentes materiais dentários avaliados. De modo geral, todos os isolados foram capazes de aderir aos materiais testados. Porém, é evidente a grande capacidade de aderência, tanto comparando os diferentes isolados em relação a um mesmo material, quanto entre os materiais, algumas diferenças mostradas são estatisticamente significativas. Os isolados CA04 e CAJ apresentaram os maiores valores de UFC mm⁻² sobre o material Ni-Cr ($8,9 \times 10^3$ e $9,7 \times 10^3$) e ambos também foram os mais eficientes em aderir sobre RC ($6,6 \times 10^3$ e $8,1 \times 10^3$), respectivamente ($p < 0,001$).

Por outro lado, os isolados CAE e CAD aderiram de maneira variável a todos os materiais exceto à PF e RAAQv, respectivamente.

Análise mais detalhada sugere que essa diversidade observada no conjunto (seis isolados e seis materiais) parece estar mais associada ao tipo do material, sendo RC e Ni-Cr, os que permitiram maior aderência da maioria dos isolados, o que quantitativamente pode ser visto pela figura 3, e a interação melhor visualizada nas figuras 4 e 5 que ilustram o

comportamento de cada um dos seis isolados frente aos materiais que retiveram maior número de UFC mm⁻².

No geral, as menores taxas de aderência foram observadas para os isolados CA07 e CAE em quatro materiais (PF, RAAQ, RAAQv e RAAT) dos seis testados, No.= $0,95 \times 10^3$ e $0,97 \times 10^3$ UFC mm⁻², respectivamente ($p > 0,05$). Enquanto, o isolado CA04 foi o que apresentou os maiores UFC de leveduras aderidas, nos mesmos materiais testados (No.= $2,2 \times 10^3$ UFC mm⁻²), exceto em RAAT ($p < 0,05$).

A comparação entre os isolados e por material evidenciou maior capacidade de aderência do isolado CA04 aos materiais PF, RAAQ e RAAQv; o isolado CAD foi o que mais aderiu ao material RAAT e o CAJ foi o isolado com maior potencial de adesão aos materiais RC e Ni-Cr (Figura 2), ($p < 0,001$).

Através do ensaio de aderência *in vitro* e quantificação do número de UFC mm⁻², observou-se que todos os isolados bucais de *C. albicans* foram aderentes aos materiais testados. Se considerarmos que o experimento partiu de uma suspensão padronizada em 1×10^7 leveduras mL⁻¹, dois isolados entre os seis de *C. albicans* apresentaram menor capacidade de adesão, $0,96 \times 10^3$ UFC mm⁻². Este resultado está em concordância com Camacho et al. (2007b).

Padrão de aderência por microscopia eletrônica de varredura

A repetitividade quanto ao padrão de aderência das leveduras está representada na tabela 2. A figura 2 ilustra exemplos de organização celular ou padrão de aderência dos isolados bucais de *C. albicans* nos diferentes materiais testados. Entre os seis isolados, incluindo a cepa padrão ATCC 90028, quarenta e duas análises foram realizadas por MEV,

propondo uma classificação do padrão de aderência, em modelo *in vitro*, de *C. albicans* aos materiais avaliados neste estudo.

Os isolados CA12 e CA07 mantiveram um padrão de aderência difuso em todos os materiais testados. Nos vinte campos analisados por MEV foi verificado predomínio de blastoconídeos ovalados isoladamente, além da presença de tubo germinativo por toda a superfície dos materiais avaliados, característico do padrão de aderência difusa. Embora o isolado bucal CAE e a cepa padrão ATCC 90028 tenham apresentado aderência difusa para a maioria dos materiais, no Ni-Cr e RC exibiram uma organização celular agregativa (Figuras 4 e 5), evidenciando-se aglomerados de células blastoconidiais e leveduras intimamente ligadas por toda sua superfície.

O isolado CAD apresentou o mesmo padrão agregativo em RC, no entanto, exibiu outros dois tipos de padrão, difuso e localizado, os mesmos padrões observados em CA04 e CAJ e na cepa ATCC 90028, nos quais verificaram-se grupos de leveduras aderidos em regiões localizadas dos materiais RAAT e RC. Além disso, observou-se abundância de material extracelular tipo floculento ou granular distribuído ao redor das células dos seis isolados bucais e da cepa padrão de *C. albicans*, quando aderidos à RC (figura 4). Dentre os seis isolados clínicos, CA04 e CAJ foram os únicos que apresentaram aderência do tipo pseudo-hifal ao Ni-Cr, sendo observadas pseudo-hifas e hifas em grande parte da superfície analisada (Figuras 5).

Os isolados bucais CAD, CA04 e CAJ foram os que apresentaram maior variação no perfil de aderência e diferenciação celular, entre os isolados, de forma isolado-dependente.

Em termos morfológicos, *C. albicans* durante o seu crescimento tem a capacidade de adquirir a forma de levedura, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. No entanto, *C. albicans* na forma de levedura tem maior capacidade de se disseminar na corrente sanguínea, garantindo a

sua sobrevivência (BERMAN, 2006; SUDBERY et al., 2004). Além disso, a morfologia de *C. albicans* também varia com as condições de crescimento, uma vez que em laboratório as culturas de *C. albicans* que crescem a 25°C têm maior tendência para se apresentarem na forma de levedura. Em condições de a 37°C e em resposta a estímulos externos como soro, *C. albicans* tem tendência a formar hifas. Relativamente às pseudo-hifas, estas desenvolvem-se a temperaturas intermediárias (BERMAN, 2006). Existem estudos que revelam que *C. albicans* na forma de hifas alongadas tem capacidade de escapar às células fagocíticas (BERMAN, 2006; SUDBERY et al., 2004). E ainda, a presença de tubo germinativo em *C. albicans* está associado com maior capacidade de invadir tecidos (GHANNOUM, 2000) e também de conferir à levedura maior aderência às superfícies de células (CONSOLARO et al., 2005) e superfície abióticas (KEMMELMEIER et al., 2011).

Caracterização das superfícies dos materiais

Os CP foram confeccionados rigorosamente iguais para os seis materiais conforme ilustrado na figura 1. Considerando o comportamento variável de um mesmo isolado aos diferentes materiais, foi necessário desenvolver estudos sobre as características ultraestruturais de cada material avaliado.

A molhabilidade de uma superfície sólida é caracterizada em termos de ângulos de contato e, conseqüentemente, em adesões relativas entre líquido/sólido. Mais especificamente, a medida de ângulo de contato com água (gota séssil) é um método quantitativo de medição da polaridade de uma superfície sólida. Determina-se que o ângulo de contato será zero quando o espalhamento do líquido for completo sobre a superfície (material hidrofílico), e se o ângulo for maior que 90°, o líquido não molha a superfície do material (material hidrofóbico) (ADAMSON, 1990; GESSER; KRAUSE, 2000).

De acordo com o valor médio dos ângulos de contato dos materiais avaliados (Figura 6a), pode-se observar que o material confeccionado em PF apresentou caráter hidrofílico (36°), diferindo estatisticamente dos demais materiais ($p < 0,001$), que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os materiais do mesmo grupo ($p > 0,05$). No entanto, os materiais RC e Ni-Cr apresentaram caráter mais hidrofóbico (80° e 88°), quando comparado aos demais materiais ($p < 0,001$). Os valores médios dos ângulos de contato para os materiais RAAQ, RAAQv e RAAT variam entre 70° a 74° , apresentando diferenças significativas somente entre RAAQ e RAAT ($p < 0,05$).

A análise estatística da rugosidade superficial de cada material (dez CP de cada) representa a média dos valores de Ra obtidos, em μm , em três avaliações independentes. A comparação entre os CP dentro do mesmo material utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$). A análise quantitativa dos valores Ra, obtidos para cada material pode ser observada na figura 6b. Os dez CP confeccionados com liga metálica de Ni-Cr apresentaram o menor valor de Ra ($0,302 \mu\text{m}$), sendo diferente estatisticamente dentre os materiais avaliados ($p < 0,001$). Os valores Ra entre os materiais PF e Ni-Cr apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$). Os valores de Ra para os materiais RAAQ e RAAT foram bem semelhantes (entre $0,85$ a $1,07 \mu\text{m}$). Já os dez CP confeccionados em RC apresentaram diferenças significativas entre os demais materiais, apresentando os maiores valores de Ra ($3,609 \mu\text{m}$) entre os materiais testados ($p < 0,001$), seguido pelo RAAQv que apresentou Ra $1,859 \mu\text{m}$.

A rugosidade é uma importante característica de superfície dos materiais restauradores, muitas vezes sendo responsável por causar abrasividade, retenção mecânica de substâncias do ambiente externo, e é influenciada por características do material, como porosidades, composição e defeitos de massa (BOAVENTURA, 2013). Quando a superfície do material não apresenta lisura satisfatória, isto pode comprometer tanto a função quanto

fatores biológicos e estéticos (YILMAZ, 2010), pois uma área rugosa pode interferir na saúde dos tecidos vizinhos facilitando o acúmulo de biofilme dentário. Pela análise estatística, foi possível verificar que os valores das médias de Ra encontrados variaram significativamente de acordo com o material testado e estão compatíveis com outros estudos da literatura. Valores de rugosidade entre 0,7 e 1,44 μm podem facilitar o acúmulo de biofilme e contribuir para a instalação da doença periodontal e ou peri-implantar (MARIGO et al., 2001). Alguns autores afirmam que se o valor de rugosidade exceder 0,2 μm deste limite haverá adesão de bactérias e formação de biofilme; e, se exceder 0,5 μm será clinicamente detectável pelo paciente (YAP et al., 2004). A rugosidade superficial dos materiais avaliados neste estudo variou de 0,3 a 3,6 μm . Desses, destacam-se os materiais RAAQv e RC com maiores valores de rugosidade, podendo esta ser detectada pelo paciente. Os CP em metal apresentaram os menores valores de rugosidade, demonstrando uma grande lisura superficial (bastante lisas), com valores que caracterizam uma rugosidade não perceptível pelo paciente. A rugosidade superficial é uma propriedade importante tendo em vista sua influência na adesão de micro-organismos (RADFORD et al., 1998; ALVES, 2007).

Em vários estudos relata-se que o desgaste por atrito mecânico, conhecido como abrasão, de resinas composta nanoparticulada, pode promover a remoção de inúmeras nanopartículas causando crateras na sua superfície (DODGE, 1991). Uma superfície rugosa e irregular não é somente desconfortável, mas permite o aprisionamento de alimentos e acúmulo de biofilme microbiano (QUIRYNEN et al., 1993; TSANG et al., 2007). No presente estudo, foi evidenciada, no material confeccionado em RC, a presença de material extracelular de aspecto granular recobrando toda a superfície celular dos isolados de *C. albicans*, característico da produção de biofilme (Figura 4).

Um aspecto a ser considerado importante em relação à molhabilidade, é a propriedade intrínseca do material, a qual é afetada mecanicamente pela rugosidade de

superfície, promovendo, como consequência, o acúmulo de biofilme. O glaze aplicado sobre as PF, além de promover uma superfície mais lisa removendo irregularidades, aumenta a molhabilidade, por isso deve ser preferido a outros tipos de tratamento de superfície (AKSOY et al., 2006). Fato verificado em nosso estudo, no qual os materiais confeccionados em PF, apresentaram os menores valores de ângulo de contato, demonstrando suas características de maior molhabilidade, podendo ser considerado o material mais hidrofílico, entre os grupos testados. Nesse sentido, as porcelanas glazeadas são materiais dentários que proporcionam pouco acúmulo de biofilme, além de permitir sua remoção com facilidade (AL-WHADNI, 2006).

A MFA produz imagens tridimensionais da superfície de sólidos com alta resolução a partir da varredura completa da topografia do material de estudo (GENGENBACH et al., 1994; GENGENBACH, T. R.; GRIESSER, 1998). Análise topográfica das superfícies de três CP de cada grupo de material obtida por MFA, podem ser comparadas na figura 7. Para cada CP foram obtidas três análises de varredura $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ em campus diferentes de cada material, para efeito de comparação e reprodutibilidade. Desta forma, os valores de rugosidade superficial obtidos foram uma média dos valores mensurados em cada imagem e comparados aos valores médios da Ra, apresentaram semelhanças nos resultados para as duas análises. No caso do material RC, não foi possível realizar a análise por MFA, devido a limitações da própria técnica que não permite a observação da superfície com elevada rugosidade superficial, já que não alcança vales muito profundos. Conforme foi observado na análise de rugosidade através do rugosímetro, em que a RC apresentou maior valor de Ra e a visualização por MEV da sua superfície apresentou inúmeras irregularidades e depressões (Figura 4).

A figura 7 mostra as imagens de topografia tridimensional obtidas por MFA de somente cinco materiais dentários. Importante salientar, que nas imagens de topografia, as

áreas mais escuras correspondem às regiões mais baixas (reentrâncias) da superfície dos materiais, enquanto as áreas mais claras mostram as regiões mais salientes. As imagens que mostram-se mais planas, ou seja com poucas áreas escuras e coloração mais homogêneas foram dos materiais PF e Ni-Cr.

A imagem do material RAAQv foi a que apresentou uma maior extensão escura, sendo observado região com mais reentrâncias, confirmando estas irregularidades (aspecto de bolhas) na superfície observadas por MEV (Figura 8). Apesar dos grupos representados por RAAQ e RAAQv serem formados pelo mesmo material com alteração somente no modo de polimerização, a RAAQ é polimerizada nas condições do ar atmosférico e a RAAQv é polimerizada à vácuo (CAMACHO et al. 2014). Através de MEV foi evidenciado que a superfície do material polimerizado à vácuo é mais irregular comparativamente ao do material RAAQ, embora não tenha havido variação no número de leveduras aderidas nestes materiais.

Correlacionando as médias de Ra com as imagens de MEV e MFA, pode-se inferir que os materiais que apresentaram uma lisura de superfície maior, com menos irregularidades são dos materiais confeccionados em liga metálica de Ni-Cr (Figura 5) seguido da PF (Figura 8). Enquanto que os maiores valores para Ra foram apresentados pelos materiais RAAQv e RC.

Entretanto, o material Ni-Cr que apresentou caráter hidrofóbico foi também o que obteve os maiores números de UFC mm^{-2} e padrão de aderência pseudo-hifal. Portanto, a rugosidade de superfície parece não ter tanta influência sobre a quantidade de leveduras aderidas em nosso modelo *in vitro*, fato este em concordância com os achados de Klotz et al. (1985) e Bürgers et al. (2010), que determinaram maior adesão de *C. albicans* em superfícies hidrofóbicas e que produzem baixa energia livre de superfície.

Apesar disso, é importante lembrar que a interação entre a levedura e os materiais dentários são eventos multifatoriais, uma vez que, apesar de toda discussão envolvendo características do micro-organismo e do material, outros fatores certamente estão envolvidos no evento de aderência, a exemplo do mostrado na figura 8. Vale ressaltar que não foi observado leveduras aderidas, de CAE e CAD, sobre as superfícies dos materiais PF e RAAQv, respectivamente.

Dessa forma, considerando a importância das propriedades dos materiais para infraestrutura e cobertura das próteses sobre implantes no acúmulo de biofilme e no sucesso ou fracasso de uma prótese, o presente trabalho torna-se de grande relevância ao adicionar dados à literatura científica, tendendo a facilitar uma correlação das propriedades testadas com o prognóstico das próteses sobre implantes.

Este estudo confirma que a aderência e, por consequência, a produção de biofilme é um fator importante a ser considerado nos tratamentos reabilitadores odontológicos, principalmente nas próteses sobre implantes. Maior rugosidade pode aumentar a aderência (maior área de contato) estimulando a formação dos biofilmes, ampliando os riscos de infecções mesmo em indivíduos saudáveis. No entanto, considerando os resultados e correlações, pode-se dizer que as superfícies mais hidrofóbicas, determinadas por ângulo de contato e molhamento (energia) superficial também apresentam papel relevante na aderência dos micro-organismos. Sendo assim, medidas de prevenção como escolha do material, conforme a rugosidade, tratamento da superfície com mudanças nas características de hidrofobicidade e, procedimentos de higienização, limpeza bucal são importantes para reduzir a aderência e biofilme nos implantes e consequentemente infecções causadas por leveduras na cavidade bucal.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)–Brasil. D.P.C. foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of Surfaces**. Fifth Edition, Chapter IV: Copyright by John Wiley & Sons, Inc. New York, 1990.
- AKSOY, G.; POLAT, H.; POLAT, M.; COSKUN, G. Effect of various treatment and glazing (coating) technique on the roughness and wettability of ceramic dental restorative surfaces. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.53, p.254–259, 2006.
- ALVES, P. V.; LIMA FILHO, R. M.; TELLES, E.; BOLOGNESE, A. Surface roughness of acrylic resins after different curing and polishing techniques. **Angle Orthodontist**, v. 77, p. 528-531, 2007.
- AL-WAHADNI, A. An in vitro investigation into the surface roughness of 2 glazed, unglazed and dandred finished ceramic materials. **Quintessence International**, v. 37, n. 4, p. 311–317, 2006.
- ALIKHANI, M. Y.; MIRSALEHIAN, A.; ASLANI, M. M. HeLa-Cell adherence patterns of Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from faecal samples. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 8, p. 1465–1469, 2006.
- ANUSAVICE, K. J. Phillips science of dental materials. **Philadelphia Saunders Company**, p. 237–271, 1996.
- ATTARD, N. J; ZARB, G. A. Immediate and early implant loading protocols: a literature review of clinical studies. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v.94, n.3, p.242–58, 2005.
- BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 595–601, 2006.
- BOAVENTURA, J. M. C.; NISHIDA, R.; ELOSSAIS, A. A.; LIMA, D. M.; REIS, J. M. S. N.; CAMPOS, E. A.; ANDRADE, M. F. Effect finishing and polishing procedures on the surface roughness of IPS Empress 2 ceramic. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 71, n.3–4, p. 438–443, 2013.
- BÜRGERS, R.; HAHNEL, S.; REICHERT, T. E.; ROSENTRITT, M.; BEHR, M.; GERLACH, T.; HANDEL, G.; GOSAU, M. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2307–2313, 2010.

CAMACHO, D. P.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Chlorhexidine and gentian violet effect on the adherence of *Candida* sp to urinary catheters. **Mycopathologia**, v. 163, p. 261–266, 2007a.

CAMACHO, D. P.; CONSOLARO, M. E. L.; PATUSSI, E. V.; DONATTI, L.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). **Contraception**, v.76, p. 439–443, 2007b.

CAMACHO, D. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FURLANETO, M. C.; LOPES, M. B.; CORRÊA, G. O. Resinas acrílicas de uso odontológico à base de polimetilmetacrilato. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 6, n. 3, p.63–72, 2014.

CONSOLARO, M. E. L.; ALBERTONI, T. A.; SVIDZINSKI, A. E.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 159, p. 501–507, 2005.

DODGE, W.W. Comparison of wet and dry finishing of resin composites with aluminium oxide discs. **Dental Materials**, v. 7, n. 1, p. 18-20, 1991.

ESPOSITO, M; HIRSCH, J. M; LEKHOLM, U. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I) Success criteria and epidemiology. **European Journal of Oral Sciences**, v. 106, p. 527–551, 1998.

FURLANETO, M. C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 595–599, 2011.

GATEWOOD, R. R.; COBB, C. M.; KILLOY, W. J. Microbial colonization on natural tooth structure compared with smooth and plasma-sprayed dental implant surfaces. **Clinical Oral Implants Research**, v. 4, n. 2, p. 53–64, 1993.

GENGENBACH, T. R.; XIE, X. M.; CHATELIER, R. C.; GRIESSER, H. J. Evolution of the Surface-Composition and Topography of Perfluorinated Polymers Following Ammonia-Plasma Treatment. **Journal of Adhesion Science and Technology**, v. 8, n. 4, p. 305–328, 1994.

GENGENBACH, T. R.; GRIESSER, H. J. J. Deposition conditions influence the postdeposition oxidation of methyl methacrylate plasma polymer films. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 985–1000. 1998.

GEISSER, H. D.; KRAUSE, P. A demonstration of surface tension and contact angle **Journal of Chemical Education**, v.77, p. 58–59. 2000.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n.1, p. 122–143, 2000.

HARRIOTT, M. M.; LILLY, E. A. RODRIGUEZ, T. E.; FIDEL, JR P.L. NOVERR, M. C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, p. 3635–3644, 2010.

KEMMELMEIER, E. G.; VIDIGAL, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Increased virulence of *Candida albicans* after antineoplastic chemotherapy. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada.**, v. 32, n. 2, p. 257–262, 2011.

KLOTZ, S. A.; DRUTZ, D. J.; ZAJIC, J. E. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. **Infection and Immunity**, v. 50, p. 97–101, 1985.

KURTZMAN, C. P.; FELL, F. W. The yeast. **A taxonomia study**. Amsterdam: Elsevier, Inc. p.891–913, 1998.

LI, J.; HIROTA K.; GOTO, T.; YUMOTO, H.; MIYAKE, Y.; ICHIKAWA, T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. **Journal of Dentistry**, v. 40, p. 686–692, 2012.

MARIGO, L.; RIZZI, M.; LA TORRE, G.; RUMI, G. 3-D surface profile analysis: Different finishing methods for resin composites. **Operative Dentistry**, v. 26, p. 562–568, 2001.

MONTEIRO, D. R.; NEGRI, M.; SILVA, S.; GORUP, L. F.; CAMARGO, E. R.; OLIVEIRA, R.; BARBOSA, D. B.; HENRIQUES M. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 410–412, 2014.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, p. 829–831, 1987.

PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Adhesion of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Inhibition by Glycocompounds Engaged in the Mucosal Innate Immunity. **Biology**, v. 2, p. 810–831, 2013.

QUIRYNEN, M.; VANDERMEI, H. C.; BOLLEN, C. M.; SCHOTTE, A.; MARECHAL, M.; DOORNBUSCH, G.; et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. **Journal of Dentistry**, v. 72, p. 1304–1309, 1993.

RADFORD, D. R.; SWEET, S. P.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. **Journal of Dentistry**, v. 26, p. 577–583, 1998.

RAMAGE, G. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 11, p. 5459–5463, 2002.

ROMEIRO, R. L, MAJEWSKI, M.; MOLINA, F.; JUNQUEIRA, J. C.; OLIVEIRA, L.; JORGE, A. O. C. Aderência de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata* à superfície de implantes lisos e rugosos. **Revista Implant News**, v. 6, n.1, p. 33–37, 2009.

- SCALETSKY, I. C.A.; PELAYO, J.S.; GIRALDI, R.; RODRIGUES, J.; PEDROSO, M. Z.; TRABULSI, L. R. EPEC adherence to HEp-2 cells. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 58–62, 1996.
- SON, M. K; JANG, H. S. Gingival recontouring by provisional implant restoration for optimal emergence profile: report of two cases. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 41, p. 302–308, 2011.
- SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 317–324, 2004.
- TAGUTI, I. R. I. E.; CONSOLARO, M. E. L.; GUEDES, T. A.; DONATTI, L.; PATUSSI, E. V.; SVIDZINSKI, T. I. E. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 195–203, 2006.
- TSANG, C. S. P.; NG, H, MC MILLAN, A. S. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. **Clinical Oral Investigations**, v. 11, p.361–368, 2007.
- TOTTI, M. A. G.; SANTOS, E. B.; ALMEIDA, O. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n.3, p. 202–207, 2004.
- YAP, A. U.; YAP, S. H.; TEO, C. K.; NG, J. J. Comparison of surface finish of new aesthetic restorative materials. **Operative Dentistry**, v. 29, p. 100–104, 2004.
- YILMAZ, K; ÖZKAN, P. The methods for the generation of smoothness in dental ceramics. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 31, n. 1, p. 30–41, 2010.

Tabela 1. Materiais utilizados e respectivas características

Material	Marca comercial e Fabricante	Composição*	Abreviação
Porcelana Feldspática ^Δ	VM7, Vita Zahnfabrikd. Bad Sackingen, Alemanha	74,8% Óxido de silício; 10,3% Óxido de alumínio, 7,5% Óxido de potássio, 3,5% Óxido de sódio, 3,3% Óxido de cálcio; 0,4% Óxido de Zircônica, 0,1% Óxido de ítrio (% mol)	PF
Resina acrílica ativada quimicamente**	JET, Clássico artigos Odontológicos Ltda, Brasil	Pó: Polímero de metilmetacrilato, acrilato de etila, e peróxido de benzoíla; Líquido: Monômero de polimetilmetacrilato e dimetil p-toluidina	RAAQ
Resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo**	JET, Clássico artigos Odontológicos Ltda, Brasil	Pó: Polímero de metilmetacrilato, acrilato de etila, e peróxido de benzoíla; Líquido: Monômero de polimetilmetacrilato e dimetil p-toluidina	RAAQv
Resina acrílica ativada termicamente	VIPI CRIL, Dental Vipi Ltda, Brasil	Copolímero de Metil-Metacrilato, acrilatos, Peróxido de Benzoíla e pigmentos atóxicos	RAAT
Resina composta microhíbrida com nanopartículas	4 SEASONS, Ivoclar Vivadent Schaan, Liechtenstein	BIS-GMA, TEGMA, UDMA, 76% wt de carga vidro bário trifluoritérbio, vidro de Ba-Al-fluorsilicato e sílica dispersa	RC
Liga metálica de Níquel-Cromo	VERABOND II, AalbaDent Cordelia, USA	77,05% Níquel; 12,50% Cromo; 4,25% Molibdênio; 2,25% Alumínio; 0,45% Titânio; 4,00% Nióbio; 0,50% Silício	Ni-Cr

* Informações fornecidas pelo fabricante.

** Mesmo material com alteração do modo de polimerização.

^Δ Para o acabamento final, aplica-se uma camada de glaze sobre a superfície.

Tabela 2. Padrão de aderência de seis isolados bucais de *Candida albicans* sobre materiais usados na implantodontia

	CA12	CA07	CAE	CAD	CA04	CAJ	ATCC 90028
PF	Difusa	Difusa	NA	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa
RAAQ	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa	Difusa
RAAQv	Difusa	Difusa	Difusa	NA	Difusa	Difusa	Difusa
RAAT	Difusa	Difusa	Difusa	Localizada	Difusa	Localizada	Localizada
RC	Difusa	Difusa	Difusa	Agregativa	Localizada	Localizada	Agregativa
Ni-Cr	Difusa	Difusa	Agregativa	Difusa	Pseudo-hifal	Pseudo-hifal	Difusa

PF: Porcelana Feldspática; RAAQ: resina acrílica ativada quimicamente; RAAQv: resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo; RAAT: resina acrílica ativada termicamente; RC: resina composta microhíbrida com nanopartículas; Ni-Cr: Liga metálica de Níquel-Cromo e NA = não aderência.

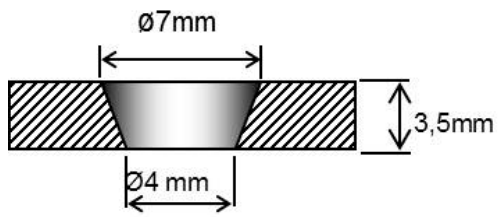


Figura 1. Desenho esquemático dos corpos de prova confeccionados em seis tipos de materiais. Área total de $129,32 \text{ mm}^2$.

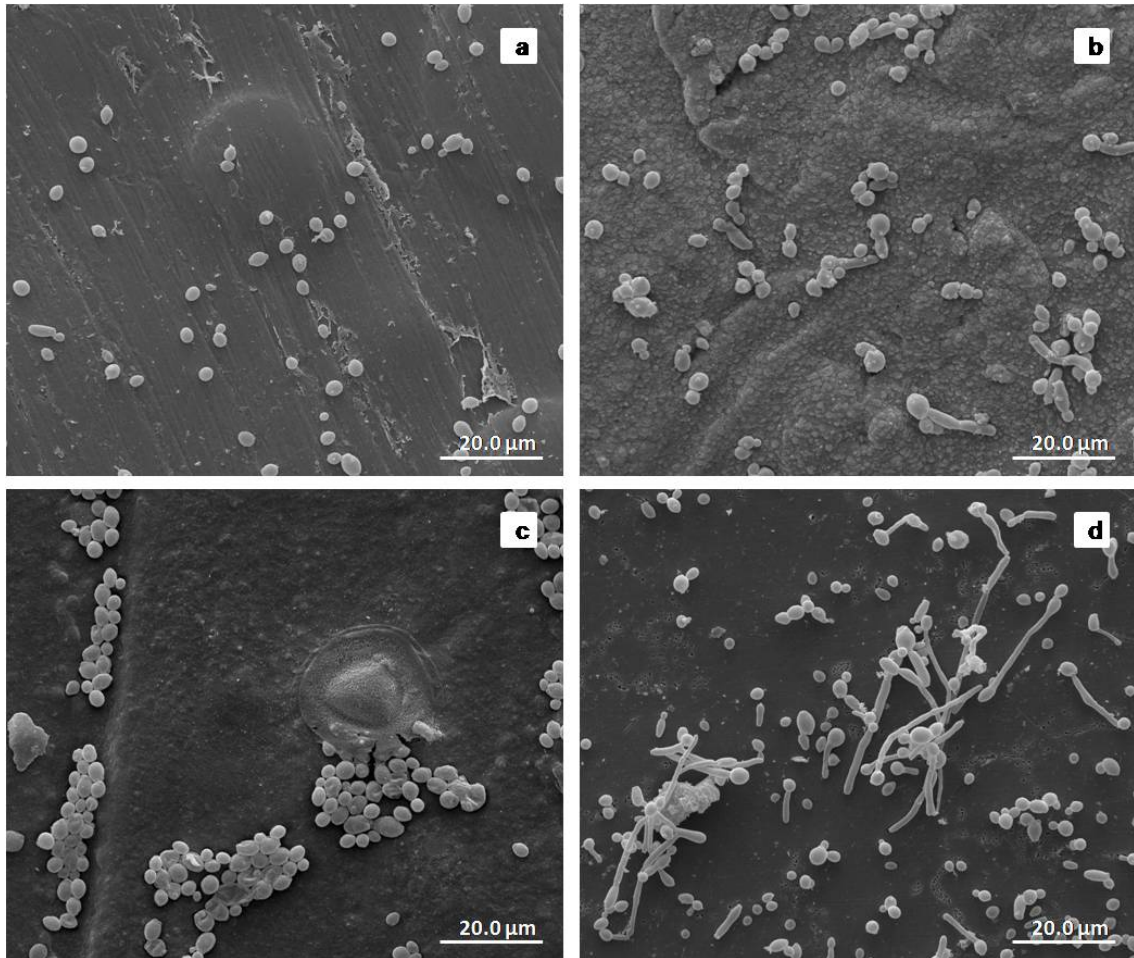


Figura 2. Padrão de aderência em materiais. A: Aderência *difusa*, B: Aderência *localizada*, C: Aderência *agregativa*, D: Aderência *pseudo-hifal*. Aumento 2.400X.

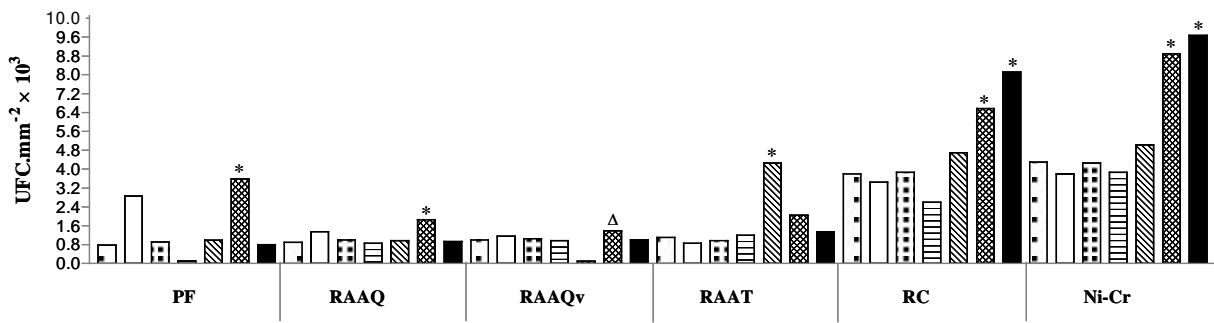


Figura 3. Número de leveduras aderidas, expresso em UFC mm^{-2} , nos materiais testados em ensaios de aderência *in vitro* de seis isolados clínicos e uma cepa padrão *Candida albicans* ATCC 90028, após 3 horas de incubação. *As diferenças são estatisticamente significativas ($p < 0,001$) comparando a aderência entre os diferentes isolados sobre cada material. Δ Diferença significativa entre os isolados sobre resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo ($p < 0,05$).

(□ ATCC 90028); (▨ CA12); (▩ CA07); (▧ CAE); (▦ CAD); (▤ CA04); (■ CAJ)

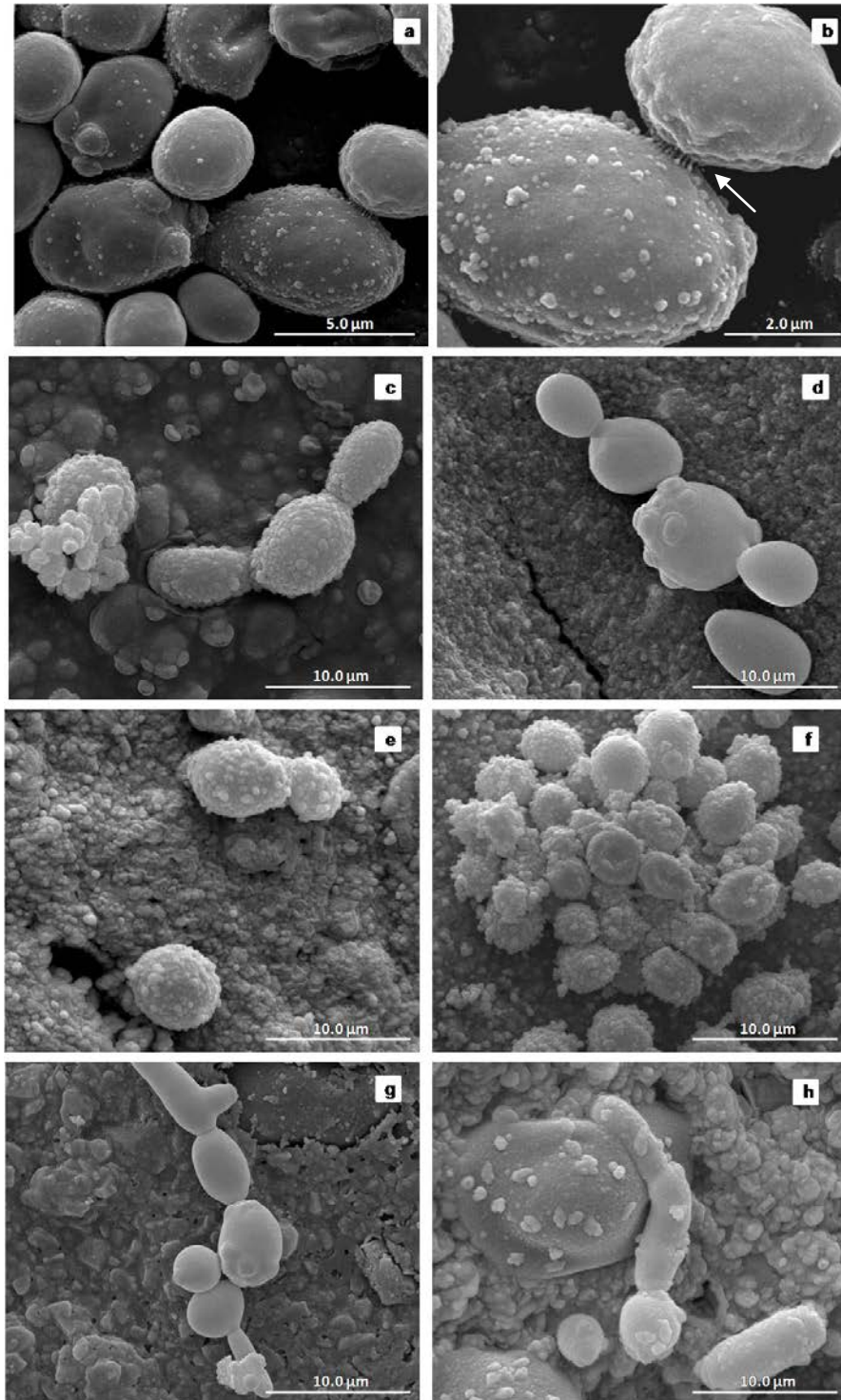


Figura 4. Padrão de aderência dos isolados de *Candida albicans* sobre a resina composta microhíbrida com nanopartículas (RC), após 12 horas de incubação. Aderência agregativa: *Candida albicans* ATCC 90028 (5 μm) (A), podendo ser observado ligação entre as leveduras (2 μm) (B), (seta); Aderência difusa: isolados CA12 (C), CA07 (D) e CAE (E); Aderência agregativa: isolados CAD (F); Aderência pseudo-hifal: isolados CA04 (G) e CAJ (H). Observa-se presença de matriz extracelular de aspecto granular recobrando as células. As barras representam 10 μm.

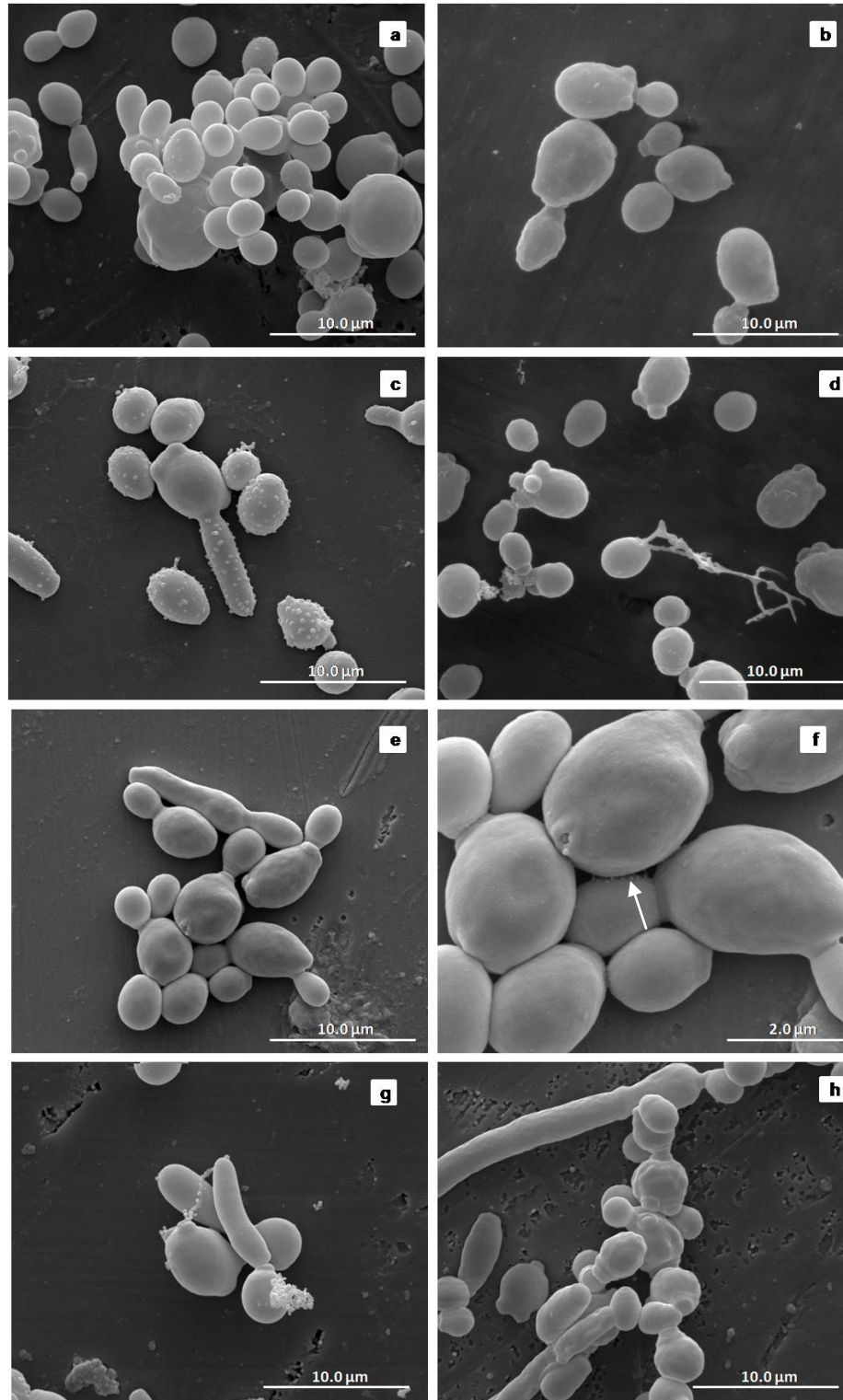


Figura 5. Padrão de aderência dos isolados de *Candida albicans* sobre a liga metálica de Níquel-Cromo (Ni-Cr), após 12 horas de incubação. Aderência difusa: isolados CA12 (A), CA07 (B), CAD (C) e *Candida albicans* ATCC 90028 (D); Aderência agregativa: isolado CAE (E), observando-se leveduras intimamente ligadas em aumento 24.000X (F), (seta); Aderência pseudo-hifal: isolados CA04 (G) e CAJ (H). As barras representam 10 μm.

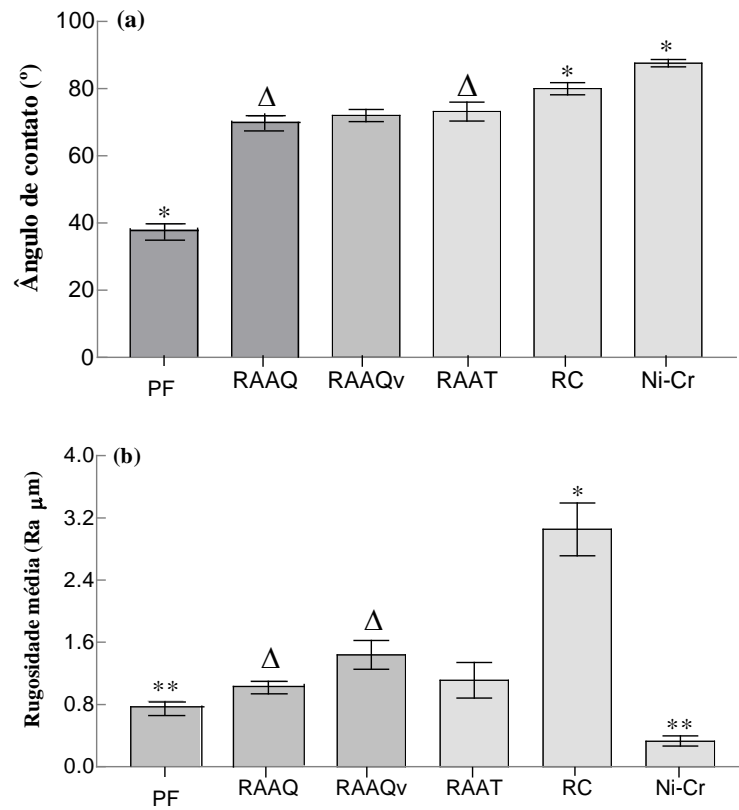


Figura 6. Média dos valores do ângulo de contato com a água (a), rugosidade superficial (b) para PF (porcelana feldspática), RAAQ (resina acrílica ativada quimicamente), RAAQv (resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo), RAAT (resina acrílica ativada termicamente), RC (resina composta microhíbrida com nanopartículas) e Ni-Cr (Liga metálica de Níquel-Cromo). Erro padrão das médias de dez medições são apresentados em barras. * $P < 0,001$, em comparação entre os materiais testados utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. **Diferença significativa entre PF e Ni-Cr ($p < 0,01$); ^Δdiferença significativa entre RAAQ e RAAQv; RAAQ e RAAT nos dois testes ($p < 0,05$).

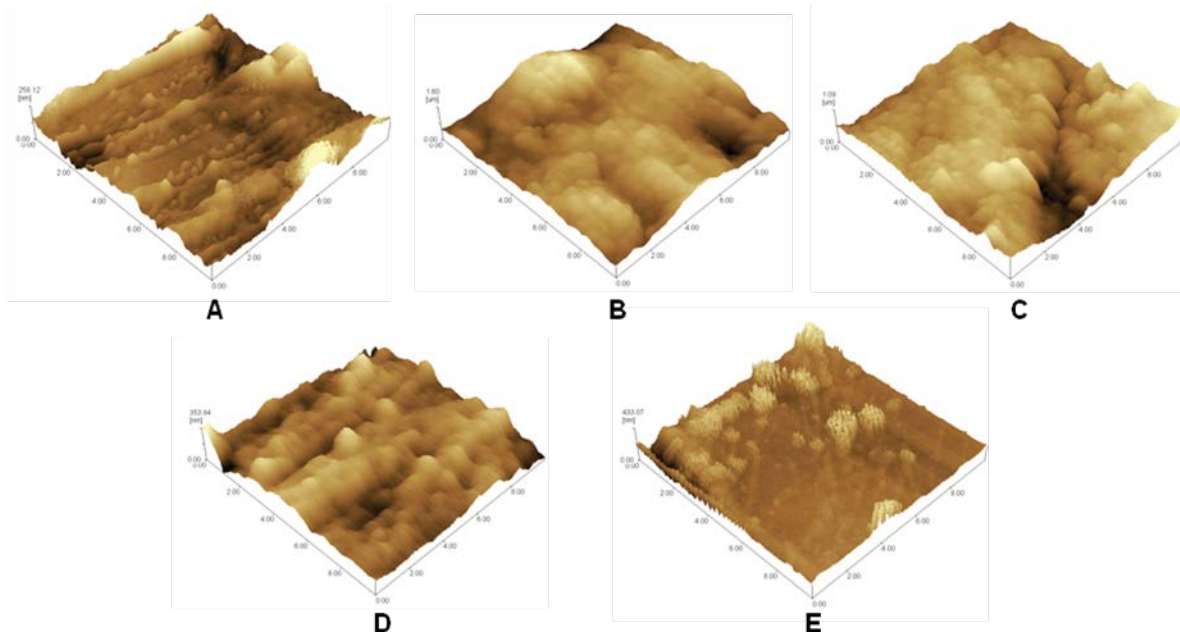


Figura 7. Imagens de topografia tridimensional obtidas por Microscopia de Força Atômica dos materiais confeccionados em porcelana feldspática (A); resina acrílica ativada quimicamente (B); resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (C); resina acrílica ativada termicamente (D); liga metálica de Níquel-Cromo (E). Área de varredura de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.

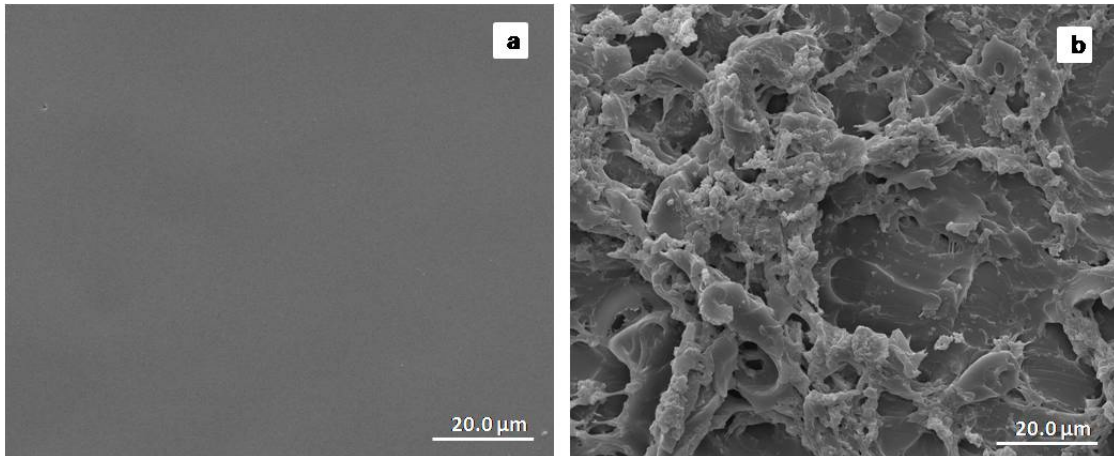


Figura 8. Análise ultraestrutural dos materiais sem aderência. A: não houve aderência do isolado CAE sobre superfície de porcelana feldspática (PF); B: não houve aderência do isolado CAD sobre superfície da resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (RAAQv).

ARTIGO 2

ADERÊNCIA *IN VITRO* DE *Candida albicans* EM DIFERENTES MATERIAIS DENTÁRIOS: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL E PADRÃO DE EXPRESSÃO DE GENES *ALS*

RESUMO

A aderência de *Candida albicans* em superfície de implantes dentários pode ser considerada um fator predisponente para infecções da cavidade bucal como mucosite peri-implantar e peri-implantite. No entanto o entendimento de sua expressão genotípica ainda é limitado. Neste estudo, foi avaliada a aderência *in vitro* e o padrão de expressão de genes *ALS* de isolados bucais de *C. albicans* em diferentes materiais dentários utilizados na confecção de próteses sobre implantes. Foram utilizados seis isolados clínicos de *C. albicans* para a avaliação da capacidade de aderência das leveduras sobre a superfície dos diferentes materiais, produção de biofilme, bem como o padrão de expressão de genes da família *ALS*. Os isolados avaliados apresentam eficiência quanto à formação de biofilme. Todos os isolados apresentaram elevado potencial de aderência aos materiais confeccionados em resina composta microhíbrida com nanopartículas e liga metálica de Níquel-Cromo, enquanto que os menores valores de aderência foram observados nos materiais em porcelana feldspática e resinas acrílicas. Foi observado um padrão complexo de expressão de genes da família *ALS* por isolados em modelo de aderência *in vitro* em diferentes materiais dentários. Considerando os isolados individualmente, os transcritos mais frequentes em células aderidas aos diferentes materiais avaliados foram dos genes *ALS1*, *ALS2*. A indução de determinados genes *ALS*, no nosso caso *ALS1* e *ALS4*, em função do material no qual o isolado estava aderido foi isolado-dependente; já a repressão de genes *ALS7* e *ALS9* parece ser dependente do material dentário,

uma vez que em determinados tipos de materiais nenhum dos seis isolados analisados produziram transcritos relacionados as adesinas Als7 e Als9. Os resultados obtidos no presente estudo confirmam o potencial de aderência e consequente formação de biofilme por *C. albicans* de origem bucal. Entretanto a variação no padrão de expressão dos genes *ALS* nos diferentes materiais testados ocorreu de forma isolado-dependente. Desta forma, nossos dados podem contribuir para o entendimento do processo da peri-implantite, corroborando com seu caráter multifatorial, sugerindo que este processo é dependente do material dentário utilizado nos implantes, bem como da capacidade do micro-organismo em desenvolver a infecção, via expressão diferenciada de genes associados a patogênese.

Palavras chave: *Candida albicans*, materiais dentários, aderência, genes *ALS*, RT-PCR.

INTRODUÇÃO

Alguns estudos têm demonstrado que tanto a qualidade quanto a quantidade de biofilmes aderidos aos implantes dentários são importantes no seu sucesso a longo prazo. A aderência inicial e a colonização por micro-organismos na superfície de implantes são consideradas a chave da patogênese das infecções microbianas (JANSSON et al., 2005; MARCACCI et al., 2008), podendo levar a complicações biológicas dos implantes, como a ocorrência de mucosite peri-implantar e a peri-implantite (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994). O papel da levedura *Candida albicans* na patogênese de lesão peri-implantar está associado a sua característica de micro-organismo oportunista (LEONHARDT et al., 2003; SHIBLI et al., 2003). Superfícies de próteses sobre implantes podem ser consideradas um reservatório potencial de re-infecção da via oral por *C. albicans*, que por sua vez leva à candidíase oral (BÜRGERS et al., 2010).

C. albicans tem sido frequentemente isolada das superfícies mucosas de indivíduos saudáveis que, no entanto, pode tornar-se patogênica quando da ocorrência de fatores predisponentes. A presença de leveduras na cavidade bucal humana adquire importância, uma vez que podem atuar como microbiota suplementar e em determinadas situações ocasionar doença bucal ou sistêmica (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; COELHO et al., 2004; WINGETER et al., 2007). Estudos recentes revelam que os implantes dentários podem ser considerados reservatórios potenciais desta espécie na cavidade bucal, que por sua vez leva a candidíase oral (BÜRGERS et al., 2010).

Um dos atributos de *C. albicans* diretamente relacionado com patogenicidade compreende a capacidade de aderência tanto em superfícies bióticas quanto abióticas. A família de genes *ALS* (*agglutinin-like sequence*) codifica glicoproteínas de superfície celular ligadas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), as quais estão envolvidas no processo de adesão (CHANDRA et al., 2001; GARCIA SANCHEZ et al., 2004). Esta família consiste de oito proteínas denominadas Als1-7 e Als9 codificadas pelos genes *ALS1-7* e *ALS9*, respectivamente. Alguns genes têm sido apontados como reguladores do processo de adesão, entre eles destaca-se os da família *ALS*, que são diferencialmente regulados por diversas condições fisiológicas, tais como alterações no meio de cultivo (HOYER et al., 1995, 1998), formato celular (HOYER; HECHT, 2000) e estágio de desenvolvimento (HOYER et al., 1998).

Várias proteínas Als apresentam função de adesinas numa variedade de condições e substratos (SHEPPARD et al., 2004; ZHAO et al., 2006). A adesão é evento fundamental no estabelecimento e desencadeamento do processo infeccioso. A colonização das mucosas garante a aproximação e o contato inicial entre a parede celular da levedura e superfície da célula do hospedeiro ou de superfícies não biológicas como a dos materiais das próteses (POLAQUINI et al., 2006).

Após a levedura aderir à superfície, outros micro-organismos podem interagir, promovendo a formação de uma comunidade microbiana plural, em que há uma dependência metabólica de grau variável entre seus constituintes, caracterizando assim a estrutura conhecida como biofilme (BARBIERE et al., 2007).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a aderência *in vitro* e padrão de expressão de genes *ALS* de isolados bucais de *C. albicans* em diferentes materiais dentários utilizados na confecção de próteses sobre implantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados de *Candida albicans*

Neste estudo foram empregados seis isolados de *C. albicans* (CA12, CA07, CAE, CAD, CA04, CAJ) obtidos da cavidade bucal de indivíduos atendidos na Clínica de Odontologia da Faculdade Ingá, Maringá – Paraná, e mantidos no estoque de leveduras do Setor de Micologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Este estudo foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da UEM sob o Parecer nº 0092-11 e todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Resolução 466/12 CNS.

Obtenção das amostras, cultura e identificação das leveduras isoladas

Amostras de saliva foram coletadas após bochecho com 10 mL de água mineral durante 30 segundos e depositadas em tubos cônicos. Posteriormente, foram centrifugadas a

3000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Alíquotas de 10 µL do sedimento foram semeadas com alça bacteriológica na superfície do meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, USA), suplementado com cloranfenicol, incubadas a 37°C por 48–72 horas para avaliação do número de unidades formadoras de colônias (UFC). Foram realizadas triagens por coloração das colônias crescidas em meio cromogênico CHROMagar®*Candida* (CHROMagar Company, Paris, France). A seguir, as leveduras foram identificadas como *C. albicans* baseando-se na micromorfologia em ágar fubá (Oxoid, Basingstok, UK) acrescido de Tween 80 a 1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); prova do tubo germinativo; assimilação e fermentação de carbono e nitrogênio segundo os métodos clássicos (KURTZMAN & FELL, 1998). A identificação de *C. albicans* foi confirmada por PCR com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos (FURLANETO et al., 2011).

Materiais testados

Foram utilizados setenta e dois corpos de prova com dimensões 7 mm x 4 mm x 3,5 mm e área total de 129,32 mm² (Figura 1). Os corpos de prova foram confeccionados nos seguintes materiais: Porcelana Feldspática (PF) (VM7, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha); resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) (JET, Clássico Artigos Odontológicos Ltda, Brasil); resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (RAAQv) (JET, Clássico Artigos Odontológicos Ltda, Brasil); resina acrílica ativada termicamente (RAAT) (VIPI CRIL, Dental Vipi Ltda, Brasil); resina composta microhíbrida com nanopartículas (RC) (4 SEASONS, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) e Liga metálica de Níquel-Cromo (Ni-Cr) (VERABOND II, AalbaDent Cordelia, USA).

Formação de biofilme

A formação de biofilme *in vitro* dos seis isolados de *C. albicans* foi avaliada pelo método descrito por Shin et al. (2002). A partir de uma cultura recente de cada isolado, em SDA a 37°C por 18–24 horas, foi preparada uma suspensão de leveduras em solução salina estéril a 0,85% (SSE), ajustadas a uma concentração de $3,7 \times 10^7$ células/mL por meio da contagem das células fúngicas em câmara hematocitométrica de Neubauer (Improved Chamber). Foram distribuídos 20 µL desta suspensão em cada poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços (Nunclon; Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark), complementando com 180 µL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) contendo 8% de glicose. Após o período de incubação da microplaca, sob agitação contínua a 70 rpm em Incubadora Shaker Refrigerada (NT712; Novatécnica, Piracicaba, Brasil) a 37°C por 24 horas, a cultura foi retirada cuidadosamente com pipeta Pasteur. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com tampão salina fosfato (pH 7.2, 0.1 M) (Sigma Chemical Co., USA) para remoção das células fracamente ou não aderidas. Foi realizada leitura da densidade óptica (D.O.) a 405 nm em leitora de microplaca (Expert plus – ASYS, UK). Os valores de D.O. obtidos representam, proporcionalmente, o número de células aderidas ao poliestireno na forma de biofilme. Os ensaios foram realizados em quadruplicata, em dias distintos.

Ensaio de aderência *in vitro* sobre diferentes materiais dentários

Preparo da suspensão de células

Para cada experimento os isolados foram cultivados em SDA a 37°C por 18–24 horas. Duas a três colônias de cada isolado foram suspensas em SSE em tubo de vidro (13×100 mm), que foi submetido à agitação em vórtex (AP56, Phoenix, Brasil). Em seguida,

foram preparadas suspensões com concentração de aproximadamente 1×10^7 células/mL por contagem em câmara de Neubauer.

Ensaio de aderência e quantificação do número de células aderidas por unidades formadoras de colônias

A aderência das células fúngicas foi determinada conforme descrito por Camacho et al. (2007a), com modificações.

Para este ensaio foram utilizados trinta e seis corpos de prova, sendo um material testado para cada isolado. Usando técnicas estritamente assépticas, os corpos de prova foram colocados em tubo eppendorf contendo 1,0 mL da suspensão previamente padronizada e incubados a 37°C por 3 horas sob agitação contínua de 120 rpm em Incubadora Shaker Refrigerada. Após incubação, 1,0 mL da suspensão de células não aderidas (plactônicas ou livres) foi transferido para outro tubo eppendorf, sendo este considerado o controle do experimento. Em seguida, os corpos de prova, que continuaram no mesmo tubo eppendorf, foram lavados três vezes com SSE para remoção das células fracamente ou não aderidas. Com auxílio de uma pinça, o corpo de prova foi transferido para outro tubo eppendorf contendo 1,0 mL de SSE e 0,5 g de pérolas de vidro (Roni Alzi, 1–2 mm de diâmetro). O tubo foi submetido à agitação vigorosa em vórtex por 30 segundos para remoção das células aderidas ao corpo de prova. 1,0 mL desta suspensão de células aderidas foi repassado para outro eppendorf e em seguida, 20 µL foi semeado em placa contendo SDA e incubada a 37°C por 24 horas. A quantificação das células aderidas foi determinada a partir da contagem do número de células viáveis e o resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mm^2 (UFC/ mm^2). Cada um dos seis materiais foi avaliado com os seis isolados em ensaios repetidos em dias distintos, os dados foram expressos em número médio (No.) de UFC/ mm^2 .

Avaliação do padrão de expressão de genes da família *ALS* (agglutinin-like sequence)

Genes de estudo e obtenção de cDNA

Os oligonucleotídeos relativos ao gene *ALS* foram os descritos por Green et al. (2004) (Tabela 1). Alíquotas de 1 mL de células não aderidas (planctônicas ou livres) e de células aderidas ao corpo de prova, resultantes do ensaio de aderência *in vitro*, foram centrifugadas a 9.000 g por 3 minutos, e os sedimentos celulares foram submetidos à extração de RNA utilizando-se o kit EZ-10 Spin Columns Total RNA Minipreps Super Kit (BIO BASIC INC, Markham, Ontario, Canada), conforme instruções do fabricante.

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, de cada amostra, previamente incubado a 65°C por 15 minutos e submetido a choque térmico em gelo por 2 minutos para desnaturação das estruturas secundárias. Posteriormente, a reação de RT-PCR foi realizada em termociclador (Esco Swift Max Pro[®], SWT-MXP-DLC-1) com uma mistura de anelamento de Oligo (dT) e RNase OUT, composta por: 0,6 µL de MgCl₂ (4 mM), 2 µL de tampão 10x, 4 µL de dNTP (200 µM), 4 µL de Oligo (dT) (0,4 µM), 0,05 µL de RNase OUT (4 U), e 0,05 µL transcriptase reversa M-ML V (0,5 U) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 8 µL de RNA molde (500 ng) e 1,3 µL de água ultrapura, totalizando 20 µL de reação. A mistura foi incubada a 42°C por 60 minutos em termociclador.

As reações de RT-PCR foram realizadas em volumes de 20 µL contendo 2 µL de cDNA molde (5 ng/µL); 1 µL de cada par primer ALS (1 µM), 1 µL de MgCl₂ (1 mM), 0,25 µM de cada desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) (Invitrogen), 0,1 µL de Taq polimerase (1 U) (Invitrogen) e com 2 µL de tampão de reação apropriado. Todas as reações foram submetidas ao seguinte programa de amplificação: 94°C por 5 minutos; 94°C

por 30 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C, por um período de 30 segundos em cada temperatura, e uma extensão adicional 72°C por 7 minutos.

Os produtos de amplificação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen) e corados com brometo de etídio. Como controle de peso molecular foi usado 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen). A fotodocumentação em gel foi realizada no Loccus Biotecnologia (LTB/2004, Programa LPIX ST, Brasil).

As reações que apresentaram ausência de amplificação ou ocorrência de amplicons em baixas concentrações foram submetidas a um segundo ciclo de amplificação, sendo empregado como molde o próprio produto de amplificação.

Aderência *in vitro* em materiais dentários por microscopia eletrônica de varredura

Para a análise ao nível ultraestrutural, empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram utilizados trinta e seis corpos de prova, sendo um material testado para cada isolado, incubados a 37°C por 12 horas em 1,0 mL da suspensão previamente padronizada ($1,0 \times 10^7$ células/mL) sob agitação contínua a 120 rpm em Incubadora Shaker Refrigerada. Em seguida, foram realizadas lavagens com SSE, para a remoção das células fracamente ou não aderidas.

As células fúngicas aderidas aos corpos de prova foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% dissolvido em tampão fosfato 0,1 mol/L a 4°C, por aproximadamente 18 horas e pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 mol/L. O material foi desidratado com série alcoólica de concentração crescente, seco ao ponto crítico (Critical Point Dryer SDC 030 - BALTEC), recoberto com uma camada de ouro (Sputter

Coater SDC 050 - BALTEC) e observado ao microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina – Paraná.

Análises estatísticas

Para avaliar possíveis diferenças na quantidade de células fúngicas aderidas aos corpos de provas e na produção de biofilme sobre superfície de poliestireno, foram empregados os testes de análise de variância One-way ANOVA e Tukey para comparações entre os diferentes materiais dentários e entre os isolados de *C. albicans*, analisadas pelo software Graph Pad Prism[®] versão 5.0 (Graph Pad Software Inc.). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Formação de biofilme por isolados de *C. albicans* obtidos da cavidade bucal

Inicialmente, os isolados de *C. albicans* foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme sobre superfície de poliestireno. Como observado na Figura 2, todos os isolados (CA12, CA07, CAE, CAD, CA04, CAJ) formaram biofilme após 24 horas de incubação.

Considerando as médias, dos quatro ensaios realizados para cada isolado, os valores da leitura em absorvância (405 nm) variaram proporcionalmente, quanto ao número de células aderidas ao poliestireno na forma de biofilme. Entre os isolados estudados observou-se que 16,7% (n=1) apresentou média da absorvância de 0,679 nm revelando alta capacidade de formar biofilme; 50% (n=3) a média variou de 0,134 a 0,257 nm e 33,3% (n=02) apresentou variação entre 0,049 a 0,051 nm evidenciando os menores valores de produção de biofilme.

Observou-se diferenças significativas entre os isolados CA12 e CAE; CA07 e CAE; CAD e CA04 ($p < 0,05$), e CAE e CA04 ($p < 0,01$), sendo que estes apresentaram potencial de formação de biofilme significativamente inferior ao do isolado CAJ. Este isolado apresentou os maiores valores de formação de biofilme sobre poliestireno ($p < 0,001$) nas condições testadas. Não foi observada diferença significativa na produção de biofilme entre os isolados CA12 e CA07; CAE e CAD ($p > 0,05$) (Figura 2).

A aderência microbiana é uma característica importante na fisiopatogenia de várias doenças infecciosas como a candidíase oral e peri-implantite, sendo esta doença bucal instalada a partir da formação do biofilme que é uma comunidade microbiana séssil, composta por células fortemente aderidas a um substrato ou umas as outras, e embebidas em uma matriz polimérica extracelular, secretada pelas próprias células (revisado por DOLAN; COSTERTON, 2002; PYE et al., 2009; LI et al., 2012). A metodologia de formação de biofilme empregada neste estudo é de fácil execução e alta reprodutibilidade. Também é indicada para estudos comparativos, considerando que a leitura é realizada em 24 horas, em que a capacidade de aderência é irreversível. O estágio final do desenvolvimento do biofilme é a maturação, quando ocorre menor crescimento das leveduras e elevado crescimento das hifas. Nesta fase ocorre o envolvimento do biofilme pela matriz polimérica extracelular, que em sua composição inclui: carboidratos, proteínas, fósforo, glicose e hexosaminas (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006).

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada na cavidade bucal humana (COELHO et al., 2004; WINGETER et al., 2007). Segundo Ramage (2002), ocorre em 10 a 50% dos indivíduos saudáveis. Estes dados ajudam a reforçar a escolha dos isolados do presente estudo que também são de indivíduos saudáveis.

Neste estudo, os isolados apresentaram eficiência quanto à formação de biofilme sobre poliestireno, dados estes compatíveis aos observados por outros autores (SHIN et al.,

2002; LI et al., 2003) que relataram alta frequência na formação de biofilme entre as leveduras isoladas da cavidade bucal. Essa característica poderia justificar a alta frequência de *C. albicans* tanto em colonização da cavidade bucal (COELHO et al., 2004; WINGETER et al., 2007) quanto relacionada à etiologia de candidíase oral e peri-implantite (ALBREKTSSON; ISIDOR, 1994; COELHO et al., 2004; BÜRGERS et al., 2010) ou sistêmica (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Aderência *in vitro* em materiais dentários: quantificação e ultraestrutura

A figura 3 mostra os dados relativos a quantificação de células aderidas nos diferentes materiais dentários, expressa em termos de UFC/mm². Todos os isolados foram capazes de aderir aos materiais testados, exceto os isolados CAE e CAD que não aderiram aos materiais PF e RAAQv, respectivamente.

No geral, os menores valores de células aderidas foram observados para os isolados CA07 e CAE em quatro materiais (PF, RAAQ, RAAQv e RAAT) dos seis testados, No.= 956,93 e 966,59 UFC/mm², respectivamente (p>0,05). Enquanto o isolado CA04 foi o que apresentou os maiores valores de células aderidas, nos mesmos materiais testados (No.= 2.281,16 UFC/mm²), exceto em RAAT (p<0,05).

Análise comparativa entre os isolados revelou maior capacidade de aderência do isolado CA04 aos materiais PF, RAAQ e RAAQv; o isolado CAD foi o que mais aderiu ao material RAAT e o CAJ foi o isolado com maior potencial de adesão aos materiais RC e Ni-Cr (Figura 3), (p<0,001). Ilustrando estes resultados, a figura 4 mostra o perfil de adesão e de diferenciação celular ao nível ultraestrutural dos isolados que apresentaram maiores eficiências de adesão nos seis materiais testados após 12 horas de incubação.

Todos os isolados analisados apresentaram maior adesão (No. de células aderidas/mm²) sobre os materiais confeccionados em RC e Ni-Cr, estes dados são ilustrados nas figuras 5 e 6. No entanto, os isolados CA04 e CAJ foram os únicos que apresentaram o maior número de células aderidas sobre o material Ni-Cr (8.900,62 e 9.665,94 UFC/mm², respectivamente) ($p < 0,001$) e diferenciação celular em formas filamentosas como mostrado na figura 6.

A análise por MEV evidenciou diferenças entre os isolados quanto ao formato celular (Figuras 4, 5 e 6). Neste estudo, o isolado CA04 foi escolhido para a avaliação do perfil de aderência e diferenciação celular ao nível ultraestrutural, por apresentar uma quantidade de células aderidas superior a dos demais isolados sobre os diferentes materiais testados. Nos materiais PF, RAAQ, RAAQv foram verificados blastoconídeos predominantemente ovalados, além de presença de tubo germinativo (Figura 4); as mesmas formas foram observadas no material confeccionado em RC, no entanto, observa-se presença de material extracelular de aspecto granular recobrimdo as células (Figura 5). Já na figura 6, verifica-se predomínio de blastoconídeos, em menor quantidade tubos germinativos e formas filamentosas sobre a liga metálica de Ni-Cr (Figura 6).

Na figura 6 observa-se variação no perfil de aderência e diferenciação celular entre os isolados sobre a liga metálica de Ni-Cr. Células dos isolados CA12, CA07 e CAD apresentaram-se como blastoconídeos (presença abundante de blastoconídeos CAD – RAAT, Figura 4); observa-se ocorrência de aglomerados de células blastoconidiais e ligação entre as células do isolado CAE. Os isolados CA04 e CAJ apresentaram predominantemente blastoconídeos, no entanto, foi também observada diferenciação celular em tubos germinativos (CAJ – RC, Figura 4) e menor quantidades de pseudo-hifas e hifas.

Entre todos os materiais, o confeccionado em RC é o que apresenta maiores irregularidades e depressões em toda sua superfície, evidenciado por MEV, o que muito provavelmente auxilia no processo de adesão das células fúngicas. A figura 5 mostra a presença de material extracelular conectando células aderidas sobre RC. Além disso, pode-se observar abundância de material extracelular tipo floculento ou granular distribuído ao redor das células. Observa-se ainda que neste material os isolados CA04 e CAJ apresentam quantidades de células aderidas significativamente superiores aos demais isolados (6.572,84 e 8.119,39 UFC/mm², respectivamente) ($p < 0,001$), conforme figura 3.

Por meio do ensaio de aderência *in vitro* e quantificação do número de células aderidas por UFC/mm², observou-se que todos os isolados bucais de *C. albicans* foram aderentes aos materiais testados. No entanto, o potencial de aderência foi variável entre os isolados analisados. Considerando que para o ensaio foi utilizada uma suspensão inicial de 1×10^7 células/mL, dois isolados entre os seis testados (33,3%) apresentaram menores capacidades de adesão ($9,6 \times 10^2$ UFC/mm²). Este fato foi evidenciado também por meio de MEV, em que observou-se variação no padrão de aderência e diferenciação celular entre os isolados de forma isolado-dependente. Tem sido relatado que a diferenciação de células blastoconidiais de *C. albicans* em formas filamentosas está relacionada ao aumento de seu potencial de virulência (CARLISLEA et al., 2008; THOMPSON, et al., 2011).

Os ensaios de aderência e formação de biofilme foram avaliados em três tempos distintos: 3, 12 e 24 horas de incubação a 37°C, sob agitação contínua. Nosso estudo foi baseado em experimentos realizados por Camacho et al. (2007a; 2007b), que relataram que o evento inicial da aderência sobre superfície abiótica ocorre após 3 horas de incubação, 12 horas observa-se a fase mais avançada do processo de adesão, em que obtém-se a formação de microcolônias, enquanto que em 24 horas foi observada a formação de biofilme.

Devido a importância e significância da aderência, na colonização e ou infecção, estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos para quantificar e caracterizar a aderência de *C. albicans* a superfícies celulares e inanimadas (KING et al., 1980; RADFORD et al., 1998; JABRA-RIZKI et al., 2001; PANAGODA et al., 2001; SHIN et al., 2002; HE et al., 2006; BARBIERI et al., 2007; CAMACHO et al., 2007a; CAMACHO et al., 2007b; LIMA-NETO et al., 2009; SILVA et al., 2009; BÜRGERS et al., 2010; LI et al., 2012; MONTEIRO et al., 2014). A adesão de *C. albicans* à superfícies mucosas têm sido demonstrada como um importante passo no processo infeccioso, particularmente na cavidade oral e mucosa vaginal (JABRA-RIZKI et al., 2001; CONSOLARO et al., 2004; TOTTI et al., 2004; TAGUTI et al., 2005; HARRIOTT et al., 2010).

Embora seja difícil distinguir a contribuição das diferentes morfologias de *C. albicans* na expressão de genes, existem estudos que revelam que *C. albicans* na forma de hifas tem capacidade de escapar às células fagocíticas. No entanto, *C. albicans* na forma de levedura tem maior capacidade de se disseminar na corrente sanguínea, garantindo a sua sobrevivência (SUDBERY et al., 2004; BERMAN, 2006).

Padrão de expressão de genes da família ALS

Neste estudo, foi empregada a metodologia de RT-PCR para avaliar a expressão de genes da família ALS (*ALS1-7* e *ALS9*) por isolados bucais de *C. albicans* durante o ensaio de aderência *in vitro* sobre diferentes tipos de materiais dentários. Foi realizada análise qualitativa, evidenciando presença ou ausência de transcritos dos genes ALS em células aderidas e células planctônicas de *C. albicans*. No geral, a frequência de transcritos dos diferentes genes ALS variou em função do isolado avaliado bem como do tipo de material testado (Tabelas 2 e 3).

A tabela 2 traz as frequências, dadas em porcentagens, da expressão dos genes para cada isolado individualmente, tanto em células aderidas quanto em células planctônicas, levando em conta todos os materiais testados. As frequências genotípicas em células aderidas foram *ALS1* 92,0%, *ALS2* 88,9%, *ALS3* 58,0%, *ALS4* 61,0%, *ALS5* 36,0%, *ALS6* 61,0%, *ALS7* 13,9% e *ALS9* 22,2%. Já em células planctônicas foram *ALS1* 94,0%, *ALS2* 100,0%, *ALS3* 83,0%, *ALS4* 94,0%, *ALS5* 83,0%, *ALS6* 97,0%, *ALS7* 77,8% e *ALS9* 94,4%. Os transcritos foram mais frequentes em células planctônicas para todos os genes da família *ALS*. As maiores diferenças nas frequências genotípicas em células planctônicas comparativamente a células aderidas foram observadas para o gene *ALS9* seguido do gene *ALS7*. Já o gene *ALS1* ocorreu em frequências similares em células planctônicas e aderidas.

Transcritos do gene *ALS1* foram observados tanto em células aderidas quanto nas células planctônicas dos isolados CA012, CA07 e CA04 em todos os materiais testados. Para os demais isolados (CAE, CAD e CAJ) a ocorrência de transcritos foi variável em função do material testado.

Transcritos do gene *ALS2* foram observados tanto em células aderidas quanto nas células planctônicas dos isolados CA12 e CAE em todos os materiais testados. Os demais isolados apresentaram transcritos de *ALS2* em 100,0% das células planctônicas, enquanto que em células aderidas a ocorrência de transcrito foi de 83,3% para os isolados CA07 e CAJ e 66,6% para o isolado CAD.

Quanto ao gene *ALS3*, para os isolados CA12 e CA07 foram observados transcritos em 100,0% das células aderidas bem como em células planctônicas. Os demais isolados apresentaram transcritos em menor frequência nas células aderidas. Os menores valores de transcritos de *ALS3* foram observados para o isolado CAE, tanto em células aderidas (16,6%) quanto em células planctônicas (50,0%).

Para os demais genes (*ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* e *ALS9*) não foi observada expressão em 100,0% das células aderidas para nenhum dos isolados testados. Quanto aos transcritos desses genes, da mesma forma que o observado para o gene *ALS3*, os transcritos em menor frequência foram observados nas células aderidas. O isolado CAJ foi o que apresentou a menor frequência de transcritos de *ALS4* tanto em células aderidas (50,0%) quanto em células planctônicas (83,3%). Já quanto ao gene *ALS5*, as menores frequências foram observadas para o isolado CA04 (16,6% para células aderidas e 50,0% para células planctônicas).

Os genes *ALS7* e *ALS9* foram os únicos nos quais não observou-se transcritos por células aderidas. Para o isolado CA04 não foi observado transcritos em ambos genes. Para o isolado CAJ não foram observados transcritos de *ALS7* e para CAD não foram observados produtos de transcrição de *ALS9*, em todos os materiais testados.

Estes dados permitem concluir que as frequências de transcrição de genes *ALS* em células aderidas foram relativamente baixas, com exceção aos genes *ALS1* e *ALS2*, comparativamente ao observado para células planctônicas em que a maioria dos genes apresentou frequência de expressão acima de 80,0%. Além disso, os dados demonstram variabilidade entre isolados quanto a expressão de genes *ALS* nas condições testadas.

A Tabela 3 traz as frequências, dadas em porcentagens, da expressão de genes *ALS* pelos isolados levando em conta os materiais testados individualmente. Nos diferentes materiais testados, as frequências de transcrição de genes *ALS* (*ALS1-7* e *ALS9*) foram superiores em células planctônicas (não associadas aos materiais) comparativamente ao observado para células aderidas, com exceção ao material confeccionado em liga metálica de Ni-Cr, onde a frequência de transcritos do gene *ALS1* foi de 100,0% em células aderidas e 83,3% em células planctônicas. Este dado é decorrente do resultado obtido para o isolado CAJ

em que foi observado transcrito de *ALS1* somente nas células aderidas, sugerindo a sua indução por componentes do material testado (Figura 7).

A frequência de expressão de *ALS1* foi de 100,0% tanto para células aderidas quanto para planctônicas, nos materiais constituídos por PF, RAAQ e RAAT. Já os materiais confeccionados em RAAQv e RC a frequência de expressão de *ALS1* foi variável, sendo os menores valores observados no material de RAAQv.

Perfil distinto de expressão foi observado para o gene *ALS2*. Frequência de expressão de 100,0%, tanto para células aderidas quanto as planctônicas, foi observada nos materiais constituídos por PF, RAAQ, RAAT e RC. Nos materiais confeccionados em RAAQv e liga metálica de Ni-Cr não foi observado transcritos de *ALS2* em células aderidas de pelo menos um isolado (CA07 – RAAQv e CAD e CAJ – Ni-Cr) sugerindo que componentes destes materiais dentários possam inibir a transcrição deste gene nas células aderidas de forma isolado-dependente.

A expressão dos genes *ALS3*, *ALS4*, *ALS5* e *ALS6* foram variáveis nos diferentes materiais testados, tanto em células aderidas quanto em células planctônicas. Quanto aos genes *ALS3* e *ALS4*, a menor frequência de transcritos foi observada em células aderidas ao material confeccionado em liga metálica de Ni-Cr (33,3%). Nos demais materiais, as frequências mínimas de transcritos destes genes foram de 50,0%. Embora a maioria das frequências de transcrição desses genes tenham sido superiores ou iguais em células planctônicas à de células aderidas, no material constituído de RAAQv, um dos isolados (CA04) expressou *ALS4* somente nas células aderidas, sugerindo que para este isolado, o produto gênico de *ALS4* (*Als4*) pode estar relacionado com a adesão neste material, sendo induzido por componentes do mesmo (Figura 7).

As menores frequências de transcritos foram observadas para os genes *ALS5*,

ALS7 e *ALS9* em células aderidas em todos os materiais testados. Ressalta-se que nenhum transcrito de *ALS7* foi observado em células aderidas a quatro dos seis materiais testados (RAAQ, RAAQv, RAAT e RC). Já quanto ao gene *ALS9* não foi observado transcritos por células aderidas aos materiais RAAQ e RAAQv (Tabela 4). Estes dados sugerem que a interação das células fúngicas com estes materiais resultou na inibição desses genes ao nível transcricional, sendo esta uma característica comum a todos os isolados testados.

Considerando os isolados individualmente, os transcritos mais frequentes em células aderidas aos diferentes materiais testados foram dos genes *ALS1*, *ALS2*; já considerando os materiais individualmente, a frequência de transcritos obtidos por células aderidas dos diferentes genes *ALS*, foi mais variável em função do material. No entanto, nos seis materiais testados, observou-se que o isolado CA04 expressou os genes *ALS1*, *ALS2* por células aderidas, sugerindo que estes genes podem estar relacionados com a aderência aos materiais estudados. Estes dados estão correlacionados aos maiores valores de células aderidas, expresso em UFC/mm², obtidos pelo ensaio de aderência *in vitro* bem como ao perfil ultraestrutural de células na superfície dos materiais testados.

As menores frequências de transcritos, observadas para os genes *ALS6*, *ALS7* e *ALS9* em células aderidas nos materiais dentários, concordam com o relatado por Green (2004), que também observou menor expressão de *ALS6* e *ALS7* em células de biofilme sobre prótese acrílica.

Não foram verificados transcritos dos genes *ALS7* e *ALS9* em células aderidas de nenhum dos seis isolados testados, em dois materiais testados RAAQ e RAAQv, simultaneamente (Tabela 4). Segundo GROOT et al. (2013), a expressão destes genes tem sido avaliada em superfícies abióticas como vidro e plástico, semelhantemente ao presente

estudo, uma vez que as resinas testadas são quimicamente classificadas como materiais plásticos e a porcelana avaliada como vidro.

Apesar dos grupos representados por RAAQ e RAAQv serem formados pelo mesmo material com alteração somente no modo de polimerização, a RAAQ é polimerizada nas condições do ar atmosférico e a RAAQv é polimerizada à vácuo (CAMACHO et al., 2014). Por meio de MEV foi evidenciado que a superfície do material polimerizado à vácuo é mais irregular comparativamente ao do material RAAQ, embora não tenha havido variação no número de células aderidas nestes materiais.

O envolvimento de alguns genes no processo de adesão, formação e desenvolvimento de biofilme parece estar bem estabelecido (RAMAGE et al., 2004; NOBILE; MITCHELL, 2006). Entre os vários grupos de genes envolvidos neste fenótipo, constatou-se que os da família *ALS* presentes em *C. albicans* e espécies relacionadas desempenham papel chave neste processo, por codificar proteínas com características de glicoproteínas de adesão à superfície da célula (HOYER; PAYNE; HECHT, 1998; HOYER et al., 1998). Já foi demonstrado que genes *ALS* apresentam expressão aumentada durante a formação de biofilme (CHANDRA et al., 2001; GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; GREEN et al., 2004; O'CONNOR et al., 2005).

Em *C. albicans*, as adesinas conferidas pelos genes *ALS* são responsáveis pela aderência da levedura a superfícies abióticas e células do hospedeiro (GARCIA et al., 2011). Vários modelos de infecção revelaram que a expressão dos genes *ALS* é sítio dependente indicando funções proteína-específicas. Por exemplo, segundo a literatura, adesina Als3 desempenha papel importante na adesão de células do epitélio bucal, sendo também associada a dano epitelial subsequente e indução de citocinas epiteliais (MURCIANO et al., 2012). A expressão do gene *ALS3* é regulada durante a infecção *in vitro* de células do epitélio bucal

(NAGLIK et al., 2011; WÄCHTLER et al., 2011). Já a participação das adesinas Als1, Als2 e Als5 na patogênese de *C. albicans* foi demonstrada empregando-se modelos de infecção em camundongos e epitélio bucal humano reconstituído (ALBERTI-SEGUI et al., 2004; ZHAO et al., 2004; ZHAO et al., 2005; ZHAO et al., 2006). Em outros estudos, o papel do produto do gene *ALS1* na aderência das *C. albicans* às células humanas, Fu et al. (1998; 2008) constataram que o gene *ALS1* codifica uma proteína de superfície celular responsável pela aderência as células endoteliais e epiteliais.

No geral, os dados obtidos nesta pesquisa demonstram um padrão complexo de expressão de genes da família *ALS* por isolados bucais de *C. albicans* em modelo de aderência *in vitro* em diferentes materiais dentários utilizados nas próteses sobre implantes. A indução de determinados genes *ALS*, no nosso caso *ALS1* e *ALS4*, em função do material no qual o isolado estava aderido foi isolado-dependente; já a repressão de genes *ALS7* e *ALS9* parece ser dependente do material testado, uma vez que em determinados tipos de materiais nenhum dos seis isolados analisados produziram transcritos relacionados as adesinas Als7 e Als9.

Os resultados obtidos no presente estudo confirmam o potencial de aderência e consequente formação de biofilme por *C. albicans* de origem bucal. Entretanto a variação no padrão de expressão dos genes *ALS* nos diferentes materiais testados ocorreu de forma isolado-dependente. Desta forma, nossos dados podem contribuir para o entendimento do processo da peri-implantite, corroborando com seu caráter multifatorial, sugerindo que este processo é dependente do material testado utilizado nos implantes, bem como da capacidade do micro-organismo em desenvolver a infecção, via expressão diferenciada de genes associados a patogênese.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)–Brasil. D.P.C. foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, T.; ISIDOR, F. Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology. **Quintessence Publishing**, p. 365–369, 1994.

ALBERTI-SEGUI, C.; MORALES, A. J.; XING, H.; KESSLER, M. M.; WILLINS, D. A.; WEINSTOCK, K. G.; COTTAREL, G.; FECHTEL, K.; ROGERS, B. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. **Yeast**, v. 21, p. 285–302, 2004.

BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 397-403, 2000.

BARBIERI, D. S. V.; VICENTE V. A.; FRAIZ F. C.; LAVORANTI O. J.; SVIDZINSKI, T. I. E.; LAMEIRA R. P. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 624–631, 2007.

BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 595–601, 2006.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 588–594, 2006.

BÜRGERS, R.; HAHNEL, S.; REICHERT, T. E.; ROSENTRITT, M.; BEHR, M.; GERLACH, T.; HANDEL, G.; GOSAU, M. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 2307–2313, 2010.

CAMACHO, D. P.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Chlorhexidine and gentian violet effect on the adherence of *Candida* sp to urinary catheters. **Mycopathologia**, v. 163, p. 261–266, 2007a.

CAMACHO, D. P.; CONSOLARO, M. E. L.; PATUSSI, E. V.; DONATTI, L.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). **Contraception**, v.76, p. 439–443, 2007b.

CAMACHO, D. P.; SVIDZINSK, T. I. E.; FURLANETO, M. C.; LOPES, M. B.; CORRÊA, G. O. Resinas acrílicas de uso odontológico à base de polimetilmetacrilato. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 6, n. 3, p.63–72, 2014.

CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K.; HOYER, L. L.; McCORMICK, T.; GHANNOUM, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug Resistance **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5385–5394, 2001.

CARLISLEA, P. L.; BANERJEEA, M.; LAZZELLB, A.; MONTEAGUDOC, C.; LÓPEZ-RIBOTB, J. L.; KADOSHA, D. Expression levels of a filament-specific transcriptional regulator are sufficient to determine *Candida albicans* morphology and virulence. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 106, p. 599 – 604, 2008.

CONSOLARO, M. E. L.; ALBERTONI, T. A.; YOSHIDA, C. S.; MAZUCHELI, J.; PERALTA, R. M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 202–205, 2004.

COELHO CM, SOUSA YT, DARE AM. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil* 31(2):135–139, 2004.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p.599–607, 2003.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.167–193, 2002.

DOYLE, R. J.; ROSEMBERG, M. Microbial cell surface hydrophobicity. **Washington, American Society for Microbiology**, p. 8–22, 1990.

FU, Y.; RIEG, G.; FONZI, W. A.; BELANGER, P. H.; EDWARDS, J. E.; FILLER, S. G. Expression of the *Candida albicans* gene *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1783–1786, 1998.

FU, Y.; LUO, G.; SPELLBERG, B. J.; EDWARDS, J. E.; IBRAHIM, A. S.; Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, p. 483–492, 2008.

FURLANETO, M. C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M. T.; SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 595–599, 2011.

GARCIA, M. C.; LEE, J. T.; RAMSOOK, C. B.; ALSTEENS, D.; DUFRÊNE, Y. F.; LIPKE, P. N. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. **PLoS One**, v. 6, p.17632, 2011.

GARCIA-SANCHEZ, S.; AUBERT, S.; IRAQUI, I.; JANBON, G.; GHIGO, J. M.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. **Eukaryot Cell**, v. 3, p.536–545, 2004.

GREEN, C. B.; CHENG, G.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P.; GHANNOUM, M. A.; HOYER, L. L. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms **Microbiology**, v. 150, p. 267–275, 2004.

GREEN, C. B.; ZHAO, X.; YEATER, K. M.; HOYER, L. L. Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. **Microbiology**, v. 151, p. 1051–1060, 2005.

GROOT, P. W. J.; BADER, O.; BOER, A. D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. Adhesins in Human Fungal Pathogens: Glue with Plenty of Stick. **Eukaryotic Cell**, p. 470–481, 2013.

HARRIOTT, M. M.; LILLY, E. A. RODRIGUEZ, T. E.; FIDEL, JR P.L. NOVERR, M. C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, p. 3635–3644, 2010.

HE, X. Y.; MEURMAN, J. H.;KARI, K.; RAUTEMAA, R.; SAMARANAYAKE, L. P. In vitro adhesion of *Candida* species to denture base materials. **Mycoses**, v. 49, p.80–84, 2006.

HOYER, L. L.; SCHERER, S.; SHATZMAN, A. R.; LIVI, G. P. *Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif. **Molecular Microbiology**, v.15, p. 39–54, 1995.

HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; BELL, M.; MYERS, A. M.; SCHERER. S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. **Current Genetics**, v. 33, p. 451–459, 1998.

HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; HECHT, J. E. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of Als proteins to the fungal cell surface. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5334–5343, 1998.

HOYER, L. L.; HECHT, J. E. The ALS6 and ALS7 genes of *Candida albicans*. **Yeast**, v.16, p. 847–855, 2000.

JABRA-RIZKI, M. A.; FALKER, W. A.; MERZ, W. G.; BAQUI, A. A. M. A.; KELLEY, J. I.; MEILLER, T. F. Cell surface hydrophobicity - associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 17–22, 2001.

JANSSON, H. et al. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 7, p. 51-9, 2005.

KING, R. D.; LEE, J. C.; MORRIS, A. L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 27, n. 2, p. 667-674, 1980.

KURTZMAN, C. P.; FELL, F. W. The yeast. A taxonomia study. **Amsterdam: Elsevier, Inc.** p.891–913, 1998.

LEONHARDT, A.; BERGSTROM, C.; LEKHOLM, U. Microbiologic diagnostics at titanium implants. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, v. 5 p. 226–232, 2003.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, p. 353–362, 2003.

LI, J.; HIROTA K.; GOTO, T.; YUMOTO, H.; MIYAKE, Y.; ICHIKAWA, T. Biofilm formation of *Candida albicans* on implant overdenture materials and its removal. **Journal of Dentistry**, v. 40, p. 686–692, 2012.

LIMA-NETO, R. G.; BELTRA, E. I. C.; OLIVEIRA, P. C.; NEVES, R. P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, p. 23–29, 2009.

MARCACCI, S. Aderência de *Candida albicans* em ligas de titânio e cromo-cobalto, com diferentes desgastes. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 5, p. 7-12, 2008.

MONTEIRO, D. R.; NEGRI, M.; SILVA, S.; GORUP, L. F.; CAMARGO, E. R.; OLIVEIRA, R.; BARBOSA, D. B.; HENRIQUES M. Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 410–412, 2014.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1382–91, 2006.

O'CONNOR, L.; LAHIFF, S.; CASEY, F.; GLENNON, M.; CORMICAN, M.; MAHER, M. Quantification of *ALS1* gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 3, p. 153–62, 2005.

PYE, A. D.; LOCKHART, D. E. A.; DAWSON, M. P.; MURRAY, C. A.; SMITH, A. J. A review of dental implants and infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, p. 104–110, 2009.

POLAQUINI, S. R. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 482–490, 2006.

RAMAGE, G. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnezol, a quorum-sensing molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, n. 11, p. 5459–5463, 2002.

RAMAGE, G.; TOMSETT, K.; WICKES, B. L.; LOPEZ RIBOT, J. L.; REDDING, S. W. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 98, n. 1, p. 53–59, 2004.

RADFORD, D. R.; SWEET, S. P.; CHALLACOMBE, S. J.; WALTER, J. D. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. **Journal of Dentistry**, v. 26, p. 577–583, 1998.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D.; AZEREDO, J. Biofilms of non- *Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681–689, 2009.

SHEPPARD, D. C.; YEAMAN, M. R.; WELCH, W. H.; PHAN, Q. T.; FU, Y.; IBRAHIM, A. S.; FILLER, S. G.; ZHANG, M.; WARING, A. J.; EDWARDS, J. E.; Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.30480–30489, 2004.

SHIBLI, J. A.; MARTINS, M. C.; LOTUFO, R. F.; MARCANTONIO, JR. E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.18, p. 383–90, 2003.

SHIN, J.H.; KEE, S.J.; SHIN, M.G.; KIM, S.H.; SHIN, D.H.; LEE, S.K.; SUH, S.P.; RYANG, D.W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1244–1256, 2002.

SUDBERY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 317–324, 2004.

TAGUTI, I. R. I. E.; CONSOLARO, M. E. L.; GUEDES, T. A.; DONATTI, L.; PATUSSI, E. V.; SVIDZINSKI, T. I. E. A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, p. 195–203, 2006.

TOTTI, M. A. G.; SANTOS, E. B.; ALMEIDA, O. P.; KOGA-ITO, C. Y.; JORGE, A. O. C. Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n.3, p. 202–207, 2004.

THOMPSON, D. L.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species **Eukaryotic Cell**, v.10, p.1173 – 1182, 2011.

WÄCHTLER, B.; WILSON, D.; HAEDICKE, K.; DALLE, F.; HUBE, B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. **PLoS One**, v. 6, p. 170–146, 2011.

WINGETER, M. A. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 272-276, 2007.

ZHAO, X.; OH, S. H.; CHENG, G.; GREEN, C. B.; NUESSEN, J. A.; YEATER, K.; LENG, R. P.; BROWN A. J.; HOYER L. L. *ALS3* and *ALS8* represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, 150:2415–2428, 2004.

ZHAO X, OH SH, YEATER KM, HOYER LL. Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the *Als* family. **Microbiology** 151:1619–1630, 2005.

ZHAO, X., DANIELS, K.J., OH, S.H., GREEN, C.B., YEATER, K.M., SOLL, D.R., HOYER, L.L. *Candida albicans* Als3p is required for wild type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. **Microbiology**, 152:2287–2299, 2006.

Tabela 1. Oligonucleotídeos que foram empregados nas análises da expressão dos genes *ALS* de *Candida albicans*

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Produto PCR tamanho (pb)
<i>ALS1</i>	RTALS1F	GAC TAG TGA ACC AAC AAA TAC CAG A	318
	RTALS1R	CCA GAA GAA ACA GCA GGT GA	
<i>ALS2</i>	RTALS2F	CCA AGT ATT AAC AAA GTT TCA ATC ACT TAT	366
	RTALS2R	TCT CAA TCT TAA ATT GAA CGG CTT AC	
<i>ALS3</i>	RTALS3F	CCA CTT CAC AAT CCC CAT C	342
	RTALS3R	CAG CAG TAG TAG TAA CAG TAG TAG TTT CAT C	
<i>ALS4</i>	RTALS4F	CCC AGT CTT TCA CAA GCA GTA AAT	356
	RTALS4R	GTA AAT GAG TCA TCA ACA GAA GCC	
<i>ALS5</i>	RTALS5F ALT	TGA CTA CTT CCA GAT TTA TGC CGA G	318
	RTALS5R ALT	ATT GAT ACT GGT TAT TAT CTG AGG GAG AAA	
<i>ALS6</i>	RTALS6F	GAC TCC ACA ATC ATC TAG TAG CTT GGT TT	152
	RTALS6R2	CAA TTG TCA CAT CAT CTT TTG TTG C	
<i>ALS7</i>	RTALS7F	GAA GAG AAC TAG CGT TTG GTC TAG TTG T	206
	RTALS7R2	TGG CAT ACT CCA ATC ATT TAT TTC A	
<i>ALS9</i>	RTALS9F2	CCA TAT TCA GAA ACA AAG GGT TC	198
	RTALS9R2	AAC TGA AAC TGC TGG ATT TGG	

Tabela 2. Porcentagem da expressão dos genes *ALS* por isolados de *Candida albicans*

Isolado	<i>ALS1</i>	<i>ALS2</i>	<i>ALS3</i>	<i>ALS4</i>	<i>ALS5</i>	<i>ALS6</i>	<i>ALS7</i>	<i>ALS9</i>
	No. total (%)							
CA12								
A	100,0	100,0	100,0	83,3	66,6	83,3	33,3	66,6
P	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0
CA07								
A	100,0	83,3	100,0	50,0	66,6	33,3	16,6	33,3
P	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
CAE								
A	83,3	100,0	16,6	50,0	16,6	33,3	16,6	16,6
P	83,3	100,0	50,0	100,0	83,3	83,3	66,6	66,6
CAD								
A	66,6	66,6	16,6	66,6	16,6	66,6	16,6	0,0
P	100,0	100,0	66,6	100,0	66,6	100,0	83,3	100,0
CA04								
A	100,0	100,0	50,0	66,6	16,6	66,6	0,0	0,0
P	100,0	100,0	100,0	83,3	50,0	100,0	66,6	100,0
CAJ								
A	100,0	83,3	66,6	50,0	33,3	83,3	0,0	16,6
P	83,3	100,0	83,3	83,3	100,0	100,0	66,6	100,0

A: células aderidas aos materiais testados; P: células planctônicas ou livres.

Tabela 3. Porcentagem da expressão dos genes *ALS* por isolados de *Candida albicans* e entre os diferentes materiais testados

Material	<i>ALS1</i>	<i>ALS2</i>	<i>ALS3</i>	<i>ALS4</i>	<i>ALS5</i>	<i>ALS6</i>	<i>ALS7</i>	<i>ALS9</i>
	No. total (%)							
PF								
A	100,0	100,0	50,0	66,6	33,3	83,3	50,0	50,0
P	100,0	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0	83,3	100,0
RAAQ								
A	100,0	100,0	66,6	50,0	33,3	50,0	0,0	0,0
P	100,0	100,0	83,3	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3
RAAQv								
A	66,6	66,6	66,6	66,6	33,3	50,0	0,0	0,0
P	83,3	83,3	100,0	83,3	83,3	100,0	100,0	83,3
RAAT								
A	100,0	100,0	66,6	83,3	50,0	83,3	0,0	16,6
P	100,0	100,0	83,3	100,0	100,0	100,0	66,6	100,0
RC								
A	83,3	100,0	66,6	66,6	33,3	50,0	0,0	33,3
P	100,0	100,0	66,6	100,0	66,6	83,3	50,0	100,0
Ni-Cr								
A	100,0	66,6	33,3	33,3	33,3%	50,0	33,3	33,3
P	83,3	100,0	66,6	83,3	83,3%	100,0	66,6	100,0

PF: Porcelana Feldspática (VM7, Vita Zahnfabrik, Bad Sackingen, Alemanha); RAAQ: resina acrílica ativada quimicamente (JET, Clássico Artigos Odontológicos Ltda, Brasil); RAAQv: resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (JET, Clássico Artigos Odontológicos Ltda, Brasil); RAAT: resina acrílica ativada termicamente (VIPI CRIL, Dental Vipi Ltda, Brasil); RC: resina composta microhíbrida com nanopartículas (4 SEASONS, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) e Ni-Cr: Liga metálica de Níquel-Cromo (VERABOND II, AalbaDent Cordelia, USA).

A: células aderidas aos materiais testados; P: células planctônicas ou livres.

Tabela 4. Padrão da expressão dos genes *ALS7* e *ALS9* em células aderidas e células planctônicas, por isolados de *Candida albicans*

Material	Isolado	Célula fúngica	<i>ALS7</i>	<i>ALS9</i>	
RAAQ	CA07	Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
	CA12	Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
	CA04	Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
	CAE	Aderida	–	–	
		Planctônica	+	–	
	CAD	Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
	CAJ	Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
	RAAQv	CA07	Aderida	–	–
			Planctônica	+	+
CA12		Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
CA04		Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
CAE		Aderida	–	–	
		Planctônica	+	–	
CAD		Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	
CAJ		Aderida	–	–	
		Planctônica	+	+	

RAAQ: resina acrílica ativada quimicamente; RAAQv: resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo.

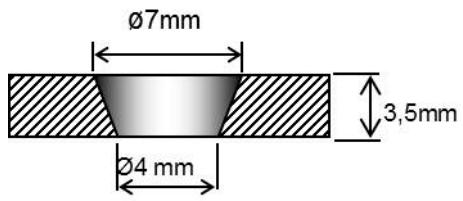


Figura 1. Desenho esquemático dos corpos de prova confeccionados em seis tipos de materiais.

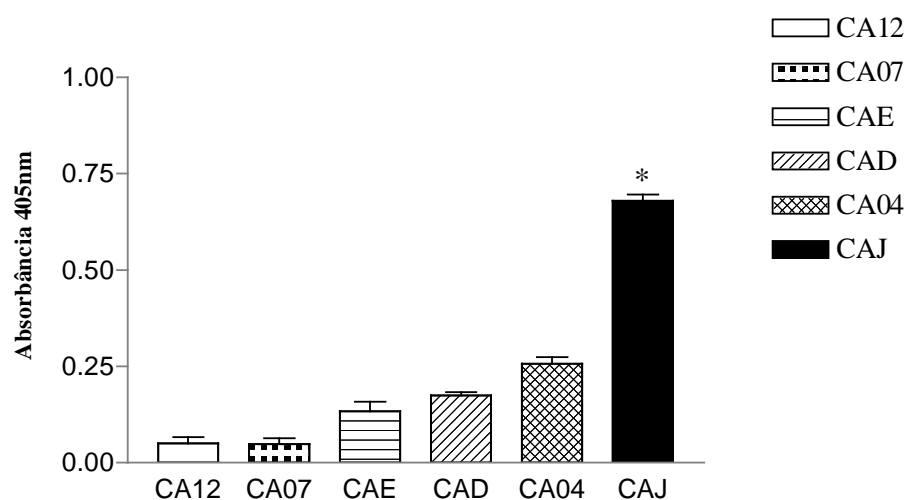


Figura 2. Formação de biofilme sobre superfície de poliestireno por isolados de *Candida albicans* obtido através da leitura em absorbância a 405 nm em leitora de microplaca, após 24 horas de incubação. As barras de erro indicam o desvio padrão por ensaio em quadruplicata. *Diferença estatisticamente significativa entre os isolados ($p < 0,001$).

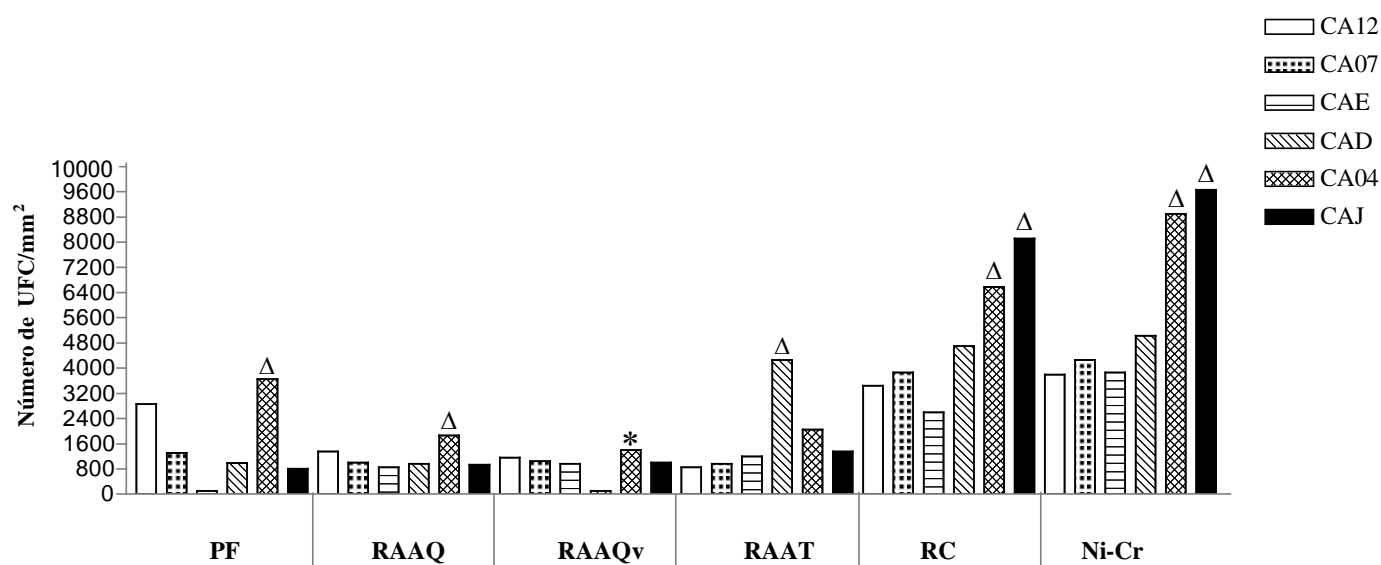


Figura 3. Número de células aderidas, expressos em UFC/mm², nos materiais testados por ensaios de aderência *in vitro* dos seis isolados de *Candida albicans*, após 3 horas de incubação. ^ΔDiferenças significativas (p<0,001) quando comparamos a aderência entre os isolados. *As diferenças são estatisticamente significativas entre os isolados sobre resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (p<0,05).

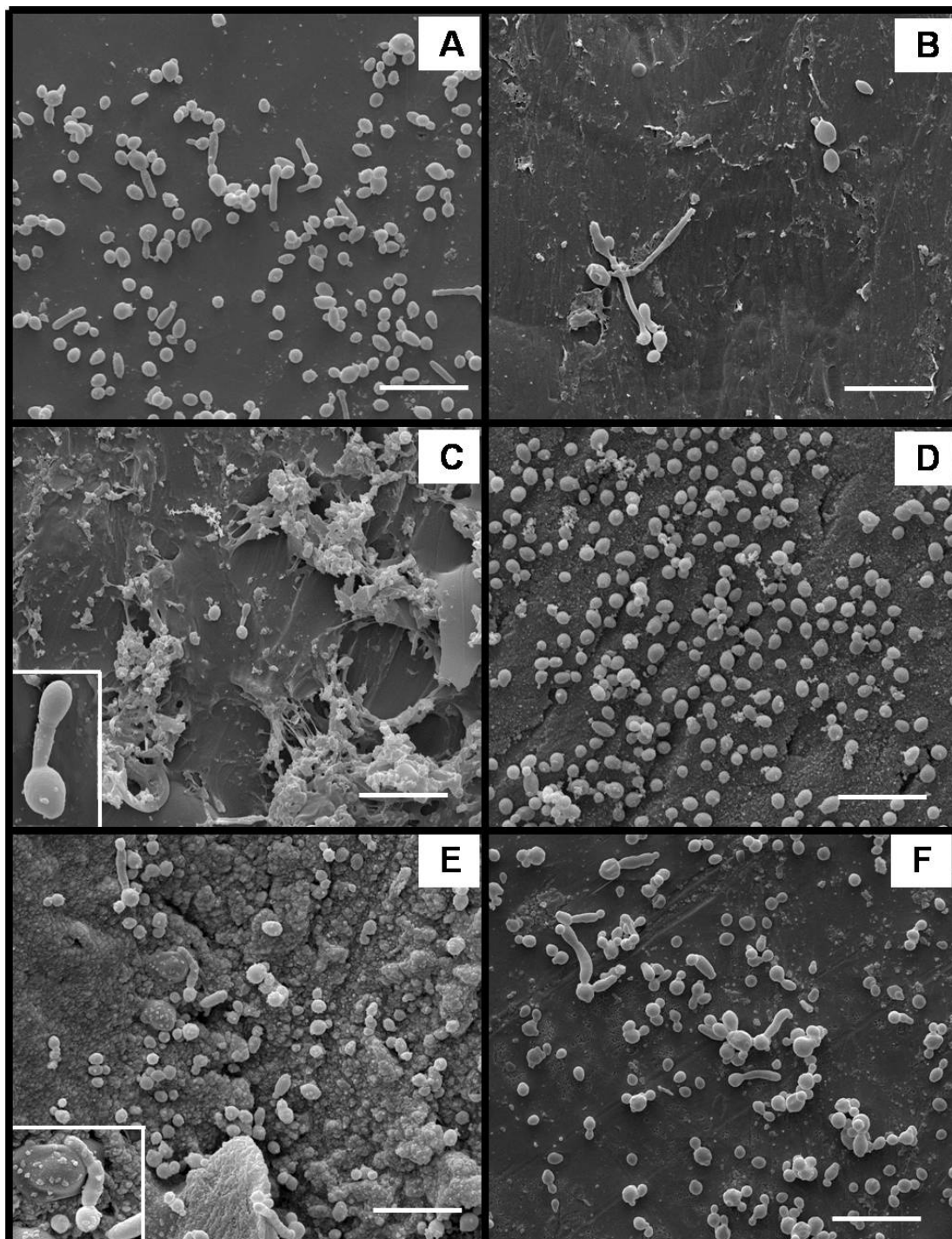


Figura 4. Análise ultraestrutural de células de *Candida albicans* aderidas nos diferentes materiais dentários após incubação por 12 horas. (A) Isolado CA04 aderido sobre porcelana feldspática, (B) isolado CA04 aderido sobre resina acrílica ativada quimicamente, (C) isolado CA04 aderido sobre resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo, (D) isolado CAD aderido sobre resina acrílica ativada termicamente, (E) isolado CAJ aderido sobre resina composta microhíbrida com nanopartículas e (F) isolado CAJ aderido sobre liga metálica de Níquel-Cromo. As barras representam 20 μ m.

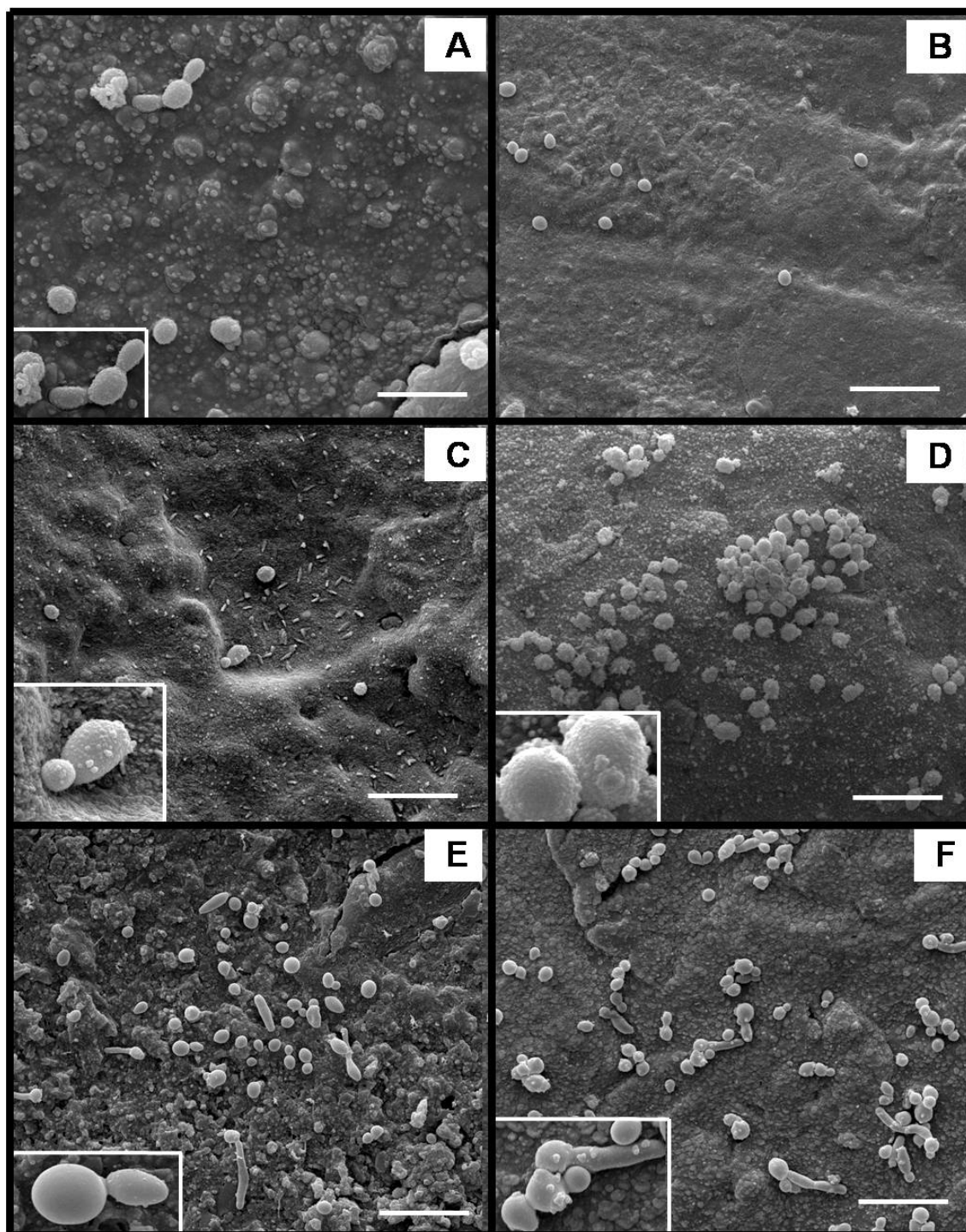


Figura 5. Análise ultraestrutural de isolados de *Candida albicans* aderidos sobre a resina composta microhíbrida com nanopartículas, após incubação de 12 horas. (A) isolado CA12, (B) isolado CA07, (C) isolado CAE, (D) isolado CAD, (E) isolado CA04 e (F) CAJ. Observa-se matriz extracelular granular (insertes). As barras representam 20µm.

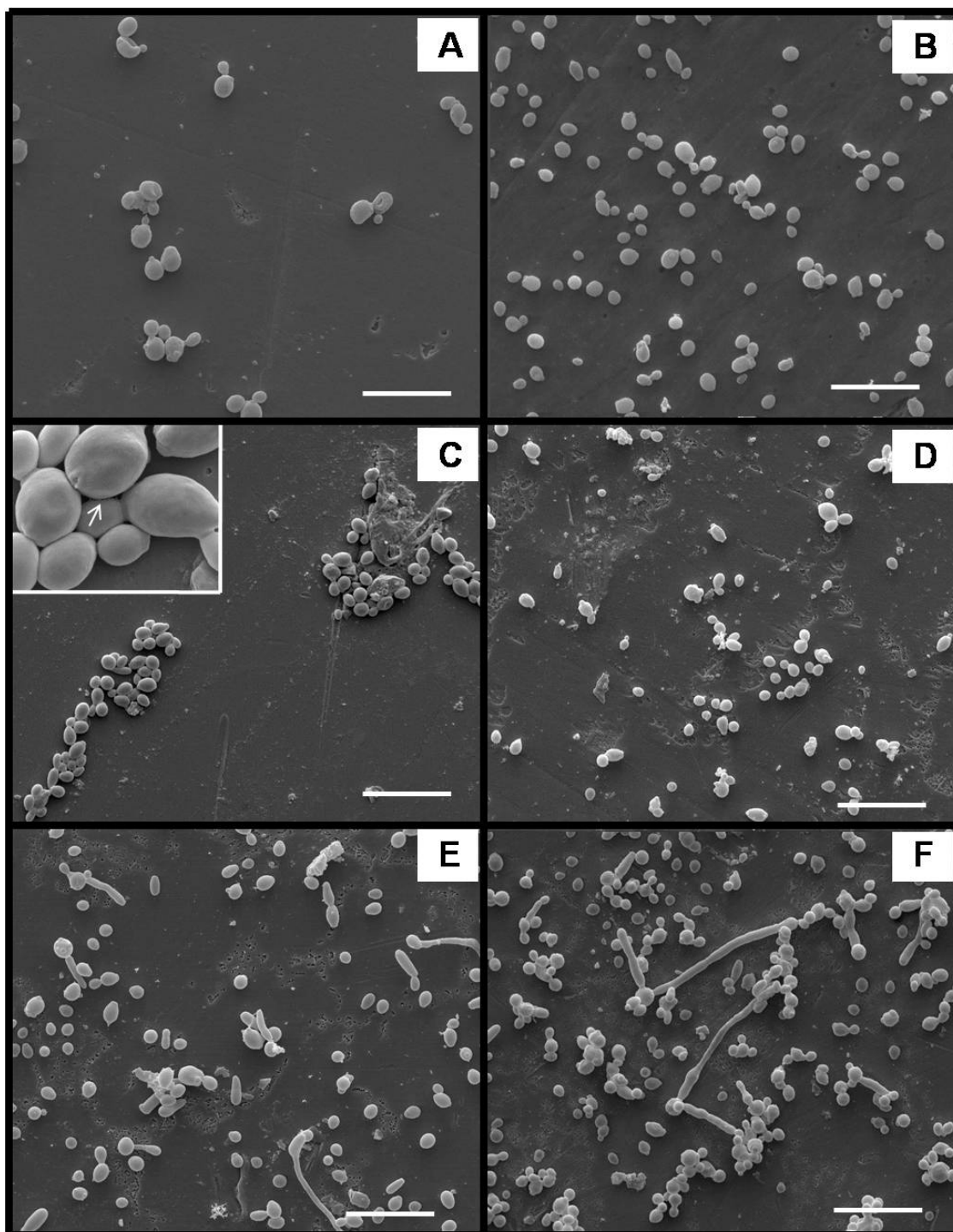


Figura 6. Variação no padrão de aderência e diferenciação celular dos isolados de *Candida albicans* sobre a liga metálica de Níquel-Cromo. Blastoconídeos dos isolados CA12 (A), CA07 (B), CAD (D); blastoconídeos aderidos em grumos e ligação entre as leveduras (seta), representado pelo isolado CAE (C) e formas filamentosas observadas nos isolados CA04 (E) e CAJ (F). As barras representam 20 μ m.

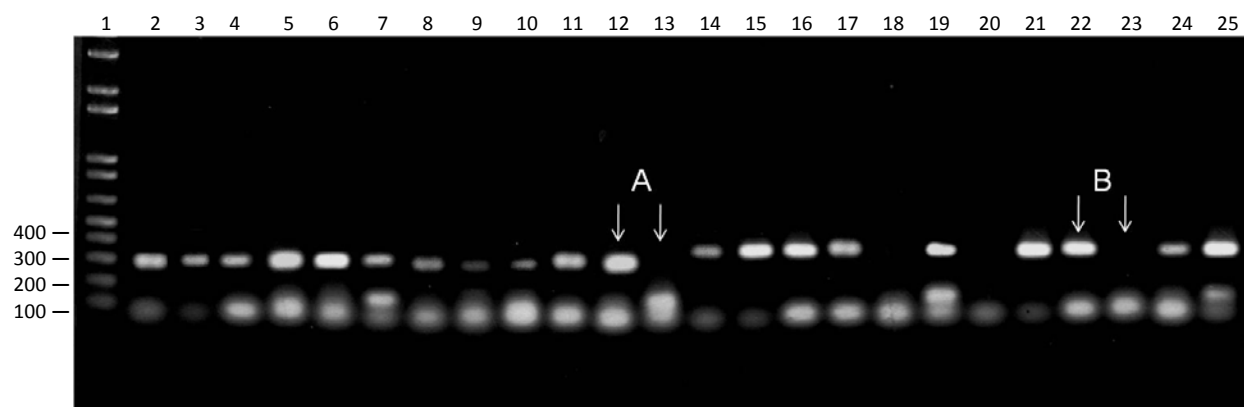


Figura 7. Triagem de transcritos de *ALS1* (RTALS1F e RTALS1R) e *ALS4* (RTALS4F e RTALS4R) através da técnica RT-PCR. A presença de transcritos dos genes *ALS1* e *ALS4* são caracterizadas pela observação de uma banda de 318 pb e uma de 356 pb, respectivamente, tanto em células aderidas quanto em células planctônicas. (A) *ALS1* – presença da banda em células aderidas do isolado CAJ (liga metálica de Níquel-Cromo) e ausência da banca em células planctônicas. (B) *ALS4* – presença da banda em células aderidas do isolado CA04 (resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo) e ausência da banca em células planctônicas. 1– Controle de peso molecular 1 Kb plus DNA ladder; 2–13 triagem de transcritos de *ALS1* dos isolados bucais de *Candida albicans* (CA12, CA07, CAE, CAD, CA04 e CAJ); 14–25 triagem de transcritos de *ALS4* dos mesmos isolados.

ARTIGO 3

THE ROLE OF *Candida albicans* IN THE DEVELOPMENT OF ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS OF DENTAL PROSTHESIS

Daiane Pereira Camacho^{1,2}, Joyce Cristine Cardoso Boscariol^{2,5}, Giovani de Oliveira Corrêa^{3,4}, Patrícia de Souza Bonfim-Mendonça⁵, Marcia Cristina Furlaneto¹, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^{5*}

¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil;

²Departamento de Biomedicina, Faculdade Ingá, Maringá, Paraná, Brasil;

³Departamento de Odontologia Restauradora, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil;

⁴Programa de Mestrado em Prótese Dentária, Faculdade Ingá, Maringá, Paraná, Brasil;

⁵Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil.

*Correspondence: Terezinha I. E. Svidzinski. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Micologia Médica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Bloco T20 - CEP: 87020-900. Maringá, Paraná, Brasil. Phone: ++55 44 30114809, Fax: +55 44 30114860. E-mail tiesvidzinski@uem.br.

Abstract

Objective: To evaluate the virulence potential of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of elderly users of dental prosthesis and to associate the findings to the presence of oral candidiasis (OC).

Materials and methods: *C. albicans* obtained from the oral cavity of 70 volunteers were evaluated for hydrophobicity, biofilm formation, germ tube (GT) production, adherence on buccal epithelial cells (BEC) and on thermally activated acrylic resin (TAAR).

Results: *C. albicans* from lesions were hydrophilic, produced little biofilm and had little adherence to TAAR. Nevertheless, they were efficient in adhering to BEC and produce GT. Moreover, isolates from colonization were hydrophobic and efficient in forming biofilm as well as adhere to TAAR. However, they produce more GT and adhere well to BEC. There was no correlation between biofilm formation, size and percentage of GT, indicating that these virulence factors are expressed independently. A correlation between adherence to BEC and the size and percentage of GT was detected. Thus, it seems that the high capacity to invade tissues and give yeast greater adherence to BEC surfaces, is closely associated with the germ GT.

Conclusions: The virulence potential of oral *C. albicans* is isolated dependent and it is clear that yeast play an important and essential role in the pathogenesis of OC.

Clinical relevance: Recognizing the fact that *C. albicans*, present as normal microbiota at oral cavity, possesses potential to transform into an infectious agent, it is an important factor for the correct management of OC.

Keywords: Oral candidiasis, dental prosthesis, yeast, virulence.

Introduction

Oral candidiasis (OC) is one of the most common oral pathologies and has been attributed to the use of prosthesis. OC is caused by yeasts of the genus *Candida* that are part of the oral normal microbiota, but otherwise it can be an important infectious agent. *Candida albicans* is the predominant species in both colonization and in the infectious processes [1–3]. It is opportunistic yeast and its transition from commensal to infectious agent depends on both susceptibility of host, and the virulence potential of the microorganism involved [4].

The incidence of OC varies with age and several predisposing factors such as diabetes mellitus (DM), Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), xerostomia, antibiotics, dental prosthesis, drug use, diet rich in carbohydrates, smoking, Cushing's syndrome, malignant tumor and immunosuppression [5–8]. Authors have suggested that the use of dental prosthesis is a predisposing factor for OC, since is associated with mechanical irritation that can cause trauma to the palate [9–11]. This breakdown of the organic mucosal barrier facilitates greater interaction between yeasts present in colonization and the cells or tissues of the host. This scenario, favored by the invasiveness capacity of these yeasts results in infectious processes ie OC. Another important mechanism is poor oral hygiene, where the accumulation of food debris serves as a nutritional substrate stimulating overgrowth of microorganisms, acting as a reservoir of agents capable of causing infections [12–14].

However, it is not fully established what role yeasts have in this pathological process, most authors attribute OC solely to the weakness or host factors. Despite, the virulence potential of *C. albicans* [15–19], has been well described, there are no studies showing that the virulence attributes of *C. albicans* make them capable of causing OC, regardless of factors related to the weakness of the host.

In this sense, the objective of this study was to evaluate the virulence potential of *C. albicans* isolated from the oral cavity of elderly users of dental prosthesis, and associate it with the presence of OC.

Materials and methods

Research volunteers

The study was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Faculdade Ingá of Maringá – Paraná, Brazil under nº 0073/2010 and all procedures were performed in accordance with the Resolution 466/12 CNS. This is a cross-sectional descriptive study involving elderly institutionalized in a nursing home in northwestern Paraná, Brazil. Volunteers signed a consent form, answered a survey that included questions about demographics such as age, gender, underlying disease, and even had a clinical examination of the oral cavity performed by a dentist.

Obtaining samples, culture and identification of isolated yeasts

Saliva samples were collected and deposited in conical tubes after mouth rinsing with 10 ml of mineral water for 30 sec, then centrifuged at 3000 g for 10 min, and supernatant discarded. Aliquots of 10 µl from the pellet were seeded with bacteriological loop on the surface of Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco, Detroit, USA) supplemented with chloramphenicol and incubated at 37 °C for 48–72 h to evaluate the number colony-forming units (CFU). Screening by staining and morphology of colonies grown in CHROMagar *Candida*[®] (CHROMagar Company, Paris, France) were performed. Then yeasts were identified for genus and species of *C. albicans* based on micromorphology in cornmeal agar (Oxoid, Basingstok, UK) plus Tween 80 to 1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), germ tube test,

assimilation and fermentation of carbon and nitrogen according to standard methods [20]. The presence of *C. dubliniensis* was dismissed by molecular biology [21].

Virulence attributes of *C. albicans* isolated from volunteers users of prosthesis

Cell surface hydrophobicity

The cell surface hydrophobicity (CSH) test was determined by the Microbial Adhesion to Hydrocarbons Test with some modifications [18, 22].

Each yeast was resuspended in phosphate buffered saline (PBS: pH 7.2, 0.1 M) (Sigma Chemical Co., USA) and the concentration obtained in optical density (OD) 0.5 at 620 nm (Baush e Lomb). From this cell suspension, 1.3 ml was pipetted into three tubes (13×100 mm). From each tube, 100 µl was pipetted from the yeast suspension and distributed in 96-well microplates (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark). An initial reading of the OD at 620 nm in a microplate reader (Expert plus – ASYS, UK) was performed. In the remaining suspension volume of 1.2 ml in the three tubes we added 0.3 ml of n-octane. The mixture was vigorously vortexed (AP56, Phoenix, Brazil) for 3 min and allowed to stand for 15 min for phase separation. Subsequently, 100 µl of the lower aqueous phase from each tube was carefully withdrawn and added to wells in a new microtiter plate, thus obtaining the final reading of the OD, under the same conditions. Tubes with no yeast served as controls. The percentage of CSH was given using the following formula: $[(\text{OD final reading}/\text{OD initial reading}) \times 100 = x\%]$.

Interpretation: Values < 50% were considered hydrophobic and > 50% were considered hydrophilic [23–24]. The tests were performed in triplicate and values shown are the averages of three different observations.

Biofilm formation

Starting from a fresh culture of each yeast on SDA for 18–24 h, a suspension of yeast was prepared in sterile saline solution (SSS: 0.85%), adjusted to a concentration of 3.7×10^7 cells/ml by counting the cells in a Neubauer hemocytometer chamber (Improved Chamber) and distributing 20 μ l into each of the 96–well microplate, adding 180 μ l of Sabouraud Dextrose broth (Difco, Detroit, USA) with 8% glucose. The tests were performed in quadruplicate, having as control strain *C. albicans* ATCC 90028. The microplate was incubated at 37 °C for 24 h. Then, two washes with distilled water were carried out and the reading performed on a microplate reader at 405 nm [25]. In order to quantify biofilm for each yeast, we subtracted OD value converted into transmittance (T) of the negative control value (no biofilm production) and followed the following interpretation scale: negative (%T < 5), 1+ (%T 5 to 20), 2+ (%T 20 to 35), 3+ (%T 35 to 50), 4+ (%T \geq 50).

Germ tube production

From the recent cultures of yeasts on SDA at 25 °C for 18–24 h, an inoculum was prepared in SSS and turbidity adjusted according to tube 4 of the McFarland scale. The suspension was centrifuged at 1500 g for 10 min and the supernatant discarded. The yeasts were resuspended in RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.5 ml of inactivated human serum and incubated at 37 °C for 3 h. Then the material was stirred in a vortex for 30 sec, followed by analysis using an optical microscope (Nikon, TMD, Nippon Kogaku Inc).

200 yeasts were analyzed in each test, observed, and then the percentage of yeast forming germ tube (GT) was calculated. Tube size was measured with the aid of a 40X objective coupled with measuring ruler. The experiment was performed in triplicate on three different days.

Adherence to buccal epithelial cells

Buccal epithelial cells (BEC) were obtained from healthy volunteers by gently rubbing over the oral mucosa with a sterile swab and dispensed in 10 ml of PBS. The BEC suspension was washed three times in PBS by centrifugation at 3.000 g for 10 min. The pellet obtained was observed under an optical microscope to rule out the presence of any microorganisms. The pellet was resuspended in PBS and adjusted to a concentration of 10^5 cells/ml using Neubauer hemocytometer chamber. The recent culture of *C. albicans* isolates in SDA 18–24 h were grown in Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco, USA) supplemented with 50 mM galactose and incubated at 37 °C for 24 h, washed three times in PBS and resuspended in the same buffer to obtain adjustment of the inoculum to 10^5 CFU/ml. The adherence test was followed by co-incubation of equal volumes (0.5 ml) of BEC (10^5 cells/ml) *Candida* (10^5 CFU/ml) with continuous stirring at 70 rpm in a Shaker incubator oven (NT712; Nova Técnica, Piracicaba, Brazil) at 37 °C for 1 h. The cells were then washed twice with PBS by centrifugation at 1.500 g for 5 min. Two slides for each isolate were prepared, allowing air-drying, fixed with crystal violet and then stained by the Papanicolaou technique, and subsequently fixed between slide and coverslip with synthetic balm. Adherence was assessed microscopically using an objective 40X per count in BEC 200.

The evaluation was performed in microscopic fields that showed no overlap of BEC or staining material. We considered adhered yeasts those that showed clear interaction with BEC, as evidenced by a clear halo around them. Long pseudohyphae and yeast aggregates were excluded from the count. In 200 BEC, which had adhered yeasts, the number of adhered yeasts per BEC was evaluated [26]. Tests were performed in triplicate and the results reported as the number of yeasts adhered to BEC by considering the mean of all tests for each isolate.

***In vitro* adherence assay on thermally activated acrylic resin**

Preparation of the yeast suspensions

For each experiment, yeast cells were grown on SDA for 18–24 h at 37 °C. Two to three colonies of each of the samples were suspended in SSS in a glass tube (13×100 mm), which was subjected to vortexing. Then, suspensions with a concentration of approximately 1×10^7 yeasts/ml were prepared by counting in a Neubauer chamber.

Adherence assay and quantification of the yeasts adhered by colony-forming units

For this test we used twelve coupons made of thermally activated acrylic resin (TAAR: VIPI CRIL, Dental Vipi Ltda, Brazil) with dimensions of 7.0 mm for the largest diameter, 4.0 mm for the smallest and 3.5 mm for height.

Using strict aseptic techniques, coupons were placed into eppendorf tube containing 1.0 ml of the yeast suspension previously standardized. These were incubated for 6 h at 37 °C under continuous agitation at 120 rpm in a Shaker incubator oven. After incubation, the samples were washed three times with 0.5 ml of SSS to remove non-adherent and loosely adhered yeasts. Then, the specimen was transferred to an eppendorf tube containing 1.0 ml of SSS and 0.3 g of glass pearls (1–2 mm diameter from Roni Alzi scientific glass). The tube was subjected to vigorous vortexing for 1 min to remove the yeasts adhered to the specimen. Next, 20 µl of suspension was seeded on plates containing SDA and incubated at 37 °C for 24 h. The quantification of yeasts on the specimen was determined by counting the number of viable yeasts and the result was expressed as colony-forming units per ml (CFU/ml) [27]. Assays were performed in triplicate.

Scanning electron microscopy

Two specimens were used and made in TAAR incubated at 37 °C for 12 h in 1.0 ml yeast suspension containing 1×10^7 yeasts/ml under continuous stirring at 120 rpm in a Shaker incubator oven. Then, SSS washes for removal of non-adherent or weakly adhered yeasts were performed. Subsequently, the specimens were fixed in glutaraldehyde 2.5% dissolved in PBS at 4 °C for approximately 22 h and dehydrated in ascending series of alcohol solution. The critical point was obtained in Balzers CPD-010 (Balzers instruments, Balzers, Liechtenstein) with carbon dioxide. Then, the metallization in gold was carried out in Balzers SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). The documentation was performed in a scanning electron microscope (SEM: FEI Quanta 200) at the State University of Londrina, Paraná, Brazil.

Statistical analysis

The results were analyzed using *t* test and analysis of variance (ANOVA) for comparisons between the yeast isolates. The level of significance was set at 5%. The tests were carried out with software Graph Pad Prism[®] version 5.0 (Graph Pad Software Inc.).

Results

This study included 70 elderly volunteers between 59 and 88, with an average of 74 years old. According to Figure 1, oral samples of these individuals resulted in 40 positive cultures for yeast, with a predominance of *C. albicans*, regardless of the presence of oral lesions.

Appearance of lesions

The oral clinical examination done by a professional dentist showed that the clinical features of OC most frequently found in the volunteers were the whitish diffused lesions or erythematous lesions. Figure 2 illustrates these findings through images from volunteer 3, a user of removable partial denture (a) and 4, a denture user (b).

Virulence attributes of *C. albicans* isolated from volunteers users of prosthesis

Of the 40 isolated yeasts, 20 were identified as *C. albicans*. These isolates plus an ATCC 90028 *C. albicans* strain were evaluated for the following virulence parameters: hydrophobicity, biofilm, percentage and size of GT, these results are shown in Table 1.

Overall the 20 isolates of *C. albicans* were quite variable as for CSH, the values ranged from 25.66% (more hydrophobic) to 93.63% (more hydrophilic). All *C. albicans* isolates showed potential to form biofilm on polystyrene microplates, since no isolate had negative score. Among the samples studied 14.30% (n = 03) formed a lot of biofilm represented by 4+; 14.30% (n = 03) by 3+; 14.30% (n = 03) by 2+ and 57.10% (n = 12) by 1+. In this group, the percentage of *C. albicans* cells that produced GT ranged from 2.50 to 32.50% and the lengths of these ranged from 5.80 to 30.50 μm (Table 1).

From this profile we selected four isolates of *C. albicans* obtained from the oral cavity of volunteers, users of dental prosthesis, who are marked in bold in table 1. The selection criteria included the choice of two hydrophobic isolates efficient in biofilm production (CA 07 and CA 11) and two hydrophilic isolates with low biofilm production (CA 26 and CA 36). These four clinical isolates, plus *C. albicans* ATCC 90028 were evaluated in additional tests aiming more specific adherence experiments. The clinical characteristics of the four volunteers from whom we obtained the selected isolates, are summarized in table 2. Coincidentally, two of these were obtained from individuals who did not have oral lesions

(CA 07 and CA 11), in other words, the yeast was present in colonization, while the other two were obtained from diffused lesions, typical of OC (CA 26 and CA 36).

Following we present the results of the experiments carried out with the four selected clinical isolates and the reference strain.

Adherence to bucal epithelial cell

As for the adherence assay of yeast on BEC, Figure 3 illustrates the criteria used for counting. We considered adherent those yeasts which had clear interaction with BEC, as evidenced by a clear halo around them.

Table 3 shows the results obtained in 200 BEC, we have observed a tendency of yeasts regarding to adherence ability, and in addition two parameters evaluated were directly proportional. Isolates which had attached in a higher percentage of BEC, also had the highest number of yeasts adhered per BEC. We also included in this table the results of the percentage and size of GT, so it was possible to observe that the ability to attach on BEC was not only directly proportional to the ability to produce GT but also to its respective size.

***In vitro* adherence assay on TAAR**

Figure 4 shows the number of yeast CFU /ml obtained from the *in vitro* adherence assay of the four *C. albicans* isolates on TAAR. Yeasts isolated from oral lesions (CA 26 and CA 36) were less efficient to adhere on TAAR than those isolated from colonization.

Scanning electron microscopy

We used these two isolates (CA 07 and CA 26) to illustrate the results of the adherence on TAAR, by SEM. Figure 5 shows large amounts of yeasts (isolate CA 07) adhered on the resin (a). In (b) a small amount of yeast (isolate CA 26) is shown.

In summary, CA 07 and CA 11 isolates (obtained from colonization) showed greater capacity for adherence on TAAR, 4 + of biofilm but low percentage of adherence on BEC. On the other hand, CA 26 and CA 36 isolates (obtained from OC) were less efficient in the production of biofilm and showed lower ability to adhere on TAAR, but showed greater transformation capacity in germ tube and of adherence on BEC.

Discussion

Candidiasis is one of the most common oral pathologies. Studies have attributed the cause of this opportunistic infection to the host's systemic factors such as DM, hypertension, osteoarthritis, osteoporosis, anemia, leukemia, and use of medication such as antibiotics, anti-inflammatory hormones and others, which can increase susceptibility for the installation of yeast in the oral cavity [4–5,7].

Furthermore, the use of removable full or partial dentures has been considered one of the main local factors for OC predisposition [12, 28]. In Brazil, dental prosthesis is much used in the elderly, especially those with low purchasing power, precisely those who are now institutionalized in public nursing homes and this was the reason for our choosing this population for study.

The association of OC and dental prosthesis has been admitted by many authors [28–29] and is generally attributed to the ability of adherence of yeasts, of the *Candida* species, to abiotic surfaces. However in this study it was clear the important role of the germ tube produced by *C. albicans* in the ability to invade epithelial cells, acquiring the potential to cause lesions.

In our study, a small portion of elderly users of prosthesis, had oral lesions (5/40 = 12.5%). This data is difficult to be confronted with the literature since, despite being closely associated, there are few publications involving OC, prosthesis and elderly persons.

In relation to species of yeasts isolated, despite the high prevalence of Non-*Candida albicans*, there is still a predominance of *C. albicans* in the two groups, as obtained from lesions as from colonization. Considering that this is the most common and best known species, the study was continued only with *C. albicans* isolates.

The 20 *C. albicans* isolates including in both groups were enrolled together in anonymity and they were screened through the following virulence factors: CSH, ability to form biofilm, percentage and size of GT. These results, seen in table 1, show significant variations among the evaluated parameters and seemingly unrelated. Whereas the ability to form biofilm and hydrophobicity are the characteristics most associated with OC, attributed to the use of dental prosthesis. From these results we chose four isolates to be used in more detailed studies to evaluate adherence potential.

C. albicans is an opportunistic yeast and its transition from harmless commensal to infectious agent depends on both the susceptibility of the host and the virulence of the microorganism [4]. From the viewpoint of the host, was not detected any predisposing factor for OC, except the prosthesis use and aged. However it is important to note that these four yeasts showed different virulence attributes, proving the active participation of the microorganism in the establishment of the infectious process.

Contrary to expectations, isolates CA 26 and CA 36, obtained from lesions, were highly hydrophilic (71.40%), and insignificant in the production of biofilm (1+) while CA 07 and CA 11 isolated from oral colonization (absence of clinical signs) were rather hydrophobic (28.60%) and efficient in forming biofilm (4+). Coincidentally, these isolates chosen according to the profile of CSH and ability to form biofilm, when confronted with data

of the individuals (Table 2), it suggested discrepancy, this is because the expected would be to isolate, from the oral lesion, *C. albicans* with hydrophobic characteristics and efficiency in forming biofilm, which is the exact opposite of what was found.

This apparent discrepancy suggests that other virulence factors from the yeasts must be involved. *C. albicans* not only adheres to the resin, directly or through intermediate layer formed by a polymicrobial biofilm [28–29] but also has the ability to adhere to host cells. Thus, the results allow us to associate the ability of yeasts to adhere to BEC surfaces (Table 3) to the formation of GT. It is important to highlight the positive relationship between these two properties, since the two *C. albicans* isolates, which were obtained from individuals with prosthesis, who had OC, showed the highest percentage and larger size of GT, suggesting greater invasiveness.

The results found with the CA 26 and CA 36 isolates as having less ability to adhere on acrylic resin and greater capacity to adhere to BEC, suggest that the size and the percentage of GT of these isolates are associated with adherence to BEC. GT in *C. albicans* is associated with increased ability to invade tissues [30] as well as give the yeast more ability to attach human cells surfaces [31].

In the process of infection, *C. albicans* which are found in the colonization in the form of yeast, when initiating the disease process, nutritional and environmental changes occur which modulate in time the conversion to the hyphal stage, increasing invasiveness and thus, its virulence [32].

In this study, there was no correlation between biofilm formation and GT (percentage or size), indicating that these virulence factors are expressed independently. Regarding the ability of *in vitro* adherence of these strains on TAAR, we observed a variation in the pattern of adherence and cell differentiation among isolates of *C. albicans*. The data taken as a whole suggest that *C. albicans* isolated from users of prosthesis who have no lesions correspond to

those with low potential for adherence, in other words, virulence related to invasiveness capability and, consequently, less likely to cause infection, regardless of the efficiency in producing biofilms on abiotic surfaces.

The results presented here are pioneering in relation to the literature that emphasizes the use of prosthesis as the cause for OC. It is interesting to note that elderly with lesions on the palate, as well as being diabetic, they harbored yeasts in their oral cavities endowed with important virulence factors. The isolates from the oral lesions were the most to adhere to the BEC and presented higher rates and biggest GT, despite the lesser capacity to adhere on TAAR, being hydrophilic, and low biofilm producers. While *C. albicans* isolates of elderly without lesions in the oral cavity showed hydrophobic characteristics associated with greater ability to form biofilm on acrylic resin, it is possible to propose that the smaller size and amount of GT reduced the chance of yeast adhering to cell surfaces and, consequently, invade the tissue causing OC.

With this data, the multifactorial origin of OC is confirmed and it is possible to conclude that the process of OC would actually be related to the host, but it is evident that the microorganism plays an important and essential role in the pathogenesis. Furthermore, our results show that the potential for virulence is isolated dependent.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Zaoutis TE, Argon J, Chu J, Berlin JA, Walsh TJ, Feudtner C (2005) The epidemiology and attributable outcomes of candidaemia in adults and children hospitalised in the United States: a propensity analysis. *Clin Infect Dis* 41:1232–1239
2. Pappas PG (2006) Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 20:485–506
3. Holley A, Dulhunty J, Blot S, Lipman J, Lobo S, Dancer C, Rello J, Dimopoulos J (2009) Temporal trends, risk factors and outcomes in *C. albicans* and non-*albicans* candidaemia: an international epidemiological study in four multidisciplinary intensive care units. *Int Antimicrob Agents* 33:554–557
4. Totti, MAG, Santos EB, Almeida OP, Koga-Ito CY, Jorge AOC (2004) Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice. *Braz Oral Res* 18(3):202–207
5. Akpan A, Morgan R (2002) Oral candidiasis. *Postgraduate Medical Journal* 78: 455–459
6. Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM (2002) Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*, 8(2):151–60
7. Soustre J, Rodier MH, Imbert-Bouyer S, Daniault G, Imbert C (2004) Caspofungin modulates *in vitro* adherence of *Candida albicans* to plastic coated with extracellular matrix proteins. *J Antimicrobial Chemoth* 53(3): 522–525
8. Arias Wingeter M, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE (2007) Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals. *Rev. Soc. Bras. Med.Tropical* 40(3):272–276
9. Coelho CM, Zucoloto S, Lopes RA (2000) Denture-induced fibrous inflammatory hyperplasia: a retrospective study in a school of dentistry. *Int J Prosthodont* 13(2): 148–151
10. Coelho CM, Sousa YT, Dare AM (2004) Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. *J Oral Rehabil* 31(2):135–139
11. Williams DW, Jordan RPC, Wei Xiao-Qing, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, Lewis MAO (2013) Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *Journal of Oral Microbiology* 5:1–8
12. Cumming CG, Wight C, Blackwell CL, Wray D (1990) Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol* 5(8):82–85
13. Hoad-Reddick G, Grant AA, Griffiths CS (1990) Investigation into the cleanness of dentures in an elderly population. *J Prosthet Dent* 64(1):48–52
14. Pietrokovski J, Azuelos J, Tau S, Mostavoy R (1995) Oral findings in elderly nursing home residents in selected countries: oral hygiene conditions and plaque accumulation on denture surfaces. *J Prosthet Dent* 73(2):136–41

15. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug Resistance. *J Bacteriol* 183:5385–5394
16. Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11(1):30–36
17. Dambroso D, Svidzinski TIE, Svidzinski AE, Dalalio MMO, Moliterno RA (2009) Radiotherapy effect on frequency of *Candida* spp. and on virulence of *C. albicans* isolated from the oral cavity of head and neck cancer patients. *J Basic Appli Pharmac Sci* 30:25-32
18. Raut J, Rathod V, Karuppayil SM (2010) Cell surface hydrophobicity and adhesion: a study on fifty clinical isolates of *Candida albicans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 51(3):131–6
19. Farias-Paiva LC, Patussi EV, Donatti L, Svidzinski TIE, Consolaro MEL (2010) Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to an intrauterine contraceptive device. *Microscopy Microanalysis* 16(5):537-49.
20. Kurtzman CP, Fell FW (1998) *The yeast. A taxonomia study*. Amsterdam: Elsevier, Inc. 891–913
21. Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, Sato H, Nishikawa A (2002) Extracellular proteinase and phospholipase activity of tree genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *Microbiol Immunol* 46:881–883
22. Hazen KC, Hazen BW (1987) A polystyrene microsphere assay for detecting surface hidrofobicity variations within *Candida albicans* populations. *J Microbiol Methods* 6:289–299
23. Anil S, Ellepola ANB, Samaranayake LP (2001) The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Microbiol* 7:119–122
24. Camacho DP, Gasparetto A, Svidzinski TIE (2007) Chlorhexidine and gentian violet effect on the adherence of *Candida* sp to urinary catheters. *Mycopathologia* 163:261–266
25. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW (2002) Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 40:1244–1248
26. Taguti Irie MM, Consolaro MEL, Guedes TA, Donatti L, Patussi EV, Svidzinski TIE (2006) A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 20:195–203
27. Camacho DP, Consolaro MEL, Patussi EV, Donatti L, Gasparetto A, Svidzinski TIE (2007) Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). *Contraception* 76:439–443

28. Calderone AR, Braun PC (1991) Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Molecular Biology Reviews* 55(1):1–20.
29. Calderone RA, FONZI, WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9(12): 327–335
30. GHANNOUM MA (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* 13(1) 122–143
31. Consolaro MEL, Albertoni TA, Svidzinski AE, Peralta RM, Svidzinski TIE (2005) Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia* 159:501–507
32. Bilhan H, Sulun T, Erkose G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, Bilgin T (2009) The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture related stomatitis. *Clinical Oral Investigation* 13:363–368

Table 1 Screening with twenty clinical isolates of *Candida albicans* obtained from elderly users of prosthesis plus a *Candida albicans* ATCC 90028 strain using some virulence factors

Isolated	CSH (%)	Biofilm (+)	Germ tube	
			(%)	Size (μm)
CA 01	56.89	2	9.00	12.83
CA 04	70.84	1	7.50	14.02
CA 05	46.15	3	4.50	5.80
CA 07	32.10	4	3.00	6.12
CA 11	25.66	4	6.50	11.38
CA 14	85.84	1	7.00	18.62
CA 16	93.63	1	8.50	13.85
CA 19	73.17	1	2.50	7.89
CA 20	68.68	1	6.70	8.10
CA 23	45.05	3	5.50	8.75
CA 24	58.00	2	7.50	8.75
CA 26	70.74	1	32.50	30.50
CA 27	47.91	4	2.00	13.15
CA 29	85.05	1	8.00	24.03
CA 32	62.82	1	11.50	17.09
CA 33	73.43	1	4.50	12.25
CA 35	35.72	3	4.00	6.80
CA 36	73.80	1	26.00	30.08
CA 39	79.25	1	13.50	15.59
CA 40	51.61	2	5.00	7.50
ATCC 90028	85.00	1	27.00	25.03

CSH: Cell surface hydrophobicity

Table 2 Clinical characteristics of the four volunteers users of dental prosthesis who selected yeasts were obtained

Variable	Volunteers			
	1	2	3	4
Age	86	72	78	81
Gender	Female	Female	Male	Male
Presence of teeth	Yes	No	Yes	No
Number of teeth	7	0	8	0
Location of the teeth	Mandible	-	Maxilla	-
Type of prosthesis	RPD	D	RPD	D
Time use of prosthesis	1 to 6 years	1 to 6 years	7 to 10 years	7 to 10 years
Presence of lesions*	No	No	Yes	Yes
Appearance of lesions	-	-	Diffused	Diffused
Isolates Identification	CA 07	CA 11	CA 26	CA 36

RPD: Removable partial denture

D: Denture

CA: *Candida albicans*

*Oral candidiasis

Table 3 Adherence of *Candida albicans*, from the oral cavity of healthy elderly, to Buccal Epithelial Cells related to the size and percentage of germ tube

Isolated	BEC with yeast adhered (%)	Yeast per BEC*	Germ tube	
			(%)	Size (µm)
CA 07	34.00	0.32	3.00	6.12
CA 11	29.00	0.34	6.50	11.38
CA 26	66.00	0.67	32.50	30.50
CA 36	57.50	0.68	26.00	30.08
ATCC 90028	39.00	0.94	27.00	25.03

BEC: Buccal Epithelial Cells

*Average number of yeast adhered per BEC

Figure legend

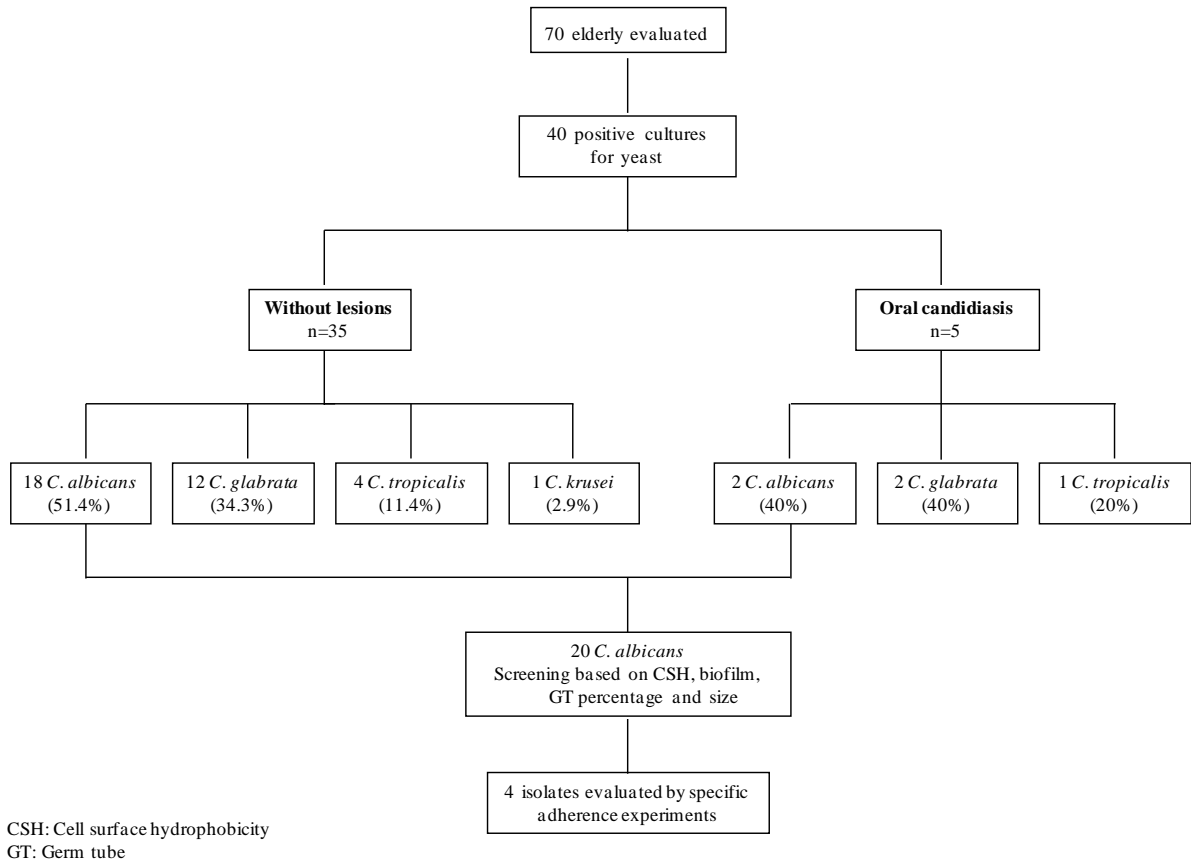


Figure 1 Flow-chart of the study

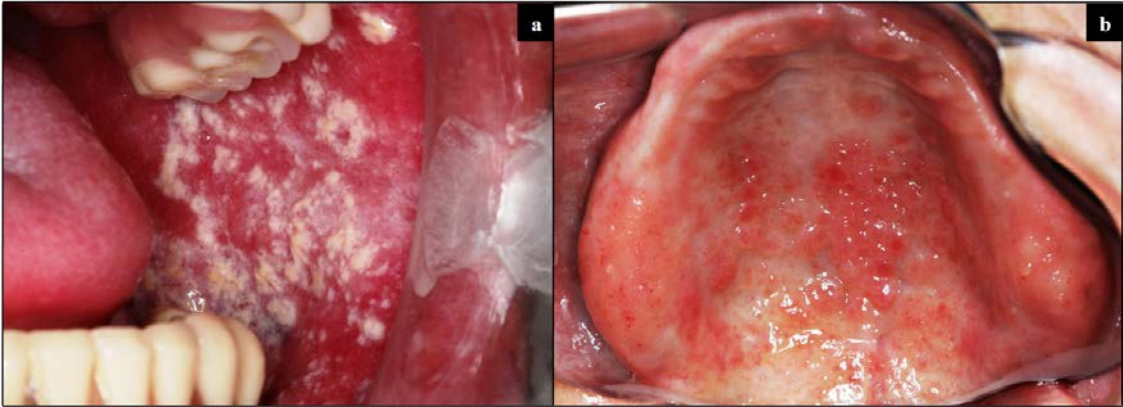


Figure 2 a) Clinical aspect of pseudomembranous candidiasis: presence of small yellow-whitish plates on the surface of the oral mucosal, with a plate bigger which can be removed, from confluent plates with an erythematous base. b) Clinical aspect of Oral Candidiasis due prosthesis use: presence of chronic erythema with edema of the mucosal in contact with the denture.

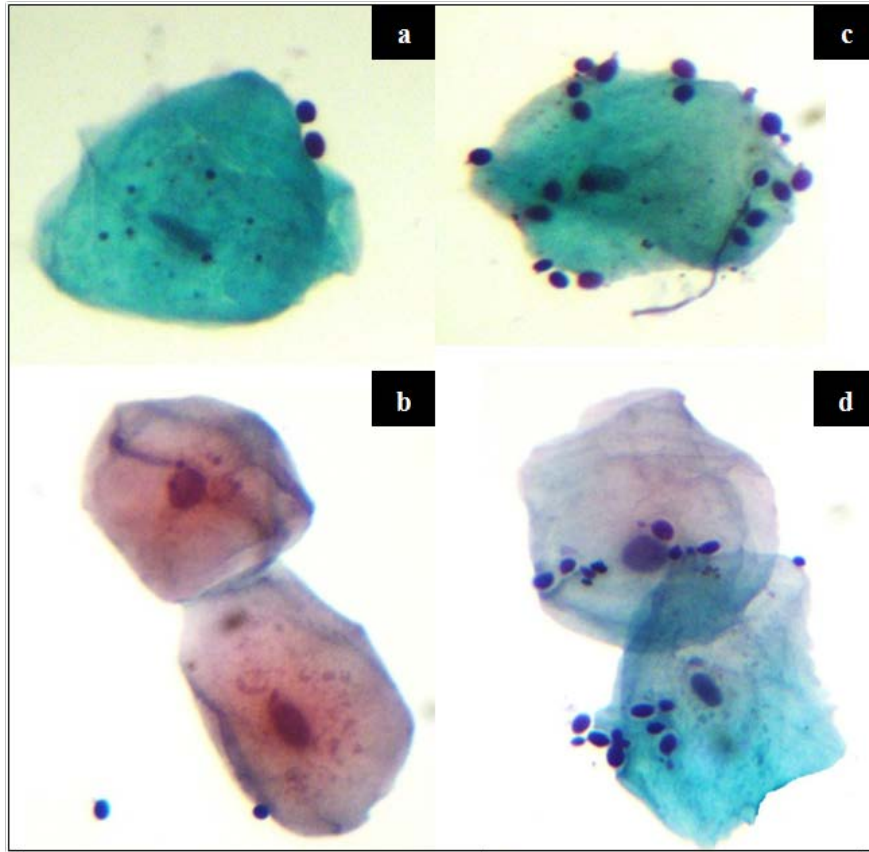


Figure 3 Standard adherence of *Candida albicans* isolates (a: CA 07), (b: CA 11), (c: CA 26) and (d: CA 36) on Buccal Epithelial Cells, through optical microscopy, staining Papanicolaou. (400X).

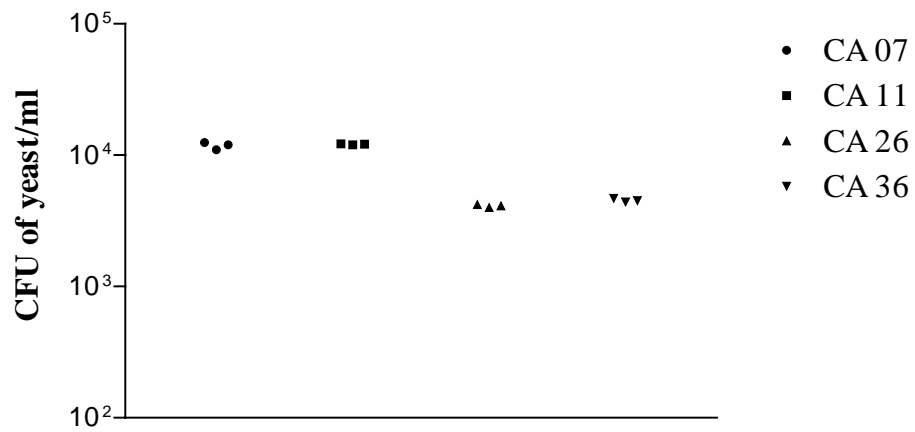


Figure 4 Number of colony-forming units of yeasts through *in vitro* adherence assay on thermally activated acrylic resin (TAAR) of four isolates of *Candida albicans*, after 6 hours of incubation. CA 07 and CA 11 (obtained from colonization) were significantly more effective in adhering than CA 26 and CA 36 obtained from lesions ($p < 0.001$). On the other hand, there was no statistical difference between the yeasts of the same group ($p > 0.05$).

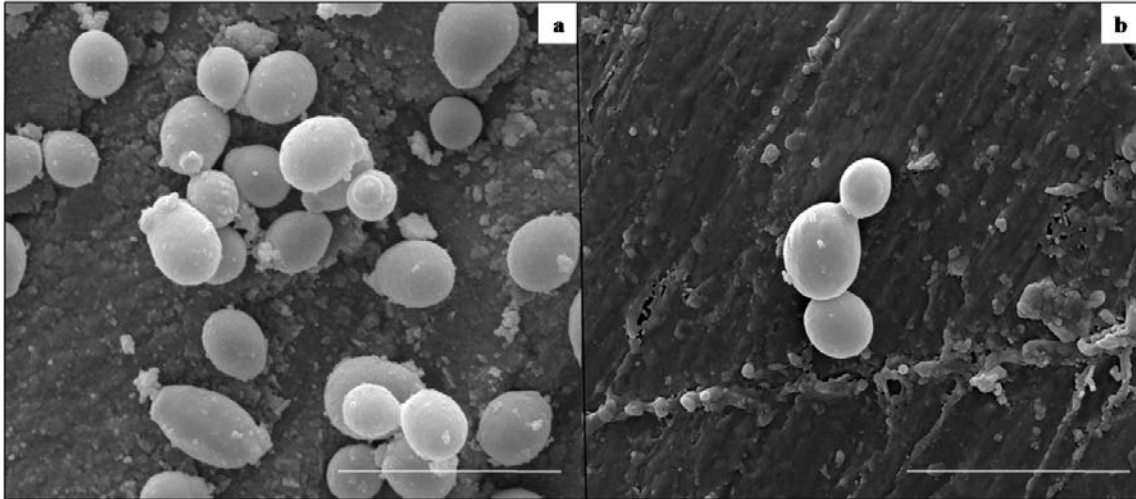


Figure 5 Illustration of *Candida albicans* obtained from volunteers users of dental prosthesis regarding pattern of adherence on thermally activated acrylic resin (2.400X). Note the variation in the number of yeasts attached (a = CA 07), (b = CA 26).

CONCLUSÕES

- Todos os isolados apresentam eficiência quanto à formação de biofilme;
- Os isolados avaliados apresentam elevado potencial de aderência aos materiais confeccionados em resina composta microhíbrida com nanopartículas (RC) e liga metálica de Níquel-Cromo (Ni-Cr);
- Observa-se diversidade no padrão de aderência e diferenciação celular, entre os isolados, com prevalência do padrão de aderência difuso;
- O padrão de aderência agregativo e pseudo-hifal, de alguns isolados, é possivelmente relacionado com os materiais RC e Ni-Cr;
- Presença de material extracelular de aspecto granular recobrindo toda a superfície celular dos isolados de *C. albicans* têm possível relação com o material RC;
- As maiores taxas de aderência dos isolados bucais de *Candida albicans* estão relacionadas à rugosidade superficial e principalmente às superfícies hidrofóbicas;
- Considerando os isolados individualmente, os transcritos mais frequentes em células aderidas aos diferentes materiais avaliados são os genes *ALS1*, *ALS2*;
- A indução de genes *ALS1* e *ALS4*, em função do material no qual os isolados estavam aderidos ocorrem de forma isolado-dependente;
- A repressão de genes *ALS7* e *ALS9*, dos seis isolados nos materiais confeccionados em resina acrílica ativada quimicamente (RAAQ) e em resina acrílica ativada quimicamente polimerizada à vácuo (RAAQv), parece ser dependente do material dentário;
- A origem multifatorial da candidíase oral fica confirmada, evidenciando o papel relevante e essencial da *C. albicans* nesta patogênese, devido ao seu potencial de virulência.