UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LUCIANA DE REZENDE PINTO

Detecção da expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de
C.albicans, por meio de RT-PCR em tempo real, após
desinfecção química e por microonda, de resina acrílica para
confeção de dentaduras.

Bauru
2010

LUCIANA DE REZENDE PINTO

Detecção da expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3
de *C.albicans*, por meio de RT-PCR em tempo real,
após desinfecção química e por microonda, de resina
acrílica para confecção de dentaduras.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Reabilitação Oral.

Orientador: **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto**

BAURU

2010

P658d

Pinto, Luciana de Rezende

Detecção da expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de *C.albicans*, por meio de RT-PCR em tempo real, após desinfecção química e por microonda, de resina acrílica para confecção de dentaduras / Luciana de Rezende Pinto.

Bauru, 2010.

128p. : il. ; 29,7cm.

Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Bauru,

Assinatura:

DADOS CURRICULARES

LUCIANA DE REZENDE PINTO

20 de Abril de 1980	Nascimento na cidade de São José do Rio Preto – SP.
1998-2001	Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.
2002-2004	Especialização em Prótese Dentária pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP.
2005-2007	Pós Graduação em Reabilitação Oral em nível de Mestrado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP).
2007-2010	Pós Graduação em Reabilitação Oral em nível de Doutorado pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP).

"O que chamamos de inspiração é a capacidade de reter e ampliar, com um toque próprio e único, um flash ou insight, uma coisinha de nada que atravessa o nosso pensamento e pode fugir. Porém, boa parte dessa inspiração é fruto da nossa capacidade de concentração, de disciplina, de esforço mental e até de teimosia. Precisamos não de um dia bonito de céu azul, mas de uma boa dose de paciência para produzir alguma coisa interessante, para organizar raciocínios, transformar barro em tijolos e tijolos em casas."

Maria Ester de Freitas

DEDICATÓRIA

A Deus,

Por colocar muitos anjos em meu caminho.

Aos meus queridos amigos,

*Pela amizade, companheirismo, cumplicidade e por todas as
emoções divididas nesses longos anos em Bauru.*

*Aos amigos de longa data e os recentes, aos de longe e os de
convivência diária, sem vocês este trabalho não seria possível.*

Devo esta conquista a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Vicente e Sílvia, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional que me ampara nos momentos difíceis me permite sonhar. Vocês fazem parte da realização de mais este sonho. Amo vocês.

Às minhas irmãs, Fernanda e Daniela, companheiras fiéis para vida toda. Obrigado por estarem ao meu lado sempre e me fazerem mais completa. Esse trabalho também é mérito de vocês.

À minha querida avó, Neida, pelo imenso carinho e apoio. Obrigada por me a estar presente em todas as minhas conquistas e obrigada por ajudar-me a realizá-las sempre. A senhora é mais que especial.

Ao amigo Thomas, por toda convivência e torcida durante esses anos. Você é muito querido por todos nós.

Ao Prof. Dr. Vinícius, Carvalho Porto, meu orientador, por sua confiança e por toda ajuda e empenho para que a realização desse trabalho fosse possível. Você foi fundamental para meu desenvolvimento profissional e pessoal. Obrigada por não medir esforços para viabilizar meu aprendizado e por colaborar imensamente para realização de um grande sonho: a docência.

Ao Dr. Ricardo Sérgio Couto Almeida, pela imensa contribuição para desenvolvimento deste trabalho, ensinamentos e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, por sua simpatia e disponibilidade em ajudar sempre que precisei de seus conhecimentos.

À queridíssima Dra. Thaís Helena Gasparoto, muito mais do que um exemplo de amor à ciência e à pesquisa, uma amiga muito especial, para a vida toda. Obrigada por tudo o que você me ensinou e ensina, para meu desenvolvimento profissional e pessoal. Muito obrigada por todas as nossas longas conversas, sempre preenchidas por gargalhadas; pelo incentivo, confiança e cumplicidade. Muitas vezes você foi a resposta para minhas inúmeras perguntas. Você é admirável.

Ao amigo incansável, Thiago José Dionísio, pelo apoio e cooperação, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela paciência, pela gentileza em transmitir seus conhecimentos e pelo seu envolvimento e responsabilidade com meu trabalho. Você é um exemplo a ser seguido.

À querida Prof^a. Dra. Lucimar Falavinha, por todo conhecimento transmitido durante esses anos de pós-graduação, e por toda ajuda e incentivo. Você é uma grande amiga.

A todos os *amigos* da turma de Doutorado em Reabilitação Oral, pelo convívio divertido e prazeroso.

A minha mestrandia preferida, *Letícia Bogaz Zarpelão*, pelo companheirismo durante o desenvolvimento desse trabalho. Seu bom humor foi fundamental para enfrentarmos juntas todas as dificuldades. Essa conquista é sua também.

Agradeço especialmente à *Flora, Emílio e Paulo Maurício*, pelo companheirismo estabelecido em nosso grupo de pesquisa.

A todas as amigas da pós-graduação em Biologia Oral, *Sandra, Carine, e Cláudia*, pelo companheirismo, amizade, e pela imensa ajuda nesta reta final.

A querida *Hayana*, que me ajudou tanto nesta reta final. Seu apoio e dedicação foram imensuráveis. Você é muito especial.

À amiga *Carla Sipert*, pelo companheirismo e amizade desde os tempos de especialização. Seu bom humor e inteligência cativam todos que a conhecem. Obrigada pela ajuda fundamental para a realização deste trabalho e pelo apoio durante meu concurso. Você é muito querida.

À amiga *Ana Lúcia Gasparoto (Minke)*, pela amizade, companheirismo e cumplicidade. É maravilhoso ter uma amiga como você.

À querida Maria Cecília Ribeiro de Mattos, pela amizade, companheirismo e por ajudar sempre que precisei. Você uma grande amiga, digna de minha mais profunda admiração.

Às amigas estrangeiras, Leslie Casas, Karina Gautreaux e Dafna Geller, pela amizade que atravessou barreiras geográficas.

Aos amigos que já não moram em Bauru, mas que fizeram parte de grande parte da minha passagem pela FOB e moram em meu coração, Ericson Janólio, Ronan Jacques, Kátia Reis, Patrícia Calderon, Giovana Canova e Adriana Dallaqua, por participarem de todos os momentos importantes da minha vida, mesmo à distância.

Aos meus amigos de graduação, que, mesmo à distância, me acompanham em todas as minhas conquistas, Jonas, Emi, Paty Aleixo, Roberta. Com vocês aprendi o verdadeiro sentido da amizade. Mesmo tomando caminhos diferentes, nosso carinho e preocupação um com os outros, não foram abalados. Agradeço todo o apoio, companheirismo, e solidariedade. Vocês foram importantíssimos para a minha formação, como profissional e como pessoa. Os admiro muito e os guardo em meu coração.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira, pela formação de uma comunidade cujo objetivo comum é a excelência.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia da FOB-USP, representado pela Profa. Dra. Ana Paula Campanelli, e ao Centro Integrado de Pesquisa da FOB-USP, representado pelo Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto, pelo empréstimo dos equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos funcionários André e Dalva (Laboratório de Microbiologia), Márcia, Marcelo, Renato, e Neusa (Centro Integrado de Pesquisa) e Telma (Departamento de Bioquímica) que zelaram de forma atenciosa para a realização deste trabalho e contribuíram com todo suporte técnico.

A todos que conviveram comigo durante este período

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

Abreviações

• C. albicans	Candida albicans
• EP	Estomatite por Prótese Total
• pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
• SAP	Aspartil Proteinase
• ALS	Agglutinin-like sequence
• HWP1	Hyphal Wall Protein
• RT-PCR	Transcrição Reversa seguida pela Reação em cadeia da Polimerase
• PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia Polimerase)
• cDNA	Complementary DNA (DNA Complementar)
• DNA	Ácido Desoxirribonucleico
• SH	Sulfidril
• S-S	DI-Sulfetos ou Pontes de Sulfeto
• NH	Amina
• CP	Corpos de Prova
• W	Watts
• mm	Milímetro
• Kg	Quilograma
• N°	Número
• Kgf	Quilograma força
• g	Gramas
• mL	Mililitro
• °C	Grau Celsius
• YPD	Yeast Peptone Dextrose
• rpm	Rotações por Minuto
• PBS	Phosphate Buffered Saline
• RPMI	Roswell Park Memorial Institute
• h	Horas
• RNA	Ácido Ribonucléico
• RNase	Ribonuclease
• nm	Nanometro
• ng	Nanograma
• Ct	Cycle Threshold / Ciclo Limiar
• P/N	Part Number
• SD	Desvio Padrão
• RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro
• RHE	Epitélio Humano Reconstituído
• Bcr	Breakpoint Cluster Region
• LIP	Proteína Lipase
• PLB	Proteína Fosfolipase
• CDC	Centro de Controle de Doenças

Símbolos

• <	Menor
• >	Maior
• %	Porcentagem
• ~	Aproximadamente
• μL	Microlitro
• μm	Micrometro

Resumo

RESUMO

A desinfecção de dentaduras promove o controle do biofilme microbiano e previne doenças, como a estomatite por uso de dentadura, associada à presença de *Candida albicans*. A expressão dos genes HWP1, ALS1, ALS3 deste fungo está relacionada à adesão das células fúngicas às do hospedeiro. O objetivo deste estudo foi detectar e quantificar a expressão desses genes em células planctônicas e biofilme de *Candida albicans*, desenvolvidos sobre superfícies de resina acrílica, após tratamento com dois métodos de desinfecção. Corpos de prova de resina acrílica, previamente tratados por hipoclorito de sódio 1%, microondas, e um grupo não tratado, foram inoculados com *Candida albicans* para desenvolvimento de biofilme. O biofilme e as células planctônicas foram coletados em três tempos distintos, correspondentes às etapas de desenvolvimento do biofilme: inicial (6h), intermediária (12h) e madura (48h) e a expressão gênica foi quantificada pelo ensaio de RT-PCR em tempo real. Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni; valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ foram considerados significantes. Os três genes avaliados foram detectados e quantificados por RT-PCR em tempo real, em biofilmes e células planctônicas, independente do grupo de tratamento ou tempo de desenvolvimento do biofilme. A expressão dos genes ALS1 e ALS3 variou de acordo com o tempo de desenvolvimento do biofilme e, e com o tratamento da superfície. Ocorreu diferença significativa ($p < 0,001$) entre a expressão desses genes nas superfícies tratadas por hipoclorito de sódio e microondas, além de diferenças significativas ($p < 0,001$) na expressão gênica entre células planctônicas e biofilme, para os tratamentos avaliados. Concluiu-se que os tratamentos de desinfecção alteram o padrão da expressão dos genes ALS1 e ALS3 em biofilmes desenvolvidos sobre superfície de resina acrílica e em células planctônicas e este padrão foi diferente entre os tratamentos de desinfecção.

Palavras chave: Prótese total, desinfecção, expressão gênica.

Abstract

ABSTRACT

HWP1, ALS1 and ALS3 genes expression in *Candida albicans* after chemical or microwave disinfection of acrylic resin for denture prosthesis using real time PCR

Complete dentures disinfection promotes biofilm control and prevents diseases such as denture stomatitis associated with the presence of *Candida albicans* infection. The expression of the genes HWP1, ALS1, ALS3 in this fungus is related to the adhesion of fungal cells to the host tissues. Therefore, the aim of this study was to detect and quantify the expression of these genes in planktonic cells and biofilms of *Candida albicans*, developed on acrylic resin surfaces, after treatment with two disinfection methods. Specimens of acrylic resin, previously treated by 1% sodium hypochlorite or microwave, and an untreated group were inoculated with *Candida albicans* for biofilm development. Biofilm and planktonic cells were collected at three different time points corresponding to biofilm development stages: initial (6 h), intermediate (12h) and mature (48h). The total RNA of these samples was obtained and the gene expression for mRNA of HWP1, ALS1 and ALS3 were quantified by Real-Time RT-PCR assay. The data obtained were assessed through two-way ANOVA and Bonferroni post-test. Significant levels were determined for p values at <0.05 . The three genes were detected and quantified in both biofilms and planktonic cells regardless of treatment condition or time of biofilm development. ALS1 and ALS3 expression varied according to the time point, and surface treatment. Significant differences ($p < 0.001$) were showed between gene expression on surfaces treated with sodium hypochlorite and microwave, and significant differences ($p < 0.001$) were showed in gene expression between planktonic and biofilm cells. It can be concluded that the disinfection procedures affect the ALS1 and ALS3 expression patterns in *Candida albicans* denture biofilms and planktonic cells. Additionally, differential gene expression patterns were observed among the disinfection treatments.

Keywords: Complete denture, disinfection, gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Confeção e inclusão do padrão de silicona.	67
Figura 2 - Confeção dos corpos de prova em resina acrílica	69
Figura 3 - Extração do RNA total	75
Figura 4 - Desenvolvimento do biofilme e células planctônicas, no grupo não tratado e tratado por hipoclorito de sódio e microondas, após 12 horas de incubação.	81

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Amplificação exponencial e curva de dissociação da RT-PCR em tempo real	83
Gráfico 2 - Expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de <i>C.albicans</i> , nos tratamentos estudados, em 6 horas, 12 horas e 48 horas de desenvolvimento do biofilme.....	84
Gráfico 3 - Expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 em células planctônicas de <i>C.albicans</i> , nos tratamentos estudados, em 6 horas, 12 horas e 48 horas de desenvolvimento do biofilme	86
Gráfico 4 - Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme e células planctônicas de <i>C.albicans</i> , durante o período do experimento, para cada tratamento avaliado.	88

Gráfico 5- Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme de <i>C.albicans</i> , nos tempos 6, 12 e 48 horas de desenvolvimento do biofilme, nos três tratamentos estudados.....	89
Gráfico 6- Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em células planctônicas de <i>C.albicans</i> , nos tempos 6, 12 e 48 horas de desenvolvimento do biofilme, nos três tratamentos estudados.....	91
Gráfico 7 - Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme e células planctônicas de <i>C.albicans</i> , nos tempos 6, 12 e 48 horas de desenvolvimento do biofilme, nos tratamentos por hipoclorito de sódio e microondas.	92
Gráfico 8 - Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3, em biofilme e células planctônicas de <i>C.albicans</i> , de acordo com os três tratamentos adotados, nos tempos de 6 horas, 12 horas e 48 horas.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo da reação RT-PCR em tempo real de etapa única.....	76
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados na reação de RT-PCR em tempo real de etapa única	77
Tabela 3 - Condições de ciclagem do RT-PCR em Tempo Real	77
Tabela 4 - Quantificação de RNA total extraído das amostras de biofilme e células plantônicas, de acordo com os tempos de incubação	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	41
1.1	<i>Candida albicans</i>	43
1.2	ESTOMATITE POR PRÓTESE TOTAL	44
1.3	BIOFILME EM PRÓTESES TOTAIS.....	46
1.4	FATORES RELACIONADOS À ADESÃO, PENETRAÇÃO E VIRULÊNCIA DA <i>C.ALBICANS</i>	48
1.5	GENES DA FAMÍLIA ALS E GENE HWP1	50
1.6	PCR EM TEMPO REAL COMO FERRAMENTA PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ALS E HWP1	51
1.7	CONTROLE DE BIOFILME EM PRÓTESE TOTAL PELO USO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO E MICROONDAS.....	53
2	PROPOSIÇÃO	59
3	MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1	CONFECÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	65
3.1.1	Confecção dos padrões de silicone para inclusão	65
3.1.1.1	Inclusão.....	66
3.1.1.2	Termopolimerização.....	67
3.1.1.3	Demuflagem.....	68
3.1.1.4	Acabamento dos corpos de prova.....	68
3.2	INOCULAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA.....	70
3.2.1	Preparo do inóculo de <i>C. albicans</i>	70
3.2.1.1	Obtenção da pré cultura.....	70
3.2.1.2	Purificação das células fúngicas	70
3.2.1.3	Contagem da concentração do inóculo	70
3.3	TRATAMENTO DOS CORPOS DE PROVA COM OS MEIOS DE DESINFECÇÃO	71
3.3.1	Divisão dos grupos.....	71
3.4	CRESCIMENTO DE BIOFILME	72
3.5	ENSAIO DE EXPRESSÃO GÊNICA	72
3.5.1	Coleta e armazenamento das células do biofilme e plantônicas	72
3.5.2	Ensaio de expressão gênica (RT-PCR em tempo real).....	73
3.5.3	Extração de RNA das células fúngicas	73
3.5.4	Quantificação e qualificação do RNA total	75
3.5.5	RT-PCR em tempo real, de etapa única	76
3.6	Análise estatística dos dados.....	78
4.	RESULTADOS.....	79
5	DISCUSSÃO	97
6	CONCLUSÕES	109
7	REFERÊNCIAS.....	113

1 Introdução e Síntese Bibliográfica

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Candida albicans*

O fungo do gênero *Candida* pode ser encontrado em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis (AKPAN; MORGAN, 2002; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003) como um organismo comensal, não causando danos aparentes nem induzindo inflamação nos tecidos adjacentes (AKPAN; MORGAN, 2002) (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003) Contudo, sob certas condições predisponentes, o fungo pode multiplicar-se, tornando-se patogênico, e penetrar nos tecidos do hospedeiro causando inflamação e destruição tecidual (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; HUBE, 2004; KOZIOL-MONTEWKA et al., 2006).

Mais de 200 espécies de *Candida* já foram descritas, mas somente 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003). As espécies mais comuns são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guillierimondii*, *C. krusei* (AKPAN; MORGAN, 2002; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000), *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea* (AKPAN; MORGAN, 2002).

A *C. albicans* pode ser classificada como um fungo assexual diplóide, (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999) de forma arredondada ou ovalada, de 3 a 5 µm, Gram positivo e com metabolismo principalmente aeróbio (UREÑA, 1995). Pode-se apresentar na fase de levedura (inócua) e fase de hifa ou micelial (patogênica) (BUNETEL; BONNAURE-MALLET, 1996; ROGERS; BALISH, 1980).

Alguns fatores de patogenicidade da *C. albicans* possibilitam o desenvolvimento de doenças com maior frequência do que outras espécies de *Candida*. Primeiramente, encontra-se na forma de levedura iniciando a lesão, mas variações nutricionais e ambientais modulam, com o tempo, sua conversão para a fase de hifa, aumentando sua virulência (UREÑA, 1995).

Infecções por *C. albicans* são comumente notadas em pacientes portadores de próteses totais, pacientes imunodeprimidos, que se submeteram a antibioticoterapia ou usuários de medicamentos que induzam à xerostomia (TOMMASI; BIRMAN, 2002).

1.2 Estomatite por prótese total

A estomatite por Prótese Total (EP) é definida como um processo inflamatório da mucosa oral associada à utilização de prótese total removível. Em 1936, esta patologia foi relacionada à infecção por *Candida sp.* (BARBEAU et al., 2003) e esta relação tem se confirmado em vários outros trabalhos (BUDTZ-JORGENSEN, 1970; CEBALLOS; GONZALEZ-MOLES; URQUIA, 1990; FOTOS; HELLSTEIN, 1992; OLSEN, 1974).

A prevalência de EP foi reportada entre 11 a 67% (ARENDORF; WALKER, 1987), e a sua frequência aumenta com a idade (DAVENPORT, 1970), sendo observada, principalmente, na mucosa palatina a qual suporta as próteses totais (WEBB et al., 1998). Pode estar associada à queilite angular, glossite atrófica, candidose pseudomembranosa aguda e candidose hiperplásica crônica. A condição é geralmente assintomática, mas quando sinais e sintomas estão presentes, é relatado sangramento da mucosa, sensação de ardor, sabor desagradável, boca seca e halitose (ARENDORF; WALKER, 1987).

Existem diversas propostas de diferentes autores (BERGENDAL, 1982; BERGENDAL; ISACSSON, 1983; BUDTZ-JORGENSEN, 1970) para a classificação das diferentes formas de apresentação da EP. Uma das mais difundidas é a classificação de Newton, (NEWTON et al., 1962) por ser considerada simples e objetiva. Assim, segundo o autor, a estomatite por prótese total é classificada em três tipos:

Tipo I: refere-se ao estágio inicial, onde se apresentam pontos hiperêmicos localizados.

Tipo II: considerada o mais comum dos tipos de estomatite; apresenta-se

como eritema difuso e edema da superfície mucosa, demarcado pela área marginal da prótese. A condição não é dolorosa e pode se associar a queilite angular.

Tipo III: acredita-se que é desenvolvido a partir de uma estomatite tipo II não tratada por um longo período. Apresenta-se como uma região hiperplásica resultando numa lesão nodular associada a áreas atróficas, referidas como hiperplasia papilar.

O tipo I está relacionado principalmente a traumas localizados, de origem protética que, associados ao acúmulo de placa microbiana (bacteriana ou fúngica) na superfície interna da prótese total e na mucosa subjacente, poderiam desencadear um quadro patológico difuso (Newton II e III) (ARENDORF; WALKER, 1979; BUDTZ-JORGENSEN, 1974).

A EP é uma doença bucal debilitante que pode reduzir drasticamente a qualidade de vida de alguns indivíduos. Muitos usuários de próteses removíveis desconhecem que têm candidose bucal e isto pode levar a um risco potencial de complicações a longo período, principalmente se seu estado imunológico se alterar (COCO et al., 2008).

Embora estudos correntes indiquem que a EP esteja geralmente associada com a presença do fungo *C. albicans* na saliva, na mucosa bucal e/ou na superfície interna da prótese removível (ARENDORF; WALKER, 1987; BARBEAU et al., 2003; CAMPOS et al., 2008; CUMMING et al., 1990; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; EMAMI et al., 2007; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007; IACOPINO; WATHEN, 1992; KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; PIRES et al., 2002; RAMAGE et al., 2004; WEBB et al., 1998; WILSON, 1998; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006), outros fatores também podem predispor seu desenvolvimento como os relacionados ao uso da prótese, à microbiota e às condições sistêmicas do hospedeiro.

Os fatores relacionados à prótese incluem trauma geralmente decorrente de próteses antigas, limpeza inadequada, uso noturno, presença de asperezas e microporos na superfície acrílica da mesma, além de alterações no pH do biofilme microbiano aderido à prótese. A ausência de higiene bucal e da prótese promove um ambiente favorável à proliferação de microrganismos, principalmente entre a mucosa

de suporte e a própria superfície da prótese (FIGUEIRAL et al., 2007). Destaca-se que outros microrganismos como, por exemplo, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. guilliermondi* também podem colaborar para a patogênese da doença, no entanto, o fungo *C. albicans* é o mais freqüentemente associado (ARENDORF; WALKER, 1987; BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; EMAMI et al., 2007; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007; FREITAS et al., 2008; IACOPINO; WATHEN, 1992; PIRES et al., 2002; RAMAGE et al., 2004; WILSON, 1998; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006). Os fatores de risco para a instalação da EP relacionados às condições sistêmicas do hospedeiro incluem xerostomia, hipersensibilidade ao material protético, diabetes (DOROCKA-BOBKOWSKA; BUDTZ-JORGENSEN; WLOCH, 1996) e outras desordens endócrinas (hipoadrenalismo, hipotireoidismo e hipoparatiroidismo), alterações imunológicas, uso prolongado de esteróides, quimioterapia e radioterapia (GONSALVES; WRIGHTSON; HENRY, 2008), uso de drogas psicotrópicas e hipossalivatórias, assim como deficiência nutricional de vitamina B12, ácido fólico e ferro (ARENDORF; WALKER, 1987; BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; EMAMI et al., 2007; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; FIGUEIRAL et al., 2007; FREITAS et al., 2008; IACOPINO; WATHEN, 1992; PIRES et al., 2002; RAMAGE et al., 2004; WILSON, 1998; ZISSIS; YANNIKAKIS; HARRISON, 2006).

1.3 Biofilme em próteses totais

O biofilme microbiano presente nas próteses com base de resina acrílica é considerado um biofilme complexo, formado por leveduras, bactérias e células epiteliais descamativas (SATO et al., 1997). As formas mais comuns de bactérias isoladas de biofilmes presentes nas próteses são os bacilos e os cocos, especialmente as espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria*, *Lactobacillus* e *Actinomyces* (BAENA-MONROY et al., 2005; SATO et al., 1997). Tem sido sugerido que, na EP, as bactérias possivelmente favorecem a adesão de blastóporos (comensais) às superfícies internas das próteses por coagregação (SATO et al., 1997) o que é ainda mais significativo na presença de dieta rica em carboidratos (NIKAWA et al., 1997).

À semelhança de outros microrganismos presentes na cavidade bucal, a *C. albicans* possui a habilidade de adesão às resinas das próteses totais, quer seja diretamente ou através de uma camada intermediária formada por placa bacteriana (CHANDRA et al., 2001a).

Após a adesão à superfície, inicia-se o processo de formação do biofilme. Em contraste à vasta descrição dos biofilmes bacterianos, pouca atenção era dada aos biofilmes formados exclusivamente por fungos. Porém, devido às respostas inflamatórias que podem ocorrer nas mucosas bucais, decorrente do contato com as próteses totais, essa estrutura complexa tornou-se alvo de interesse de diversos autores (CHANDRA et al., 2001a; CHANDRA; ZHOU; GHANNOUM, 2005; DONLAN; COSTERTON, 2002; HAWSER; DOUGLAS, 1994; KUHN et al., 2002).

Os biofilmes são definidos como uma comunidade sésil caracterizada por células que formam microcolônias, e que estão irreversivelmente aderidas a um substrato, a uma interface, ou ainda uma às outras, embebidas numa complexa matriz extracelular de substâncias poliméricas, exibindo um fenótipo alterado no que diz respeito à taxa de crescimento microbiano e à transcrição genética (DONLAN; COSTERTON, 2002). Os biofilmes representam o tipo de crescimento microbiano predominante na natureza e são cruciais no desenvolvimento de infecções, uma vez que servem de nicho aos agentes patogênicos e estão associados a altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos (DONLAN, 2001; KUHN et al., 2002).

Os detalhes da formação do biofilme de *C. albicans* em lâminas de polimetilmetacrilato foram descritos na literatura (CHANDRA et al., 2001b). O processo de formação do biofilme desse fungo ocorre em basicamente três fases distintas: a) fase inicial (0 a 11 horas); b) fase intermediária (aproximadamente 12 a 30 horas) e c) fase de maturação (aproximadamente 38 horas a 72 horas).

Inicialmente, as células leveduriformes de *C. albicans* se aderem à superfície da lâmina, formando microcolônias. Nas primeiras 11 horas, as comunidades de *C. albicans* aparecem como uma camada de células, devido ao crescimento e agregação das colônias. Já o desenvolvimento da fase intermediária é caracterizado pela emergência e predominância de substância não celular (polimérica), a qual se assemelha a uma “névoa” que forma um filme e cobre as microcolônias do fungo.

Durante a fase de maturação, a quantidade de substância polimérica extracelular aumenta com o tempo de incubação e as comunidades de *C. albicans* são completamente cobertas por essa substância (CHANDRA et al., 2001b).

Segundo Vasilas et al. (1992)(VASILAS et al., 1992), um fator que pode beneficiar a proliferação de biofilmes de *C. albicans* na superfície da prótese total são as irregularidades presentes nesta superfície. Quando a resina acrílica apresenta rugosidade superficial acima de 0,02 µm, sua superfície torna-se passível de colonização (BOLLEN; LAMBRECHTS; QUIRYNEN, 1997), pois o crescimento em forma micelial da *Candida sp.* permite que esse fungo se desenvolva e se aloje no interior das ranhuras formadas, onde estará livre de forças externas de remoção, como o efeito autolimpante da saliva e da escovação, proporcionando um reservatório de fungos para uma futura reinfecção (SAMARANAYAKE, L.P.; MCCOURTIE; MACFARLANE, 1980). Além disso, as superfícies rugosas proporcionam colonização e maturação mais velozes da placa microbiana sobre a prótese (QUIRYNEN; BOLLEN, 1995).

1.4 Fatores relacionados à adesão, penetração e virulência da *C.albicans*

As manifestações de virulência dos fungos oportunistas como os do gênero *Candida* estão intimamente relacionadas com a presença de fatores predisponentes intrínsecos do hospedeiro, tais como idade avançada, gravidez, prematuridade, neoplasias, hemopatias, endocrinopatias, avitaminoses, tuberculose, AIDS; fatores extrínsecos, tais como uso de antibacterianos, corticóides, agentes antineoplásicos, terapia intravenosa prolongada (ELLIS; SPIVACK, 1967), intervenções cirúrgicas, agentes físicos e químicos (ZAITZ et al., 1998), bem como os fatores de virulência do fungo (HUBE, 2004).

Uma vez na boca, bactérias e fungos do biofilme microbiano, dentre elas a *C. albicans* encontram diversos locais de adesão como as células epiteliais da mucosa, da língua, ou as superfícies dos dentes, das próteses fixas e/ou removíveis e de outros microrganismos que já colonizam estas superfícies, promovendo ancoragem para hifas e permitindo seu crescimento através do tecido epitelial (VITKOV et al., 2002).

A adesão desse fungo à superfície de células epiteliais mucosas ou superfícies inertes é um evento primário necessário para a sua colonização e desenvolvimento da patogênese (BURFORD-MASON; WEBER; WILLOUGHBY, 1988; NIKAWA et al., 1991). Para iniciar a doença, a *C. albicans* deve aderir a células epiteliais da mucosa bucal e, subseqüentemente, o fungo invade e destrói estas células (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000).

A adesão envolve interações entre as células fúngicas e as superfícies do hospedeiro (CANNON; CHAFFIN, 2001), sendo promovida por alguns componentes da parede celular do fungo como manose, receptores C3d, manoproteínas, sacarinas e adesinas. O grau de hidrofobicidade e a habilidade de se ligar à fibronectina do hospedeiro também são relatados como importantes mecanismos utilizados nos estágios iniciais da infecção (AKPAN; MORGAN, 2002).

A capacidade de transformação fenotípica em diversos nichos e de responder ao sistema imunológico do hospedeiro faz da *C. albicans* um patógeno versátil e bem adaptado. O dimorfismo representa a habilidade desse fungo de se desenvolver em diferentes formas morfológicas: leveduras e filamentosas (hifas ou pseudohifas). Essa última forma é mais virulenta e invasiva devido à capacidade de aderir ao tecido epitelial e penetrar nas células do hospedeiro (HOWLETT; SQUIER, 1980; VITKOV et al., 2002).

A flexibilidade fenotípica provavelmente é resultado de condições locais sob a prótese, como a baixa pressão de oxigênio, o baixo pH, a composição do biofilme da prótese bem como o acúmulo de células epiteliais descamativas (EMAMI et al., 2007). Essas condições conferem à *C. albicans* a capacidade de expressar vários fatores de virulência ou alterar seu perfil antigênico, facilitando a colonização e a adaptação em diferentes micronichos durante a infecção (EMAMI et al., 2007; KUMAMOTO; VINCES, 2005b, 2005a).

Durante a penetração da *C. albicans* na mucosa epitelial, ocorre uma deformação dos queratinócitos do hospedeiro (VITKOV et al., 2002), sugerindo que a hifa produz uma força mecânica que auxilia sua endocitose. Para atravessar a barreira endotelial, o fungo induz sua endocitose via célula endotelial, destruindo a célula do hospedeiro (KUMAMOTO; VINCES, 2005a).

A forma filamentosa também é considerada um importante fator de virulência, pois os genes que controlam a morfologia das hifas são corregulados por genes que codificam outros fatores de virulência como as proteases e adesinas (KUMAMOTO; VINCES, 2005b, 2005a; PHAN; BELANGER; FILLER, 2000).

Outro fator que contribui para o processo de virulência dos fungos patogênicos é a produção de enzimas hidrolíticas (IBRAHIM et al., 1998; OGRYDZIAK, 1993), com destaque para aspartil proteinase (SAP), enzimas fosfolipase B e lípases.

1.5 Genes da família ALS e gene HWP1

A família de genes ALS (Agglutinin-like sequence) tem relação com a adesão de *C. albicans*. Essa família é formada por pelo menos nove genes e foi primeiramente descrita em cepas de *C. albicans*. Sua regulação é controlada por condições fisiológicas e morfológicas específicas, bem como estágio de crescimento do fungo (HOYER, 2001).

Os trabalhos na literatura que estudam os genes da família ALS são recentes e pertencem basicamente à área médica ou biológica (HOYER, 2001; HOYER et al., 2008; NAILIS et al., 2006; NAILIS et al., 2010) e poucos estudos com este enfoque foram publicados na área odontológica (GREEN et al., 2004; YEATER et al., 2007). Apesar do conhecimento prévio sobre a formação de biofilme de *C. albicans* em próteses totais (CHANDRA et al., 2001a), somente a partir de 2004 foram realizados experimentos que comprovassem, em nível biomolecular, a expressão de genes da família ALS em biofilmes puramente fúngicos extraídos de modelos de dentaduras (GREEN et al., 2004).

Green e colaboradores em 2004 foram os primeiros a estudar a expressão de genes ALS, em cepas de *C. albicans*, durante as três etapas de formação de biofilme (6, 12 e 48 horas), utilizando a técnica de RT-PCR. No experimento desses autores, foi comparada a expressão dos genes ALS1-9 em biofilmes formados sobre diferentes substratos: epitélio humano recostituído (RHE, cateter e dentadura), e os resultados revelaram uma expressão similar nesses três substratos, com expressão

de todos os genes, exceto ALS6 e ALS7, que apresentaram expressão baixa ou ausente. Assim, ficou provado que o biofilme formado na superfície de próteses totais possui características de patogenicidade e deve ser controlado, a fim de prevenir e tratar infecções decorrentes de *C. albicans* (GREEN et al., 2004).

O gene HWP1 (Hyphal wall protein) de *C. albicans*, o qual expressa a proteína de parede de hifas com similaridades a pequenas proteínas ricas em prolina, é um substrato para transglutaminases, com as quais se liga covalentemente e funciona como uma importante adesina para a patogênese da candidose (PONNIAH et al., 2007; ROMEO; RACCO; CRISEO, 2006; STAAB et al., 1999; STAAB; SUNDSTROM, 1998). Estudos in vitro demonstraram a presença de grande quantidade de HWP1 na parede de hifas, e quantidades pequenas ou imperceptíveis nas leveduras (NAGLIK et al., 2006). Cepas de *C. albicans* sem HWP1 são incapazes de formar adesões estáveis com células epiteliais bucais e têm reduzida capacidade de causar candidose sistêmica em ratos (STAAB et al., 1999).

1.6. PCR em tempo real como ferramenta para avaliação da expressão dos genes ALS e HWP1

Determinar o quanto certos genes estão envolvidos na formação do biofilme é importante para o desenvolvimento de estratégias de controle de sua patogenicidade.

Muitas tecnologias de biologia molecular, como a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e outras tecnologias para avaliar a expressão de genes in vivo são citadas na literatura como forma de análise da expressão de genes de *C. albicans* durante seu processo de infecção (HUBE, 2004).

Para a avaliação da expressão de um gene em uma célula ou tecido, uma cadeia simples de RNA é adotada como molde (SANTOS et al., 2004). O RT-PCR convencional combina a síntese de cDNA (DNA complementar) a partir de um molde de RNA com a reação de PCR, como forma de promover um método

fácil, rápido e sensível de análise da expressão de genes. Esse método foi bastante utilizado para verificar a expressão de genes em biofilmes de *C. albicans* (GREEN et al., 2004). No entanto, por tratar-se de uma avaliação qualitativa apenas, tem sido substituído pelo método de PCR em tempo real, o qual permite a análise quantitativa da expressão gênica, por meio da avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo.

As características positivas do PCR em tempo real são a rapidez, a especificidade, a sensibilidade e a quantificação. Sua etapa de amplificação é dividida em três fases: a linha basal, na qual não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase log, em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo e a fase platô, onde não há mais aumento no número de produtos.

No PCR em tempo real existem dois métodos de quantificação: a detecção não-específica e a específica. O SYBR Green é o exemplo mais utilizado de detecção não-específica, no qual fluoróforos se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência. O TaqMan e o Molecular Beacon são sondas altamente específicas à sequência alvo, liberando fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse (BESSION, KAZANJI ., 2009).

O PCR em tempo real foi utilizado em estudos recentes envolvendo a análise da expressão dos genes da família ALS e do gene HWP1 em biofilmes e células planctônicas de *C. albicans* (NAILIS et al., 2006; NAILIS et al., 2010). No entanto, nenhum destes estudos utilizava resina acrílica como substrato de crescimento do biofilme fúngico.

Destaca-se que não foram encontrados trabalhos na literatura especializada que analisaram, em nível biomolecular, a expressão de genes ALS e HWP1 pela *C. albicans* em biofilmes formados sobre próteses dentárias após a utilização de métodos de desinfecção.

1.7 Controle de biofilme em prótese total pelo uso de hipoclorito de sódio e microondas

Vários estudos demonstraram que as colônias de *Candida spp.* são mais freqüentemente isoladas da superfície interna das próteses totais do que da mucosa correspondente (ARENDORF; WALKER, 1979; BANTING; HILL, 2001; DAVENPORT, 1970; MAHONEN; VIRTANEN; LARMAS, 1998). Esse fato sugere que o tratamento para a EP deva ser direcionado primariamente à prótese (DAVENPORT, 1970), uma vez que as colônias de *Candida spp.* presentes nas superfícies de resina acrílica podem causar re-infecção da mucosa do paciente (DAVENPORT, 1972).

Desse modo, para o tratamento de EP torna-se fundamental a adoção de métodos que reduzam ou, preferencialmente, eliminem os microrganismos das superfícies das próteses, sobretudo as espécies *Candida*.

Controlar a formação do biofilme microbiano na prótese é imprescindível para a manutenção da saúde dos seus usuários. Isto deve ser promovido por meio de técnicas diárias de higienização e desinfecção das mesmas, realizadas pelo próprio paciente, orientado sempre pelo cirurgião-dentista. Essa rotina de limpeza objetiva remover e prevenir o acúmulo de biofilme microbiano, mucina, restos de alimentos, cálculo e coloração exógena (BUDTZ-JORGENSEN, 1979).

O uso de microondas tem sido sugerido como método de desinfecção de próteses. O mecanismo pelo qual a energia de microondas atua sobre os microrganismos ainda não foi completamente elucidado, embora alguns pesquisadores acreditem que seja o resultado de um efeito térmico (ROHRER; BULARD, 1985). Além disso, estudos sugerem que, além do calor gerado ao redor dos microrganismos, existem outros mecanismos resultantes diretamente da interação do campo eletromagnético (ROHRER et al., 1986) ocasionando mudanças intracelulares específicas induzidas pelas microondas (ROHRER; BULARD, 1985).

As mudanças estruturais na camada mais periférica ao redor das macromoléculas biológicas podem alterar sua estabilidade e função, e, conseqüentemente, essas moléculas podem ser desnaturadas de forma irreversível.

Outras possíveis explicações incluem fenômenos na parede da membrana celular tais como alterações na permeabilidade seletiva e ressonância molecular, o que resulta em clivagem. Existe o consenso na literatura com relação à presença ou não de efeitos não-térmicos, entretanto há forte indicação de que a presença de água, tanto no meio circundante quanto no interior das células, influencia as alterações celulares produzidas pelas microondas (NEPPELENBROEK, 2005).

Comparada aos métodos de penetração de calor, a irradiação por microondas permite um aquecimento à temperatura desejada em um tempo muito curto (SASAKI et al., 1998), sendo apropriada para a esterilização de produtos instáveis à alta temperatura (TATE et al., 1995). Por isso, o aquecimento através das microondas pode ser efetivamente utilizado para aumentar a garantia da esterilização de próteses, as quais não podem ser esterilizadas por métodos térmicos convencionais (SASAKI et al., 1998).

O princípio de aquecimento através das microondas faz com que moléculas polares como a água, a gordura, os aminoácidos e as proteínas oscilem, visto que são moléculas eletricamente desequilibradas. A vibração molecular produz calor, e elevação na temperatura, e, possivelmente, alguma degradação das moléculas afetadas. O processo é rápido e não afeta moléculas não polares, tais como as dos metais (KINDLE et al., 1996).

Os microrganismos contêm moléculas polares, que quando excitadas em alta frequência, causam desagregação da estrutura microbiana (HUME; MAKINSON, 1978). Moléculas polares como a água e o monômero da resina acrílica vibram bilhões de ciclos por segundo quando expostas ao campo elétrico das microondas (MELOTO et al., 2006).

Muitos protocolos de desinfecção com uso de microondas, a maioria realizada em condições secas, foram testados e recomendados (BAYSAN; WHILEY; WRIGHT, 1998; ROHRER; BULARD, 1985; WEBB et al., 1998). A colocação dos espécimes em água durante a exposição às microondas promove um aquecimento uniforme do material (DIXON; BREEDING; FALER, 1999). Esse procedimento tem sido considerado adequado para destruir microrganismos mesmo aqueles presentes nos poros dos materiais.

Diversos estudos da literatura abordaram a desinfecção de resinas acrílicas por microondas (BANTING; HILL, 2001; ROHRER; BULARD, 1985; WEBB et al., 1998) e muitos protocolos foram estabelecidos, variando a potência e o tempo de exposição (BAYSAN; WHILEY; WRIGHT, 1998; BURNS et al., 1990; DIXON; BREEDING; FALER, 1999; NEPPELENBROEK, 2003; SILVA, 2005).

Outro método de desinfecção de próteses totais bastante adotado é a imersão em soluções desinfetantes.

A desinfecção provoca a destruição da maioria dos microrganismos patogênicos, sendo que a redução dos níveis de contaminação microbiana depende do tipo de desinfetante, concentração do mesmo, tempo de contato, espectro de atividade antimicrobiana, temperatura e reutilização (MERCHANT, 1997).

Os procedimentos de desinfecção podem ser realizados por meio de imersão na solução desinfetante ou por spray de desinfetante aplicado sobre as superfícies. No entanto, sempre que possível, a imersão deve ser utilizada, pois esse método assegura a exposição de todas as superfícies do objeto pela substância química durante o período recomendado (MERCHANT; MOLINARI, 1989; MERCHANT, 1997)

Para serem considerados ideais, os desinfetantes químicos devem ter espectro antimicrobiano o mais amplo possível; ação rápida sobre formas vegetativas e esporos de bactérias e fungos, protozoários e vírus; não ser afetado por fatores físicos, tais como matéria orgânica (sangue, saliva), outros sabões, detergentes ou substâncias químicas; ser atóxicos aos tecidos; inodoros; econômicos; de fácil utilização; e ao mesmo tempo não promover alterações superficiais que causem danos ao objeto desinfetado (COTTONE; MOLINARI, 1987; MOLINARI et al., 1988; MOLINARI; MERCHANT; GLEASON, 1990; MOLINARI; RUNNELLS, 1991).

Obviamente, nenhum desinfetante disponível preenche todos os critérios de um desinfetante ideal (MOLINARI; RUNNELLS, 1991; WHITACRE, 1991). Deve-se considerar que a eficácia dos desinfetantes de superfície e de imersão depende de vários fatores: concentração e tipo de microrganismos, concentração da substância química, tempo de exposição, quantidade de resíduos orgânicos acumulados

(MOLINARI; RUNNELLS, 1991; RUTALA; WEBER, 1997), natureza do objeto (se possui poros) e o pH da solução (RUTALA; WEBER, 1997).

Dentre as soluções desinfetantes mais utilizadas, destaca-se o hipoclorito de sódio. Os hipocloritos são os compostos de cloro mais antigos e mais amplamente utilizados no campo da desinfecção química, pois são germicidas poderosos, de amplo espectro antimicrobiano, não prejudiciais ao ser humano nas concentrações comercializadas, sem resíduos nocivos nem alteração da cor da solução e por serem de fácil manuseio e baixo custo (BLOCK, 1991).

O objetivo da imersão das dentaduras em soluções desinfetantes é a obtenção da descontaminação das próteses (ASAD; WATKINSON; HUGGETT, 1992). Desta forma, essas soluções atuam no tratamento e na prevenção da EP. Além disso, visto que as próteses totais ficam expostas a microrganismos patogênicos orais e não-orais, que incluem bactérias, vírus e fungos, as soluções desinfetantes recebem uma importância adicional, pois quando usadas após a retirada e antes da inserção da prótese na boca, representam um método recomendado no controle da infecção cruzada no consultório odontológico e no laboratório de prótese (BRACE; PLUMMER, 1993; LIN et al., 1999).

O hipoclorito de sódio existe unicamente em solução aquosa e é amplamente utilizado no campo da desinfecção química em odontologia, pois apresenta uma série de propriedades, tais como: atividade antimicrobiana e desodorizante, baixo custo, fácil manuseio, e baixa tensão superficial. Entretanto, deve ser utilizado com cautela por ser corrosivo em certos metais, sobretudo o alumínio (FUKUZAKI, 2006).

Diversos estudos demonstraram que o hipoclorito de sódio apresenta excelente atividade antimicrobiana. No entanto, o mecanismo exato pelo qual esta substância destrói microrganismos ainda não foi bem elucidado. Alguns autores acreditavam que o efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio dava-se pela liberação de oxigênio nascente por parte do ácido hipocloroso, o qual supostamente destruiria o microrganismo por meio da formação de radicais oxigenados tóxicos. Esta teoria parece infundada, uma vez que outros compostos que liberam uma quantidade muito maior de oxigênio nascente, como a água oxigenada, não

destroem o microrganismo tão rapidamente quanto os compostos clorados (LOPES; SIQUEIRA JUNIOR; ELIAS, 1999).

Deste modo, sabe-se que a ação desinfetante de substâncias cloradas deve-se à liberação de cloro. Apesar de o hidróxido de sódio gerado pela reação do hipoclorito com a água também apresentar eficácia antimicrobiana, sabe-se que a formação de compostos contendo cloro ativo, como o ácido hipocloroso e o íon hipoclorito é a principal responsável pela excelente atividade antimicrobiana da solução clorada (LOPES; SIQUEIRA JUNIOR; ELIAS, 1999).

Dois efeitos antimicrobianos têm sido atribuídos ao cloro: inibição enzimática e formação de cloraminas, após reação com componentes do citoplasma microbiano. Muitas enzimas microbianas contêm o aminoácido cisteína, tendo assim cadeias laterais terminando em grupamentos sulfidríla (SH). Tais enzimas apenas exercem suas funções se o grupamento SH estiver livre e reduzido.

O cloro é um forte agente oxidante que promove a oxidação irreversível de grupamentos SH de aminoácidos e proteínas microbianas para a forma de sulfetos (S-S). Evidentemente, tal efeito se dá tanto em proteínas associadas à membrana quanto sobre as proteínas presentes no citoplasma. Uma vez que as enzimas são proteínas especializadas, e como as proteínas são oxidadas pelo cloro, importantes reações metabólicas passam a ser interrompidas, originando a morte celular (ESTRELA et al., 2002; WEBB et al., 1995; LOPES; SIQUEIRA JUNIOR; ELIAS, 1999).

O cloro também pode reagir com o grupamento amina (NH) de proteínas citoplasmáticas, formando cloraminas, compostos de reconhecida toxicidade, os quais interferem com o metabolismo celular. Todavia, como o efeito microbicida do cloro se dá rapidamente, mesmo em baixas concentrações, as reações de oxidação enzimáticas parecem preceder o acúmulo de cloraminas no citoplasma microbiano, sendo, por esta razão, o principal mecanismo envolvido na destruição da célula microbiana (ESTRELA et al., 2002; LOPES; SIQUEIRA JUNIOR; ELIAS, 1999). Além desses efeitos, o hipoclorito de sódio também causa danos à parede e membrana celular (FUKUZAKI, 2006), assim como ao DNA (LOPES; SIQUEIRA JUNIOR; ELIAS, 1999).

Considerando essas propriedades, os hipocloritos alcalinos podem ser utilizados na desinfecção de próteses totais, pois removem manchas, dissolvem a mucina e outras substâncias orgânicas e são bactericidas e fungicidas. Além disso, estes não dissolvem cálculos, mas podem inibir sua formação em próteses por dissolver a matriz orgânica do biofilme (BUDTZ-JORGENSEN, 1979; LIMA et al., 2006).

Muitos autores testaram a desinfecção de resinas acrílicas por hipoclorito de sódio e diversos são os protocolos de desinfecção publicados (AZEVEDO et al., 2006; BELL et al., 1989; CHAU et al., 1995; COTTONE; MOLINARI, 1987; GHALICHEBAF; GRASER; ZANDER, 1982; HENDERSON et al., 1987; MA; JOHNSON; GORDON, 1997; MCGOWAN; SHIMODA; WOOLSEY, 1988; NEPPELENBROEK et al., 2005; PAVARINA et al., 2003; RUDD et al., 1984; SAUNDERS et al., 1998; WEBB et al., 1998; YILMAZ et al., 2005).

Independente do método de desinfecção eleito, microondas ou hipoclorito de sódio, a escolha do tempo de imersão e da concentração do produto deve ser baseada na eficácia de desinfecção e no menor dano causado ao material de confecção da base da dentadura (MACHADO et al., 2009).

Até o momento, nota-se uma preocupação das publicações científicas em estudar a formação de biofilmes protéticos e qual o método de desinfecção mais indicado para promover seu controle (DOVIGO et al., 2009; MIMA et al., 2008; NEPPELENBROEK et al., 2008). Porém, existe uma carência de trabalhos cujo objetivo é avaliar o biofilme formado sobre superfícies acrílicas após serem submetidas aos métodos de desinfecção.

Apesar de alguns relatos avaliarem as características biomoleculares que regem a expressão de genes associados à patogenicidade dos biofilmes formados sobre superfícies de resina acrílica, nenhuma informação foi encontrada a respeito da expressão desses genes em biofilmes formados sobre essas mesmas superfícies após tratamento desinfetante.

2 Proposição

2. PROPOSIÇÃO

A partir da revisão da literatura e questionamentos referentes ao tema, este trabalho se propôs à:

Detectar e quantificar, por meio de RT-PCR em tempo real de etapa única, a expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de *C. albicans*, em células planctônicas e em células de biofilme, em cada etapa de seu desenvolvimento, sobre superfícies de resina acrílica tratadas.

Comparar o padrão de expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de *C. albicans*, em células planctônicas e em células de biofilme, em cada etapa de seu desenvolvimento, de acordo com o tratamento da superfície de resina acrílica.

Investigar o efeito de dois métodos de desinfecção de próteses totais sobre a expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de *C. albicans*.

3 Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi realizado em quatro etapas. A primeira etapa compreende a confecção e o polimento dos 27 corpos de prova (CP) utilizados na pesquisa, bem como sua distribuição randomizada entre os grupos estudados. Na segunda etapa, os CP de cada grupo avaliado foram, inicialmente, submetidos aos tratamentos de desinfecção com hipoclorito de sódio 1% e microondas 650 W, para posteriormente serem inoculados com *C.albicans* para formação de biofilme, em três tempos de desenvolvimento: 6, 12 e 48 horas. A terceira etapa do experimento corresponde à extração de RNA das células do biofilme fúngico e células planctônicas, para posteriormente ser utilizado nos ensaios de PCR em tempo real, a última etapa do trabalho.

3.1. Confecção dos corpos de prova

3.1.1 Confecção dos padrões de silicone para inclusão

Para a confecção dos CP utilizados neste experimento, inicialmente foram obtidos padrões de silicone por condensação de uso laboratorial Zetalabor (Zhermack). Esses padrões foram confeccionados a partir de uma matriz em madeira, de forma retangular medindo 2,5 mm x 2,0 mm x 0,5 mm a qual foi preenchida com silicona de condensação de uso laboratorial Zetalabor e prensada entre duas placas de vidro (JON Com. de produtos odontológicos Ltda) previamente isoladas com vaselina sólida (Hemafarma Com. e Ind. Farmacêutica Ltda), sob peso de 5 kg, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, o padrão de silicone foi removido da matriz e os excessos foram cortados com auxílio de uma lâmina de estilete.

3.1.1.1. Inclusão

Os padrões de silicone foram retirados da matriz plástica e incluídos em muflas de latão polido com pino nº 6 (Mac Artigos odontológicos e prótese Ind. e Com. Ltda), anteriormente isoladas com vaselina sólida. Em seguida, as muflas metálicas foram preenchidas com gesso pedra tipo III (Vigodent S/A Ind. e Com.), manipulado e espatulado conforme orientações do fabricante, em cuba de borracha (Dentalbrand Comercial) com espátula para gesso (Indusbello Ind. de Instr. Odontológicos), sob vibração.

Após a polimerização, os padrões de silicone foram colocados sobre o gesso e uma nova camada deste foi colocada entre eles, a fim de fixá-los na mufla. Esperou-se o tempo de polimerização da segunda camada e em seguida, foi aplicada vaselina sólida em toda superfície. A contra mufla também recebeu uma camada de vaselina sólida nas suas superfícies internas e posteriormente, foi posicionada e devidamente preenchida com gesso pedra tipo III, conforme condições técnicas descritas anteriormente.

As muflas permaneceram na prensa hidráulica (VH Equipamentos Médicos Odont. Acess. Ltda) com 0,5 Kgf de pressão, por uma hora, e em seguida, foram abertas para a remoção das matrizes de silicone e realização do exame do molde no gesso, a fim de verificar a presença de bolhas (Figura 1).

Figura 1. Confeção e inclusão do padrão de silicone: (A) Matriz de madeira, padrões de silicone de condensação de uso laboratorial Zetalabor; (B) Isolamento das faces internas da mufla com vaselina sólida; (C) Posicionamento dos padrões de silicone sobre gesso tipo III; (D) Padrões de silicone fixados na mufla e isolados com vaselina sólida; (E) Contra-mufla isolada com vaselina sólida pronta para ser assentada; (F) Preenchimento da mufla com gesso tipo III; (G) Colocação da tampa; (H) Mufla na prensa hidráulica por 60 minutos; (I) Remoção das matrizes de silicone e exame dos moldes de gesso

3.1.1.2. Termopolimerização

Para prensagem, foi utilizada a resina acrílica termopolimerizável de cor rosa Lucitone 550 (Dentsply International INC.), homogeneizada com auxílio de uma espátula nº 31 (SS White Art. Dentários Ltda) em recipiente de vidro (Paladon, Pr. Ind. e Comércio de produtos odontológicos), utilizando-se a proporção de 21 g de pó para 10 mL de líquido, conforme orientações do fabricante. O interior dos moldes de gesso foi isolado com isolante para resina acrílica (S.S. White Artigos Dentários), com auxílio de um pincel de pêlo de marta (Condor S.A.) e preenchido com a resina

acrílica na fase plástica. A base da mufla foi coberta com uma folha de papel celofane e fechada com a sua respectiva porção superior para ser prensada em prensa hidráulica sob pressão inicial de 0,5 kgf. No momento em que o ponteiro da prensa hidráulica apresentou-se estável, a pressão foi aumentada para 1 kgf e por fim, até atingir 1,5 kgf. Após a estabilização do ponteiro em 1,5 kgf e escoamento completo do excesso da resina acrílica, a mufla foi novamente aberta, o papel celofane removido, e a película de resina acrílica excedente eliminada com o auxílio de uma espátula Lecron (S.S. White Art. Dentários Ltda). A mufla foi novamente fechada e levada para prensa hidráulica sob pressão de 1,5 kgf durante 30 minutos.

Decorrido esse período, a mufla foi colocada em uma prensa de aço inoxidável (Metal Vander Aparelhos para Ortodontia), passível de ser utilizada em polimerizadoras digitais, e levada em água à polimerizadora microprocessada digital, modelo Banho Maria (Solab), para que se procedesse a termopolimerização com a seguinte programação: a temperatura da água foi elevada até 73°C e mantida estável durante 90 minutos; em seguida, aumentou até atingir 100°C, que foram mantidos por mais 30 minutos.

3.1.1.3 Demuflagem

Após o período de polimerização dos CP, as muflas foram removidas da polimerizadora microprocessada digital e deixadas sobre a bancada para resfriar por um período de aproximadamente cinco horas. Após o resfriamento completo, procedeu-se a demuflagem dos CP. Posteriormente a demuflagem, os excessos (rebarbas) de resina acrílica foram desgastados com o auxílio de uma broca de tungstênio Maxicut nº79 (Edenta).

3.1.1.4. Acabamento dos corpos de prova

O acabamento dos CP foi realizado com auxílio de uma lixa d'água na granulação 80 (Norton Abrasivos) em politriz circular (Struers-Panambra) em baixa velocidade, sob refrigeração.

A escolha da granulação da lixa de polimento teve como objetivo promover uma superfície rugosa nos CP, de aproximadamente 2 μm , capaz de facilitar a adesão fúngica à superfície do acrílico (QUIRYNEN et al., 1990).

Em seguida, os CP foram submetidos à limpeza em ultrassom (Arotec Odontobrás) por 20 minutos em água destilada, para remoção de possíveis *debris* na superfície da resina. Posteriormente, foram deixados ao ar livres para secagem e enviados para esterilização por meio de óxido de etileno (Acecil – Central de esterilização comércio e indústria) (Figura 2).

Figura 2. Confeção dos corpos de prova em resina acrílica: (A) Resina termopolimerizável Lucitone 550; (B) Pó e acrílico proporcionados e misturados; (C) Isolamento do molde de gesso com Cel-Lac; (D) Colocação da resina acrílica, em fase plástica, no molde de gesso; (E) Posicionamento de plástico sobre a resina; (F) Colocação da mufla em prensa hidráulica; (G) Mufla aberta após 30 minutos na prensa hidráulica; (H) Mufla posicionada em prensa para ser polimerizada; (I) Termopolimerizadora digital; (J) Corpos de prova após demuflagem; (K) Desgaste dos excessos de resina com broca maxicut; (L) polimento dos corpos de prova e após serem esterilizados por óxido de etileno.

3.2 Inoculação dos corpos de prova

3.2.1. Preparo do inóculo de *C. albicans*

3.2.1.1. Obtenção da pré cultura

Foi utilizada a cepa de *C. albicans* selvagem SC5314 (GILLUM et al., 1984), cedida pelo Laboratório Especial de Micologia da Universidade Federal de São Paulo. O preparo do inóculo foi feito da seguinte maneira: as células foram mantidas a - 80°C em solução contendo 20% de glicerol e semeadas em placas contendo meio de cultura YPD (por litro: 10 g yeast extract, 10 g peptone, 20 g glucose [dextrose], 20 g Bacto agar) incubadas a 30°C durante 36 horas em estufa.

Uma única colônia de *C. albicans* foi removida, ressuspensa em 50 mL de meio de cultura YPD e mantida em incubadora (Nova Ética) a 30°C, sob agitação de 180 rpm overnight (aproximadamente 16 horas).

3.2.1.2. Purificação das células fúngicas

Foram retirados 5 mL da cultura e colocados em tubos Falcon de 15 mL para centrifugação a 4000 rpm por 5 minutos (Eppendorf do Brasil Ltda); em seguida, o sobrenadante foi descartado.

A purificação das células foi feita através de lavagem do pellet com PBS (5 mL), e homogeneização em vórtex seguida de nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, desprezando o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido duas vezes.

3.2.1.3. Contagem da concentração do inóculo

O pellet final, obtido após o processo de purificação das células, foi ressuspensa em 1 mL de PBS e diluído 1:10000. Uma alíquota da diluição foi colocada em câmara de Newbauer para contagem das leveduras em microscópio óptico comum (BIZERRA et al., 2008).

Depois de obtida a concentração final da suspensão, esta foi diluída em PBS para aquisição de inóculo em concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL (CHANDRA et al., 2001b).

3.3. Tratamento dos corpos de prova com os meios de desinfecção

3.3.1. Divisão dos grupos

Os CP, previamente esterilizados em óxido de etileno, foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=3) de tratamento:

Grupo 1: não tratado (controle).

Grupo 2: tratado por hipoclorito de sódio: imersão em 4 mL de hipoclorito de sódio 1% por 10 minutos (Farmácia Específica Manipulação de Fórmulas

Grupo 3: tratado por microondas: exposição a 650 W de potência (Brastemp) por 5 minutos, com os CP irradiados imersos em 200 mL de água destilada.

O tratamento químico foi efetuado no interior da câmara de fluxo (Trox Technik), retirando os CP do envelope de esterilização com o auxílio de uma pinça (SS White Duflex) esterilizada e imergindo-os, individualmente, em 5 mL de hipoclorito de sódio 1%, para posteriormente, lavá-los em 4 mL de PBS esterilizado por três vezes, para remoção de resíduos. O hipoclorito de sódio foi manipulado no mesmo dia do experimento, para garantir que sua concentração se mantivesse estável em 1%.

Para o tratamento com microondas, a manipulação dos CP também foi realizada no interior da câmara de fluxo. Os CP foram retirados dos envelopes de esterilização, com auxílio de uma pinça esterilizada, e colocados em um frasco reagente de polietileno (Hipperquímica) contendo 200 mL de água destilada.

Em seguida o frasco contendo os CP imersos em água, com a tampa semi-rosqueada, foi levado para o interior do forno de microondas e posicionado no centro do mesmo (RIBEIRO et al., 2008; MACHADO et al., 2009).

3.4. Desenvolvimento de biofilme

Após o tratamento de desinfecção, os CP foram colocados em placas de cultura de seis poços (Trasadingen) e foram aplicados, sobre sua superfície, 4 mL do inóculo de *C. albicans*, com concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL. O tempo de adesão foi de 90 minutos a temperatura de 37°C, sob agitação de 75 rpm, em incubadora (CHANDRA et al., 2001b). Após este período, as células que não aderiram ao acrílico foram removidas através de lavagem, imergindo suavemente os CP em 4 mL de PBS. Na sequência, os CP foram submersos em 4 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) e incubados a 37°C sob agitação de 75 rpm, para crescimento do biofilme (BIZERRA et al., 2008).

Foram examinadas três fases de crescimento de biofilme: inicial (6 horas), intermediária (12 horas) e madura (48 horas) (GREEN et al., 2004; YEATER et al., 2007).

3.5. Ensaio de expressão gênica

3.5.1. Coleta e armazenamento das células do biofilme e planctônicas

Para a coleta das células do biofilme após cada tempo de análise (6, 12 e 48 horas), os CP foram retirados do meio de cultura e lavados suavemente em um poço de placa de cultura contendo 4 mL de PBS, para remoção de células não aderidas. Imediatamente após a lavagem, os CP foram colocados em tubos Falcon (Trasadingen) de 50 mL, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA fúngico (ALMEIDA et al., 2008).

As células planctônicas, as quais não aderiram ao biofilme, foram aspiradas do poço de placa de cultura contendo, junto com o meio de cultura utilizado na formação do biofilme (RPMI 1640), e colocadas em tubos Falcon de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 5000 rpm, a temperatura de 4°C por 10 segundos a fim de proporcionar a precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o pellet foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C (ALMEIDA et al., 2008).

3.5.2. Ensaio de expressão gênica (RT-PCR em tempo real)

Para a coleta das células do biofilme após cada tempo de análise (6h, 12h e 48h), os corpos de prova foram retirados do meio de cultura e lavados suavemente em um poço contendo 4 mL de PBS, para remoção de células não aderidas. Imediatamente à lavagem, os corpos de prova foram colocados em tubos Falcon de 50 mL, congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a -80°C até o momento da extração do RNA fúngico.

As células planctônicas, as quais não aderiram ao biofilme, foram aspiradas do poço, junto com o meio de cultura utilizado na formação do biofilme (RPMI 1640), e colocadas em tubos falcon de 15 mL. Os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm, com temperatura de 4°C por 10 segundos, a fim de proporcionar a precipitação das células. O sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o pellet foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

3.5.3. Extração de RNA das células fúngicas

A extração de RNA total, para as amostras de biofilme de células planctônicas foi realizada utilizando o kit RiboPure™ – Yeast Kit (Ambion). Este kit foi extensivamente testado com várias espécies de levedura, inclusive *C. albicans*, o qual rompe as paredes celulares das leveduras através de lise mecânica (atrito das células com pérolas de zircônia, com diâmetro de 0,5mm).

Para a extração de RNA, os tubos com as amostras de biofilme e células planctônicas foram retirados do freezer a -80°C e mantidos em nitrogênio líquido até o momento do início da reação de lise celular. Inicialmente, foram preparados 2 grupos de tubos para microcentrifuga de 1,5 mL, em quantidade equivalente ao número de amostras, devidamente identificados. Um dos grupos foi preenchido com 750 µL de pérolas de zircônia, e o outro, com a combinação dos reagentes para lise celular: 480 µL de tampão para lise, 48 µL de SDS 10% (sabão de lise) e 480 µL de fenol.

Os reagentes para lise celular foram adicionados aos tubos contendo as amostras de biofilme (biofilme aderido ao corpo de prova) e pellet de células planctônicas, e agitados vigorosamente em vórtex por 10-15 segundos. Os corpos de prova foram raspados, no interior dos tubos Falcon, com a ponta da ponteira de uma pipeta e o produto raspado foi misturado por aspiração e liberação. Todo o conteúdo de biofilme e de células planctônicas foi transferido para os tubos contendo as pérolas de zircônia e agitados, vigorosamente, em vórtex, por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 16.200 rpm, a 4 °C, para separar a fase aquosa, contendo RNA, da fase orgânica. A fase aquosa (~ 500 µL) foi aspirada do tubo e transferida para um novo tubo, previamente armazenado em gelo, e foi adicionado 1,9 mL de binding buffer (tampão de ligação - liga o RNA à coluna de filtragem), 1,25 mL de etanol 100% (responsável por retirar água da molécula e facilitar sua precipitação), sendo esse conteúdo misturado suavemente por agitação.

Em seguida, realizou-se a lavagem final do RNA fúngico, transferindo 700 µL da amostra para um filtro de fibra de vidro, o qual foi centrifugado por 1 minuto a 16.200 rpm, a fim de filtrar a mistura. O RNA permaneceu aderido ao filtro e a solução foi descartada. A fim de lavar o filtro, foi adicionado a cada tubo 700 µL de solução de lavagem 1 e os mesmos foram centrifugados nas condições descritas anteriormente. Posteriormente, adicionou-se 500 µL da solução de lavagem 2/3 e realizou-se nova centrifugação. Esse processo foi repetido 2 vezes e na sequência, o filtro foi removido e transferido para um novo tubo de 2 mL, onde foram colocados 50 µL de água livre de RNase, para finalmente ocorrer nova centrifugação (Figura 3).

Figura 3. Extração do RNA total: (A): Separação da fase aquosa e orgânica após centrifugação; (B) Aspiração da fase aquosa; (C) Amostra de RNA após filtragem em coluna; (D) NanoDrop 1000, Thermo Scientific; (E) Real Time PCR System, Bio-Rad

3.5.4. Quantificação e qualificação do RNA total

A quantificação e a qualificação de RNA total de cada amostra foram calculadas por meio do aparelho Thermo Scientific Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Uniscience) que emite comprimentos de onda de 280 nm (A280) e 260 nm (A260). A quantidade de RNA total de cada amostra foi expressa em ng/ μ L. A qualidade do RNA foi mensurada pelo resultado da razão A260/A280. Variações de A260/A280 foram consideradas aceitáveis entre 1,9 e 2,1 (Figura 3).

3.5.5. RT-PCR em tempo real, de etapa única

A expressão quantitativa de genes de ALS1, ALS3 e HWP1 (gene constitutivo) foi analisada por meio de reações de PCR em tempo real, de etapa única, utilizando-se o kit Quantifast™ SYBR Green RT-PCR® (Quiagen) em um aparelho Mini Opticon Real Time PCR System (Bio Rad) (Figura 3).

O protocolo de RT-PCR em Tempo Real, de etapa única consiste em uma reação de transcrição reversa, responsável por obter uma cadeia de cDNA a partir de uma fita simples de RNA seguida por uma reação de PCR em tempo real. Para cada reação de PCR foram utilizados 80 ng de RNA total. Os tubos de reação foram preparados de acordo com as orientações do fabricante conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo da reação RT-PCR em tempo real de etapa única.

Componentes	Volume/reação
2x QuantiFast SYBR Green RT-PCR	10 µL
Master Mix	
Primer	1 µL (concentração final de 0,25 µM)
QuantiFast RT Mix	0,2 µL
Amostra de RNA	8 µL
Água livre de RNase	0,8 µL
Volume final da reação	20 µL

Os primers dos genes ALS1 e ALS3 foram obtidos a partir do estudo de Green et al. (2004), enquanto o primer do gene HWP1 foi obtido a partir do estudo de Gasparoto et al. (2009). Os primers estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados na reação de RT-PCR em tempo real de etapa única.

Alvos	Primers	Produto (pb)
ALS1	F: GACTAGTGAACCAACAAATACCAGA R: CCAGAAGAAACAGCAGGTGA	318
ALS3	F: CCA CTT CAC AAT CCC CAT C R: CAG CAG TAG TAG TAA CAG TAG TAG TTT CAT C	342
HWP1	F: GTTTTTGCAACTTCTCTTGTA R: ACAGTTGTATCATGTTTCAGT	1180

O conteúdo dos tubos foi devidamente homogeneizado e distribuído em duplicata, em microplaca de PCR de 48 poços (Axygen), e cada poço foi preenchido com 10 µL do conteúdo do tubo de reação para serem processados no termociclador Mini Opticon Real Time PCR System. As condições de ciclagem para cada gene analisado constam na Tabela 3.

Tabela 3. Condições de ciclagem do RT-PCR em Tempo Real.

Etapa	Tempo	Temperatura	Detalhamento da reação
Transcrição reversa	10 min.	50°C	DNA polimerase HotStarTaq <i>Plus</i> é ativada pela etapa de aquecimento
Etapa de ativação inicial da PCR	5 min.	95°C	
Segunda etapa			
Desnaturação	10 s.	95°C	
Anelamento e extensão (combinados)	30 s.	60°C (HWP1) 58°C (ALS1 e ALS3)	Detecção da fluorescência
Número de ciclos	45 ciclos		Número de ciclos depende da quantidade de RNA da amostra

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. O limiar para positividade da PCR em tempo real foi determinado com base em controles negativos (controle água). Os cálculos para a determinação do nível relativo de expressão gênica foram feitos conforme instrução oriunda do Boletim do Usuário (P/N 4303859) da Applied Biosystems. As médias dos valores de Ct das medidas das amostras em duplicata foram utilizadas para calcular a expressão do gene alvo, com normalização a um controle positivo (HWP1) por meio da seguinte fórmula: $2^{-(\Delta Ct)}$.

3.6. Análise estatística dos dados

Os dados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD) dos resultados obtidos para cada grupo de tratamento e para cada tempo de desenvolvimento do biofilme, para o biofilme e para as células planctônicas, e foram submetidos ao teste estatístico ANOVA two-way e pós-teste de Bonferroni,

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prisma 5 (PRISMA software, GraphPad). Valores de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ foram considerados significantes.

4 Resultados

4 RESULTADOS

O modelo experimental deste estudo incluiu um substrato (resina acrílica), tratado com 2 métodos de desinfecção (hipoclorito de sódio e microondas), além de um grupo controle (sem tratamento), inoculado com a cepa de *C.albicans* SC5314. Três tempos foram analisados, representando os períodos importantes de desenvolvimento do biofilme fúngico (fase inicial – 6 horas, fase intermediária – 12 horas e fase madura – 48 horas). As condições de crescimento da cultura de células planctônicas e os tempos de coleta foram os mesmos adotados para o crescimento de biofilme (Figura 4)

Figura 4: Desenvolvimento do biofilme e células planctônicas, no grupo não tratado e tratado por hipoclorito de sódio e microondas, após 12 horas de incubação.

Previamente ao experimento de RT-PCR em tempo real, foi realizado um protocolo para extração de RNA total das amostras de biofilme e células planctônicas. O resultado da análise quantitativa e qualitativa do RNA extraído encontra-se na Tabela 4. Todas as amostras de RNA foram padronizadas com 80ng de RNA total.

Tabela 4: Quantificação de RNA total extraído das amostras de biofilme e células planctônicas, de acordo com os tempos de incubação.

AMOSTRA	TEMPO	CONCENTRAÇÃO (ng/uL)	260/280 (nm)
Biofilme			
Não tratadas (1)	6 horas	356,22	2,18
Não tratadas (2)	6 horas	68,33	2,1
Não tratadas (3)	6 horas	437,37	2,12
Hipoclorito (1)	6 horas	503,23	2,16
Hipoclorito (2)	6 horas	180,85	2,15
Hipoclorito (3)	6 horas	266,4	2,16
Microondas (1)	6 horas	537,42	2,14
Microondas (2)	6 horas	433,76	2,09
Microondas (3)	6 horas	655,93	2,13
Não tratadas (1)	12 horas	409,24	2,16
Não tratadas (2)	12 horas	462,51	2,15
Não tratadas (3)	12 horas	160,75	2,16
Hipoclorito (1)	12 horas	300,25	2,17
Hipoclorito (2)	12 horas	65,77	2,07
Hipoclorito (3)	12 horas	307,53	2,16
Microondas (1)	12 horas	332,27	2,2
Microondas (2)	12 horas	39,88	2,08
Microondas (3)	12 horas	333,14	2,19
Não tratadas (1)	48 horas	50,88	2,03
Não tratadas (2)	48 horas	30,85	1,89
Não tratadas (3)	48 horas	124,57	2,14
Hipoclorito (1)	48 horas	220,61	2,15
Hipoclorito (2)	48 horas	134,98	2,07
Hipoclorito (3)	48 horas	205,62	2,16
Microondas (1)	48 horas	428,43	2,13
Microondas (2)	48 horas	208,17	2,19
Microondas (3)	48 horas	412,85	2,16
Planctônica			
Não tratadas (1)	6 horas	321,01	2,18
Não tratadas (2)	6 horas	278,12	2,18
Não tratadas (3)	6 horas	669,45	2,21
Hipoclorito (1)	6 horas	137,91	2,14
Hipoclorito (2)	6 horas	96,79	2,1
Hipoclorito (3)	6 horas	326,87	2,12
Microondas (1)	6 horas	207,27	2,17
Microondas (2)	6 horas	103,95	2,14
Microondas (3)	6 horas	133,7	2,08
Não tratadas (1)	12 horas	18,1	1,92
Não tratadas (2)	12 horas	9,68	2,13
Não tratadas (3)	12 horas	16,4	1,95
Hipoclorito (1)	12 horas	323,59	2,15
Hipoclorito (2)	12 horas	13,38	1,95
Hipoclorito (3)	12 horas	6,89	1,55
Microondas (1)	12 horas	127,91	2,07
Microondas (2)	12 horas	92,73	2,08
Microondas (3)	12 horas	182,02	2,15
Não tratadas (1)	48 horas	10,56	1,83
Não tratadas (2)	48 horas	13,06	2,01
Não tratadas (3)	48 horas	9,85	1,71
Hipoclorito (1)	48 horas	10,17	1,89
Hipoclorito (2)	48 horas	11,16	1,68
Hipoclorito (3)	48 horas	7,49	1,76
Microondas (1)	48 horas	8,77	1,83
Microondas (2)	48 horas	6,75	1,68
Microondas (3)	48 horas	7,56	1,96

Os ensaios de PCR-RT em tempo real foram fundamentais para a análise comparativa da expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 pelo biofilme e pelas células planctônicas, em cada um dos tempos de desenvolvimento do biofilme testados, de acordo com os tratamentos realizados nas resinas acrílicas para confecção de dentaduras. A análise da curva de *melting* confirma a presença dos produtos da PCR esperados e a ausência de produtos inespecíficos indesejados (Gráfico 1).

Gráficos 1: Amplificação exponencial e curva de dissociação da RT-PCR em tempo real: representação da amplificação exponencial dos genes HWP1 (A), ALS1 (B) e ALS3 (C), por RT-PCR em tempo real de etapa única e curva de dissociação das reações de RT-PCR em tempo real de etapa única dos genes HWP1 (D), ALS1 (E) e ALS3 (F)

O gene HWP1 foi adotado como controle positivo do RT-PCR em tempo real de etapa única, pois não apresentou diferenças significativas ($p=0,6882$) em sua expressão, nos três tempos de desenvolvimento do biofilme e nos três tratamentos propostos. Assim, a expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 foi calculada de acordo com a variação da expressão desses genes em relação à expressão do gene HWP1.

A expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de *C.albicans*, para cada tempo de desenvolvimento do biofilme, nos tratamentos estudados encontra-se descrita no Gráfico 2 .

**Diferem entre si a 0,01 pelo teste de Bonferroni;

*** Diferem entre si a 0,001 pelo teste de Bonferroni.

Gráfico 2: Expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 de *C.albicans*, nos tratamentos estudados, em 6 horas (A), 12 horas (B) e 48 horas (C) de desenvolvimento do biofilme.

A expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, em biofilmes desenvolvidos em 6 horas, nos tratamentos testados, está descrita na gráfico 2A. A expressão do gene ALS1 foi menor ($p<0,001$) em relação ao HWP1 (controle) nos três tratamentos. Para o gene ALS3, ocorreu maior expressão ($p<0,001$) em relação ao HWP1, nos grupos não tratado e tratado por hipoclorito de sódio. No grupo tratado por microondas, não ocorreu diferença significativa entre a expressão dos genes ALS3 e HWP1.

O Gráfico 2B descreve a expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, em biofilmes desenvolvidos em 12 horas, nos tratamentos testados. A expressão do gene ALS1 foi menor em relação ao HWP1, no grupo não tratado ($p<0,01$) e tratado por hipoclorito de sódio ($p<0,001$) e microondas ($p<0,001$). O gene ALS3 apresentou maior expressão ($p<0,001$) em relação ao gene HWP1 nos três tratamentos estudados, sendo o maior aumento observado no grupo tratado por hipoclorito de sódio, que foi 21 vezes mais expresso em relação ao gene HWP1 (Gráfico 2B).

A expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, em biofilmes desenvolvidos em 48 horas, nos tratamentos testados, está descrita no Gráfico 2C. Neste tempo de avaliação, a expressão dos genes ALS1 e ALS3 foi menor ($p<0,001$) em relação ao gene HWP1, nos três tratamentos realizados.

A expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 em células planctônicas de *C.albicans*, para cada tempo de desenvolvimento do biofilme, nos tratamentos estudados encontra-se descrita no Gráfico 3.

PLANCTÔNICAS

*Diferem entre si a 0,05 pelo teste de Bonferroni;

*** Diferem entre si a 0,001 pelo teste de Bonferroni.

Gráfico 3: Expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 em células planctônicas de *C.albicans*, nos tratamentos estudados, em 6 horas (A), 12 horas (B) e 48 horas (C) de desenvolvimento do biofilme.

A expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, em células planctônicas de *C. albicans* em 6 horas, nos tratamentos testados, está descrita no gráfico 3A. A expressão do gene ALS1 foi menor ($p<0,05$) em relação ao gene HWP1 no grupo não tratado, contudo, notou-se o inverso para os grupos tratados com hipoclorito de sódio e microondas. Nesses grupos, a expressão do gene ALS1 foi maior ($p<0,001$) em relação ao gene HWP1. Já para o gene ALS3, ocorreu aumento ($p<0,001$) de sua expressão em relação ao gene HWP1 em todos os tratamentos avaliados, sendo em torno de 50 vezes mais expresso que o gene HWP1 no grupo não tratado.

O Gráfico 3B descreve a expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, em células planctônicas, no tempo de 12 horas, nos tratamentos testados. A expressão do gene ALS1 foi menor ($p<0,001$) em relação do gene HWP1, para todos os tratamentos avaliados. O gene ALS3, por sua vez, foi mais expresso ($p<0,001$) em relação ao gene HWP1 em todos os tratamentos, sendo 23 vezes mais expresso que o gene HWP1 no grupo tratado por hipoclorito de sódio.

A expressão relativa (%) dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, em biofilmes desenvolvidos em 48 horas, nos tratamentos testados, está descrita no Gráfico 3C. A expressão do gene ALS1 foi menor ($p<0,001$) em relação ao gene HWP1, em todos os tratamentos estudados. Por outro lado, o aumento da expressão do gene ALS3 manteve-se ($p<0,001$) em relação ao gene HWP1, sendo 45 vezes maior que este no grupo tratado com hipoclorito de sódio.

No Gráfico 4 estão representados os gráficos da expressão relativa (%), dos genes ALS1 e ALS3, durante o período do experimento, para cada tratamento avaliado.

*** Diferem entre si a 0,001 pelo teste de Bonferroni.

Gráfico 4: Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme (A e C) e células planctônicas (B e D) de *C. albicans*, durante o período do experimento, para cada tratamento avaliado.

O Gráfico 4A indica a expressão do gene ALS1 em biofilme de *C. albicans*, nos três tratamentos testados, durante o período do experimento. Somente para o grupo não tratado ocorreu diferença significativa na expressão desse gene durante o período de tempo avaliado. Observou-se aumento ($p < 0,01$) da expressão do gene ALS1 em 12 horas, seguido da diminuição da sua expressão ($p < 0,001$) em 48 horas. Por outro lado, o gene ALS3 expresso em biofilmes apresentou diferença significativa em sua expressão durante o período do estudo, para todos os tratamentos avaliados (Gráfico 4C). Sua expressão no grupo não tratado diminuiu ($p < 0,001$) no biofilme intermediário (12 horas) e no biofilme maduro ($p < 0,001$). Para o grupo tratado com hipoclorito de sódio e microondas, observou-se aumento ($p < 0,001$) na expressão do gene ALS3 em 12 horas, seguido pela diminuição ($p < 0,001$) da sua expressão em 48 horas (Gráfico 4C).

Em relação às células planctônicas, a expressão do gene ALS1 no grupo não tratado não apresentou diferença significativa durante o período estudado (Gráfico

4B) Ocorreu diminuição da expressão do gene ALS1 ($p<0,001$) em 12 horas, somente para os grupos tratados com hipoclorito de sódio e microondas. Porém, entre 12 e 48 horas, esta diferença não foi observada (Gráfico 4B). Para o gene ALS3, no grupo não tratado, ocorreu diminuição ($p<0,001$) dos níveis de expressão em 12 horas, porém, não houve diferença significativa em sua expressão entre 12 e 48 horas. Tanto para o grupo tratado por hipoclorito de sódio, quanto para o grupo tratado por microondas, ocorreu aumento ($p<0,001$) da expressão do gene ALS3 em 12 horas, seguida pela diminuição ($p<0,001$) da sua expressão em 48 horas, para ambos os grupos (Gráfico 4D).

Os valores da expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme de *C.albicans*, para comparação entre o grupo não tratado e tratado com hipoclorito de sódio e microondas, em cada tempo de desenvolvimento do biofilme, estão apresentados no Gráfico 5.

*Diferem entre si a 0,05 pelo teste de Bonferroni;

*** Diferem entre si a 0,001 pelo teste de Bonferroni.

Gráfico 5: Expressão relativa (%) dos genes ALS1 (A) e ALS3 (B) em biofilme de *C.albicans*, nos tempos 6, 12 e 48 horas de desenvolvimento do biofilme, nos três tratamentos estudados.

A expressão do gene ALS1 em biofilme de *C. albicans* em cada um dos tempos estudados encontra-se no Gráfico 5A. Observou-se que no biofilme inicial (6 horas) houve diminuição significativa da expressão gênica apenas comparando o grupo tratado por microondas e o respectivo grupo não tratado. Porém, no biofilme intermediário (12h) e maduro (48h) houve uma redução significativa ($p<0,001$) na expressão do ALS1 nos tratamentos por hipoclorito de sódio e microondas, em relação ao grupo não tratado.

A análise da expressão do gene ALS3 em biofilmes de *C.albicans* está representada pelo Gráfico 5B. Verificou-se que em 6 horas de desenvolvimento do biofilme, a expressão do gene ALS3 foi menor ($p<0,001$) nos grupos tratados por hipoclorito e microondas em relação ao grupo não tratado. Contrariamente, no tempo de 12 horas, ocorreu maior expressão ($p<0,001$) do gene ALS3 no grupo tratado por hipoclorito e microondas em relação ao grupo não tratado. No biofilme maduro (48 horas) ocorreu menor expressão desse gene ($p<0,01$) no grupo tratado por hipoclorito em relação ao não tratado.

Os valores da expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em células planctônicas de *C.albicans*, para comparação entre o grupo não tratado e tratado com hipoclorito de sódio e microondas, em cada tempo de desenvolvimento do biofilme, estão apresentados no Gráfico 6.

A análise da expressão do gene ALS1 nas células planctônicas, em cada tempo de desenvolvimento do biofilme, encontra-se no Gráfico 6A. A expressão do gene ALS1, em 6 horas, foi maior ($p<0,001$) nas células planctônicas dos grupos tratados por hipoclorito de sódio e microondas, em relação ao grupo não tratado. De modo contrário ao tempo anterior, em 12 horas, a expressão do gene ALS1 apresentou redução ($p<0,001$) nos grupos tratados por hipoclorito de sódio e microondas em relação ao grupo não tratado. Em 48 horas, não ocorreu diferença significativa na expressão do gene ALS1 entre os tratamentos.

A expressão do gene ALS3 nas células planctônicas está representada no Gráfico 6B. Verificou-se que em 6 horas de desenvolvimento do biofilme, a expressão do gene ALS3 foi menor ($p<0,001$) nos grupos tratados por hipoclorito e microondas em relação ao grupo não tratado. Contrariamente, no tempo de 12 horas, ocorreu maior expressão ($p<0,001$) do gene ALS3 no grupo tratado por hipoclorito e microondas em relação ao grupo não tratado. Em 48 horas, não ocorreu diferença significativa na expressão do gene ALS3 entre os tratamentos.

A comparação entre os valores da expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme e células planctônicas de *C.albicans*, das amostras tratadas com hipoclorito de sódio e microondas, em cada tempo de desenvolvimento do biofilme, estão apresentados no Gráfico 7.

Gráfico 7: Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 em biofilme (A e C) e células planctônicas (B e D) de *C.albicans*, nos tempos 6, 12 e 48 horas de desenvolvimento do biofilme, nos tratamentos por hipoclorito de sódio e microondas.

Segundo o Gráfico 7A, a expressão relativa (%) do gene ALS1 em biofilme inicial (6 horas) de *C.albicans*, foi menor ($p<0,001$) no grupo tratado por microondas, em relação ao grupo tratado por hipoclorito de sódio. Porém, o inverso foi observado nos tempos seguintes. No biofilme intermediário (12 horas) e maduro (48 horas), a expressão de gene ALS1 foi maior ($p<0,001$) no grupo tratado por microondas, em relação ao grupo tratado por hipoclorito de sódio. A expressão relativa (%) do gene ALS3 foi menor ($p<0,001$) para o grupo tratado com microondas, em relação ao grupo tratado por hipoclorito de sódio apenas nos biofilmes de 6 e 12 horas. Não ocorreu diferença significativa na expressão desse gene em 48 horas, entre o grupo tratado por hipoclorito e tratado por microondas (Gráfico 7C).

Para as células planctônicas, não ocorreu diferença significativa na expressão relativa (%) do gene ALS1 entre os grupos tratados por hipoclorito de sódio e tratados por microondas, em todos os tempos estudados (Gráfico 7B). No entanto, para o gene ALS3 expresso pelas células planctônicas, observou-se menor expressão gênica ($p<0,001$) no grupo tratado por microondas, em relação ao grupo tratado por hipoclorito de sódio, nos tempos 6 e 12 horas. Em 48 horas, não foram observadas diferenças significativas na expressão do gene ALS3, entre os dois grupos (Gráfico 7D)

O Gráfico 8 apresenta a comparação dos genes ALS1 e ALS3, em relação a suas expressões relativas (%) em biofilme e células planctônicas, para cada tratamento, em cada tempo de desenvolvimento do biofilme estudado.

** Diferem entre si a 0,01% pelo teste de Bonferroni;
*** Diferem entre si a 0,001% pelo teste de Bonferroni.

Gráfico 8: Expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3, em biofilme e células planctônicas de *C.albicans*, de acordo com os três tratamentos adotados, nos tempos de 6 horas (A), 12 horas (B) e 48 horas (C).

No gráfico 8A está apresentada a expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 entre as células do biofilme e células planctônicas, no biofilme inicial (6 horas), nos três tratamentos. Para os três grupos estudados, ocorreu maior expressão ($p<0,001$) dos genes ALS1 e ALS3 nas células planctônicas, em relação às células do biofilme.

No Gráfico 8B está apresentada a expressão relativa (%) dos genes ALS1 e ALS3 entre as células do biofilme e células planctônicas, no biofilme intermediário (12 horas), nos três tratamentos. Não ocorreu diferença significativa na expressão dos genes ALS1 e ALS3, entre as células planctônicas e células do biofilme, nos três grupos de tratamento.

A comparação entre a expressão dos genes ALS1 e ALS3, em células planctônicas e células do biofilme, em biofilme maduro (48 horas) está representada pelo Gráfico 8C. No grupo não tratado, não ocorreu diferença estatística na expressão do gene ALS1 entre as células planctônicas e células do biofilme. Para o gene ALS3, a expressão foi maior ($p<0,001$) nas células planctônicas, em relação às células do biofilme. Para os grupos tratados por hipoclorito de sódio e microondas, a expressão dos genes ALS1 ($p<0,05$) e ALS3 ($p<0,001$) foi maior nas células planctônicas em relação às células do biofilme.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de genes codificadores de adesinas (HWP1, ALS1, ALS3) em biofilmes de *C. albicans* formado em superfícies de resina acrílica não tratada e tratada com dois métodos de desinfecção (hipoclorito e microondas), durante os estágios de seu desenvolvimento (6, 12 e 48 horas).

Apesar da capacidade adesiva da *C. albicans* ser alvo de muitos estudos, os fenômenos bioquímicos e biomoleculares que norteiam a adesão do fungo às células do hospedeiro e às superfícies ainda não foram totalmente elucidados. Muitas proteínas e genes diversos estão relacionados ao processo de adesão, e destaque é dado para o gene HWP1 e genes pertencentes à família ALS (SUNDSTROM, 1999).

Sabe-se que esses genes codificam glicoproteínas da superfície celular que mediam a adesão de *C. albicans* às superfícies das mucosas. O gene ALS1 relaciona-se à adesão das leveduras às superfícies, sejam elas bióticas (células do tecido hospedeiro) ou abióticas (materiais, como silicón e resina acrílica). Também está relacionado à adesão entre as células fúngicas e ao desenvolvimento de tubos germinativos. O gene HWP1 é responsável pela ligação estável entre os tubos germinativos e as estruturas formadoras do biofilme propriamente dito, e pela irreversibilidade de sua formação. O gene ALS3, por sua vez, é expresso exclusivamente pelas hifas e garante a estruturação do biofilme, juntamente com a participação de outros genes e proteínas (HOYER, 2001; HOYER et al., 1998; HOYER; PAYNE; HECHT, 1998. SUNDSTROM, 1999).

A formação do biofilme de *C. albicans* ocorre em diferentes estágios de desenvolvimento. Inicialmente, as células leveduriformes se aderem a uma superfície e formam microcolônias (gene ALS1). Em seqüência, ocorre o crescimento e proliferação das leveduras e desenvolvimento dos tubos germinativos, que permitem a proliferação de uma camada basal para ancoragem celular (gene HWP1). Finalmente, ocorre o crescimento extensivo de pseudo-hifas e hifas concomitante a produção de matriz extracelular, a qual resulta em uma estrutura tridimensional (gene ALS3) (NOBILE, MITCHELL, 2006).

Os tempos de avaliação adotados neste estudo (6, 12 e 48 horas) seguiram outros estudos publicados, os quais os selecionaram devido a sua associação com mudanças fenotípicas importantes para o desenvolvimento do biofilme e resistência às drogas antifúngicas. Em 6 horas, a resistência às drogas antifúngicas é mensurável em modelo de biofilme de dentaduras e em 12 horas nota-se um grande aumento em sua biomassa, por isso a análise da expressão gênica nesses tempos é de suma importância (CHANDRA et al., 2001b; KUHN et al., 2002).

A base molecular da formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* não está totalmente esclarecida. Sabe-se, no entanto, que a interação de *C. albicans* com as células do organismo hospedeiro ou superfícies inertes está relacionada às alterações em sua expressão gênica. Diferentes estudos descreveram alterações nos níveis de expressão de genes durante o processo de desenvolvimento do biofilme (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; MARCHAIS et al., 2005; MURILLO et al., 2005).

A determinação dos níveis de expressão gênica é freqüentemente utilizada para identificar os genes envolvidos na formação de biofilme de *C. albicans* (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; GREEN et al., 2004; NAGLIK et al., 2008; NAILIS et al., 2009; O'CONNOR et al., 2005; SAMARANAYAKE, Y.H. et al., 2006; STEHR et al., 2004; ZAKIKHANY et al., 2007).

O monitoramento da expressão gênica pela mensuração dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) em células do biofilme e planctônicas pode identificar genes envolvidos na formação do biofilme. O RNAm pode ser analisado através de vários ensaios, como o Northern blot e o RT-PCR convencional. No entanto, o RT-PCR em tempo real pode detectar alterações mais sutis na expressão do gene, assim como normalizar os dados obtidos em comparação à transcrição de referência, a fim de corrigir diferenças na quantificação do material inicial, na integridade do RNA, na variação entre amostras e na eficiência da Transcrição Reversa (BUSTIN, 2002; FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999). Devido a essas vantagens, o RT-PCR em tempo real foi a ferramenta escolhida para análise da expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3.

Trabalhos envolvendo cepas mutantes de *C. albicans* comprovaram que as proteínas expressas pelos genes ALS1, ALS3 e HWP1 (respectivamente Als1p, Als3p, Hwp1) são importantes para o desenvolvimento de biofilme in vivo e in vitro (HOYER et al., 2008; NOBILE et al., 2006a; NOBILE et al., 2006b; RICICOVA et al.; ZHAO et al., 2006), e que as proteínas Als1p/Als3p e Hwp1 assumem papéis complementares na formação de biofilme (NOBILE et al., 2008).

Vários modelos experimentais foram desenvolvidos a fim de estudar a expressão gênica em biofilmes, porém, o modelo de desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* em RHE foi o mais utilizado para avaliar a expressão de genes da família ALS. Trabalhos anteriores mostraram que o gene HWP1 e genes da família ALS foram expressos em modelos de biofilme formados em RHE (GREEN et al., 2004; NAGLIK et al., 2008; STEHR et al., 2004; ZAKIKHANY et al., 2007) porém, esses autores utilizaram somente o método de RT-PCR convencional, obtendo apenas uma análise qualitativa do padrão de expressão gênica.

Estudos anteriores demonstraram que alguns substratos como RHE, siliconas para cateter, ou mesmo resinas acrílicas para dentaduras são modelos válidos para o estudo de biofilmes de *C. albicans*; e a expressão dos genes HWP1 e genes da família ALS, entre outros, foi avaliada em superfícies bióticas e superfícies abióticas (GREEN et al., 2004; NAGLIK et al., 2008; SAMARANAYAKE, Y.H. et al., 2006; STEHR et al., 2004; ZAKIKHANY et al., 2007).

Modelos de biofilme de prótese foram pouco explorados (CHANDRA et al., 2001a; GREEN et al., 2004; YEATER et al., 2007) , e nenhum trabalho apresentou, até o momento, comparações na expressão desses genes em biofilmes formados sobre superfície de resina acrílica tratada por métodos de desinfecção.

O presente trabalho identificou a expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 para biofilme e células planctônicas de *C. albicans*, nos três tempos avaliados (Gráfico 2 e 3), independente do tratamento do substrato, de modo semelhante a estudos in vitro realizados anteriormente (GARCIA-SANCHEZ et al., 2004; NAILIS et al., 2010; NOBILE et al., 2006a; NOBILE et al., 2006b; YEATER et al., 2007).

Nailis et al., 2010, correlacionaram a filamentação de *C. albicans* com os níveis de expressão gênica observados em biofilmes desenvolvidos em modelos de

cateter em subcutâneo de rato, e concluíram que as altas taxas de expressão observadas se relacionavam com o contato entre as hifas e a superfície. Possivelmente, o contato entre a célula fúngica e a superfície da resina acrílica, estando ela tratada ou não pelos métodos desinfetantes, desencadeou a filamentação do fungo e induziu a expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3, na fase inicial de desenvolvimento do biofilme (NAILIS et al., 2010). Embora a expressão do gene ALS3 tenha sido superior à expressão do gene HWP1 e ALS1, nos três substratos estudados, este estudo constatou redução nos níveis de expressão desse gene, no biofilme de 48 horas, assim como estudo de Nailis et al., 2010.

O gráfico 4 representam a expressão dos genes ALS1 (A) e ALS3 (C) em biofilmes de *C.albicans*, durante as etapas de seu desenvolvimento. Oscilações entre a expressão do gene ALS1 foram observadas somente para o grupo não tratado.

Segundo Yeater et al., 2007, os níveis de expressão do gene ALS1 são influenciados pelo estágio de crescimento da cultura, e conclusões sobre sua maior ou menor expressão variam de acordo com as comparações adotadas em cada análise; mas há um consenso na literatura afirmando a presença de altas taxas de expressão do gene ALS1 durante o processo de desenvolvimento do biofilme (NAILIS et al., 2006; O'CONNOR et al., 2005).

Esta afirmação corrobora os resultados do presente estudo, destacados no Gráfico 4A, onde verificou-se maior expressão desse gene durante a fase intermediária de desenvolvimento do biofilme (12 horas), independente do tratamento do substrato.

Relatos de Nobile e Mitchell, 2006, indicam que o fenômeno de adesão das células fúngicas com a superfície inicia-se na primeira meia hora embora sua expressão possa ser diferente dependendo do substrato utilizado. Assim, é possível que a expressão do gene ALS1 tenha ocorrido de forma mais intensa, antes da primeira avaliação (6 horas). O aumento observado em 12 horas pode ser devido, em parte, pela formação de tubos germinativos durante o desenvolvimento do biofilme,

O gene ALS3, por sua vez, apresentou aumento de sua expressão em 6 horas, seguida de queda em 12 e 48 horas, para o grupo não tratado (Gráfico 4C). Esse gene codifica adesinas específicas de hifas (HOYER et al., 1998; HOYER; PAYNE; HECHT, 1998; SUNDSTROM, 2002), e é mais expresso quanto maior a quantidade de filamentos presentes. Esse fato pode explicar porque biofilmes iniciais e intermediários expressam mais o gene ALS3 que os biofilmes maduros, independente do substrato avaliado (NAILIS et al., 2010).

É conhecida que a expressão de genes ALS pode ser influenciada por outros fatores, tais como o meio de cultura utilizado para crescimento do fungo, temperatura e outras condições ambientais (GHANNOUM, 2000; HOYER et al., 2008; HUBE et al., 2000; NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Portanto, o modelo de crescimento de biofilme pode ter impacto considerável nos níveis de expressão dos genes dessa família (NAILIS et al., 2009)

Achados do presente estudo confirmam que, para o modelo de biofilme em dentaduras, o tratamento do substrato com métodos de desinfecção pode alterar a expressão dos genes ALS1 e ALS3 (Gráfico 5A e 5B). No biofilme intermediário (12 horas), onde a expressão dos genes ALS1 e ALS3 é mais intensa, ocorreu uma diferença significativa da expressão desses genes quando os grupos tratado por hipoclorito de sódio e tratado por microondas foram comparados com o grupo não tratado. A expressão do gene ALS1 foi reduzida nesses grupos, enquanto a expressão do gene ALS3 foi aumentada.

A comparação entre a expressão dos genes ALS1 e ALS3 nos substratos tratados por hipoclorito de sódio e microondas está descrita no Gráfico 7A e 7C. A expressão do gene ALS1 no grupo tratado por hipoclorito de sódio foi menor em relação ao grupo tratado por microondas em 12 horas e 48 horas. Tal fato pode ser atribuído à resíduos de hipoclorito de sódio na superfície da resina.

Sabe-se que a maioria dos biofilmes naturais forma-se com, ou a partir de pH próximos da neutralidade. Desvios para valores inferiores ou superiores a 7 apresentam efeito preponderante no metabolismo microbiano e afetam diretamente as propriedades superficiais dos microorganismos e superfícies sólidas, podendo aumentar ou diminuir a repulsão eletrostática entre as duas entidades, e desse

modo, interferir na adesão dos microorganismos à superfície (BOTT, 1995; CHAVES, 2004). Assim, a solução de hipoclorito de sódio, devido ao seu pH alcalino (base forte, $\text{pH} > 11$) pode ter aumentado a repulsão eletrostática entre as células fúngicas e a superfície da resina. Além disso, já foi relatado na literatura que a presença do hipoclorito de sódio na superfície da resina acrílica, mesmo em concentrações sub inibitórias (1/50), é capaz de diminuir a adesão de células de *C.albicans* (WEBB et al., 1995).

A Figura 4 evidencia grande quantidade de células planctônicas no meio de cultura onde o corpo de prova foi tratado com hipoclorito de sódio. Isso confirma a menor adesão de células à superfície da resina.

As adesinas específicas que norteiam a adesão das leveduras da camada basal ao substrato ainda são desconhecidas, porém, sabe-se que a expressão do gene ALS1 está correlacionada ao fator de transcrição Bcr1, presente na fase de adesão celular (NOBILE; MITCHELL, 2006).

Assim, quando o substrato foi tratado por hipoclorito de sódio, a adesão das leveduras foi menor, resultando em menor expressão do gene ALS1. O inverso foi observado no grupo tratado por microondas, pois o substrato permite maior adesão e maior expressão do gene ALS1. Por outro lado, o gene ALS3, o qual possui uma função de estruturação do biofilme por meio do desenvolvimento de hifas, foi mais expresso no grupo tratado por hipoclorito de sódio.

Através dos nossos resultados, podemos especular que é possível que a *C.albicans* tenha identificado resíduos desse desinfetante na superfície, e tenha respondido a essa agressão expressando o gene ALS3, como forma de defesa. É provável também que o fungo tenha expressado mais o gene ALS3 como meio de manter a estrutura física do biofilme mais resistente, já que, possivelmente, a adesão entre as células e o substrato, e a adesão entre as células da camada basal do biofilme podem ter sido comprometidas pela menor expressão do gene ALS1. Dessa forma, a maior expressão do gene ALS3 estaria compensando a menor expressão do gene ALS1.

Já foi estabelecido que a desinfecção de resinas acrílicas por microondas é efetiva no tratamento de estomatite protética (NEPPELENBROEK et al., 2008), mas

não consta na literatura informações fundamentadas sobre como a desinfecção por microondas poderia interferir na adesão fúngica com uma única exposição à essa radiação.

Assim como no grupo tratado por hipoclorito de sódio, a *C.albicans* pode ter identificado modificações na superfície da resina tratada por microondas. Isso explicaria a maior expressão de genes ALS3 no grupo tratado por microondas, quando comparado ao grupo não tratado.

A comparação entre os níveis de expressão gênica em células do biofilme e células planctônicas é freqüente, pois são estruturas diferentes. Os biofilmes são considerados formas mais desenvolvidas, nas quais os componentes celulares adquirem fenótipos que os distinguem de seus homólogos planctônicos (NOBILE; MITCHELL, 2006).

Estudo de Green et al. (2004) comparou a expressão de genes da família ALS entre biofilmes de *C. albicans* e células planctônicas em três modelos experimentais: RHE, resina acrílica para dentadura e silicona para cateter, durante as fases de desenvolvimento do biofilme (6, 12, 48 horas), por meio de RT-PCR convencional e constatou não haver diferenças na expressão desses genes entre amostras

A análise da expressão dos três genes avaliados neste estudo, em células planctônicas coletadas em cada tempo de desenvolvimento do biofilme (Gráfico 3) mostra que não houve diferenças na expressão do gene HWP1 entre as diversas situações. A expressão do gene ALS1 foi superior à expressão do gene HWP1 somente nos grupos tratados por hipoclorito de sódio e microondas, em 6 horas (Gráfico 3A). Por outro lado, a expressão do gene ALS3 foi superior à expressão do gene HWP1, para todos os grupos, em todos os tempos avaliados (Gráfico 3A, 3B e 3C). A expressão dos genes ALS1 e ALS3, para células planctônicas, em cada substrato estudado, durante o período do experimento, consta no Gráfico 4B e 4D, respectivamente.

Embora não tenha sido objetivo deste estudo quantificar o biofilme e células planctônicas, a análise visual do meio de cultura no qual o substrato foi incubado para desenvolvimento do biofilme, evidenciou maior quantidade de células planctônicas nos grupos tratados por hipoclorito de sódio e microondas (Figura 4).

Sabe-se que a parede celular fúngica possui estruturas sensoriais capazes de identificar superfícies (NOBILE; MITCHELL, 2006), sabe-se também, que a movimentação do meio de cultura pode gerar atrito entre as células, resultando em alterações no padrão de expressão gênica.

Recentemente, um estudo de NAILIS et al., em 2010, comparou a quantidade de filamentos de *C.albicans* com a expressão do gene HWP1 e de todos os genes da família ALS, SAP (aspartil proteinase), LIP (lípase) e PLB (fosfolipase), em biofilmes formados sobre superfícies abióticas (micro placa de titulação, reator CDC - Centro de Controle de Doenças) e bióticas (cateter em subcutâneo de rato e modelo de mucosa em epitélio humano reconstituído – RHE), em seis tempos de desenvolvimento: 1, 12, 24, 48, 72 e 144 horas, por meio de RT-PCR em tempo real. Para estes autores, aumentos na porcentagem de filamentos e no nível de expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 nos biofilmes desenvolvidos em reator do CDC podem ser justificados pela força de cisalhamento presente neste sistema, a qual poderia induzir maior expressão gênica. O fato desse aumento não ter sido notado nos biofilmes desenvolvidos em placas de micro titulação corrobora a hipótese de que modificações do ambiente no qual o biofilme se desenvolve podem interferir em sua filamentação e expressão gênica. Contudo, os autores afirmam que mais pesquisas devem ser feitas a fim de confirmar esta hipótese

A maior população de células planctônicas encontradas no meio de cultura dos grupos tratados por hipoclorito de sódio e microondas, associada à agitação na qual este meio foi incubado para desenvolvimento do biofilme, pode ter promovido choque ou atrito entre essas células. A maior expressão do gene ALS1 (6 horas) nesses grupos pode estar associada a esses fatores (Gráfico 4B e 6A) No grupo não tratado, como a adesão ao substrato foi teoricamente mais efetiva essa tendência não foi observada (Gráfico 4B e 6A).

Ocorreu, no presente estudo, uma diminuição na expressão de gene ALS3 nas células planctônicas, em 12 horas, para o grupo não tratado (Gráfico 4D e 6B). Isso pode estar relacionado com a ausência de adesão celular ao substrato. Embora a expressão do gene ALS1 tenha sido aumentada em 6 horas, as células planctônicas não se aderiram ao substrato, e, portanto, não houve o

desenvolvimento do biofilme. Conseqüentemente, a expressão do gene ALS3, responsável por sua estruturação, foi bastante reduzida (Gráfico 4D e 6B).

Contudo, a expressão desse gene foi aumentada nas células planctônicas formadas em meios de cultura onde o substrato havia sido tratado com os métodos de desinfecção (Gráfico 4D e 6B), principalmente, quando o hipoclorito de sódio foi utilizado como tratamento do substrato.

É provável que o fungo tenha identificado resquícios dos tratamentos de desinfecção no meio de cultura como substâncias agressoras, e tenha expressado mais genes ALS3 a fim de produzir estruturas responsáveis por sua defesa (hifas). O hipoclorito de sódio pode ter eliminado subprodutos no meio de cultura de forma mais efetiva que a desinfecção por microondas e isso explicaria a maior expressão desse gene no grupo tratado por hipoclorito de sódio, em 12 horas (Gráfico 7B).

Os resultados do presente trabalho constatarem que houve uma variação na expressão dos genes ALS1 e ALS3 entre células do biofilme e células planctônicas, em relação ao tempo de desenvolvimento do biofilme e o tratamento do substrato. Na avaliação de 6 horas, o gene ALS1 foi mais expresso nas células planctônicas, independente do tratamento do substrato (Gráfico 8A). Por outro lado, em 12 horas, a expressão gênica do ALS1 em células de biofilme e planctônica se equiparou (Gráfico 8B). Resultado semelhante foi observado pelo estudo de Yeater et al., 2007, o qual comparou a expressão de diversos genes, entre eles o ALS1, em biofilmes desenvolvidos sobre resina acrílica e silicone de cateter, e células planctônicas, nos mesmos tempos de desenvolvimento de biofilme adotado neste estudo.

Embora o biofilme seja considerado estrutura complexa, a produção dos genes ALS1 e ALS3, em 6 horas, foi maior nas células planctônicas, para todos os tratamentos (Gráfico 8A). Esse achado sugere que a estruturação das leveduras em biofilme pode alterar a expressão desses genes. Durante o período inicial de desenvolvimento do biofilme, caracterizado pela adesão celular, ambos tipos celulares expressam o gene de adesão e estruturação, porém, as células não aderidas, expressam mais, possivelmente para tentar se aderir ao substrato. Passado esse período, já na fase intermediária, observamos um equilíbrio entre a expressão dos genes ALS1 e ALS3 nas células do biofilme e planctônicas, indicando

que as células aderidas ao substrato estão se estruturando em forma de biofilme, enquanto as planctônicas continuam criando mecanismos para adesão ao substrato (Gráfico 8B).

Garcia-Sanchez et al. (2004) mostraram que aproximadamente 5% de todos os genes da *C. albicans* expressos em biofilmes maduros são diferentes daqueles expressos em cultura de células planctônicas durante a fase estacionária. Este achado confirma os resultados obtidos no presente estudo.

Em 48 horas, a expressão dos genes ALS1 e ALS3 diminuiu para ambos os tipos celulares, mas permaneceu alta nas células planctônicas dos grupos tratados por métodos de desinfecção. Esse achado confirma a influência dos métodos de desinfecção não só na formação do biofilme, mas também nas células não aderidas (Gráfico 8C).

Embora métodos de desinfecção, tanto por imersão em hipoclorito de sódio, quanto por exposição a microondas, sejam empregados para controle e eliminação de biofilme, o presente estudo comprovou que sua utilização não inibe a expressão dos genes HWP1, ALS1 e ALS3 em biofilmes desenvolvidos sobre superfícies previamente desinfetadas. Essa constatação sugere que biofilmes desenvolvidos sobre superfícies de resina acrílica tratada pelos métodos de desinfecção supracitados são capazes de promover adesão e filamentação da *C. albicans*, fatores de virulência relacionados com a capacidade do microorganismo em invadir tecido e promover doença.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

- 1) Os genes HWP1, ALS1 e ALS3, relacionados aos mecanismos de adesão e filamentação da célula fúngica foram detectados em células do biofilme de planctônicas de *C.albicans*, nos grupos não tratado e tratado por hipoclorito de sódio e microondas, em todas as etapas de desenvolvimento do biofilme.
 - 2) O padrão de expressão dos genes, ALS1 e ALS3 nas células do biofilme diferiu da expressão em células planctônicas, ao longo do estudo, para todos os grupos avaliados
 - 3) Biofilmes desenvolvidos sobre superfícies de resina acrílica tratadas por métodos de desinfecção apresentaram padrões de expressão dos genes ALS1 e ALS3 diferentes do biofilme desenvolvido sobre superfície de resina acrílica não tratada.
 - 4) O padrão de expressão dos genes, ALS1 e ALS3 nas células do biofilme variou de acordo com suas etapas de desenvolvimento e com o tratamento de desinfecção adotado.
-

7 Referências

7. REFERÊNCIAS

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455-9.

Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, Edwards JE, Filler SG, Hube B. the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog*. 2008;4(11):e1000217.

Arendorf TM, Walker DM. Denture stomatitis: a review. *J Oral Rehabil*. 1987;14(3):217-27.

Arendorf TM, Walker DM. Oral candidal populations in health and disease. *Br Dent J*. 1979;147(10):267-72.

Asad T, Watkinson AC, Huggett R. The effect of disinfection procedures on flexural properties of denture base acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1992;68(1):191-5.

Azevedo A, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET, Pavarina AC, Magnani R. Effect of disinfectants on the hardness and roughness of relined acrylic resins. *J Prosthodont*. 2006;15(4):235-42.

Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10 Suppl 1:E27-39.

Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001;21(1):4-8.

Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(1):51-9.

Baysan A, Whiley R, Wright PS. Use of microwave energy to disinfect a long-term soft lining material contaminated with *Candida albicans* or *Staphylococcus aureus*. *J Prosthet Dent*. 1998;79(4):454-8.

Bell JA, Brockmann SL, Feil P, Sackuvich DA. The effectiveness of two disinfectants on denture base acrylic resin with an organic load. *J Prosthet Dent*. 1989;61(5):580-3.

Bergendal T, Isacson G. A combined clinical, mycological and histological study of denture stomatitis. *Acta Odontol Scand*. 1983;41(1):33-44.

Bergendal T. Status and treatment of denture stomatitis patients: a 1-year follow-up study. *Scand J Dent Res*. 1982;90(3):227-38.

Besson G, Kazanji M. One-step, multiplex, real-time PCR assay with molecular beacon probes for simultaneous detection, differentiation, and quantification of human T-cell leukemia virus types 1, 2, and 3. *J Clin Microbiol*. 2009;47(4):1129-35.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res*. 2008;8(3):442-50.

Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation 4ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991.1162.

Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater*. 1997;13(4):258-69.

Bott TR. Fouling of Heat Exchangers. New York: Elsevier; 1995.

Brace ML, Plummer KD. Practical denture disinfection. *J Prosthet Dent*. 1993;70(6):538-40.

Budtz-Jorgensen E. Denture stomatitis. 3. Histopathology of trauma- and candida-induced inflammatory lesions of the palatal mucosa. *Acta Odontol Scand*. 1970;28(5):551-79.

Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent*. 1979;42(6):619-23.

Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1974;82(2):151-90.

Bunetel L, Bonnaure-Mallet M. Oral pathoses caused by *Candida albicans* during chemotherapy: update on development mechanisms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82(2):161-5.

Burford-Mason AP, Weber JC, Willoughby JM. Oral carriage of *Candida albicans*, ABO blood group and secretor status in healthy subjects. *J Med Vet Mycol*. 1988;26(1):49-56.

Burns DR, Kazanoglu A, Moon PC, Gunsolley JC. Dimensional stability of acrylic resin materials after microwave sterilization. *Int J Prosthodont*. 1990;3(5):489-93.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*. 2002;29(1):23-39.

Campos MS, Marchini L, Bernardes LA, Paulino LC, Nobrega FG. Biofilm microbial communities of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):419-24.

Cannon RD, Chaffin WL. Colonization is a crucial factor in oral candidiasis. *J Dent Educ*. 2001;65(8):785-7.

Ceballos A, Gonzalez-Moles M, Urquia M. [Denture stomatitis. Its relation to *Candida albicans*]. *Av Odontoestomatol*. 1990;6(2):151-4.

Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001a;183(18):5385-94.

Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001b;80(3):903-8.

Chandra J, Zhou G, Ghannoum MA. Fungal biofilms and antimycotics. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):887-94.

Chau VB, Saunders TR, Pimsler M, Elfring DR. In-depth disinfection of acrylic resins. *J Prosthet Dent*. 1995;74(3):309-13.

Chaves LCD. Estudo da cinética de formação de biofilme em superfícies em contato com água potável [Tese]. Braga: Universidade do Minho; 2004.

Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(5):377-83.

Cottone JA, Molinari JA. Selection for dental practice of chemical disinfectants and sterilants for hepatitis and AIDS. *Aust Dent J*. 1987;32(5):368-74.

Cumming CG, Wight C, Blackwell CL, Wray D. Denture stomatitis in the elderly. *Oral Microbiol Immunol*. 1990;5(2):82-5.

Dar-Odeh NS, Shehabi AA. Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*. 2003;46(5-6):187-91.

Davenport JC. The denture surface. *Br Dent J*. 1972;133(3):101-5.

Davenport JC. The oral distribution of candida in denture stomatitis. *Br Dent J*. 1970;129(4):151-6.

Dixon DL, Breeding LC, Faler TA. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. *J Prosthet Dent*. 1999;81(2):207-14.

Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL, Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Dent Res*. 2005;84(11):966-77.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):167-93.

Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*. 2001;33(8):1387-92.

Dorocka-Bobkowska B, Budtz-Jorgensen E, Wloch S. Non-insulin-dependent diabetes mellitus as a risk factor for denture stomatitis. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(8):411-5.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro DG, de Oliveira JA, Vergani CE, Machado AL. Microwave disinfection of complete dentures contaminated in vitro with selected bacteria. *J Prosthodont*. 2009;18(7):611-7.

Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(11):685-702.

Ellis CA, Spivack ML. The significance of candidemia. *Ann Intern Med*. 1967;67(3):511-22.

- Emami E, Seguin J, Rompre PH, de Koninck L, de Grandmont P, Barbeau J. The relationship of myceliated colonies of *Candida albicans* with denture stomatitis: an in vivo/in vitro study. *Int J Prosthodont*. 2007;20(5):514-20.
- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*. 2002;13(2):113-7.
- Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*. 2000;18(5):553-62.
- Figueiral MH, Azul A, Pinto E, Fonseca PA, Branco FM, Scully C. Denture-related stomatitis: identification of aetiological and predisposing factors - a large cohort. *J Oral Rehabil*. 2007;34(6):448-55.
- Fotos PG, Hellstein JW. *Candida* and candidosis. Epidemiology, diagnosis and therapeutic management. *Dent Clin North Am*. 1992;36(4):857-78.
- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999;26(1):112-22, 24-5.
- Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MH, Ferreira EFE. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil*. 2008;35(5):370-4.
- Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci*. 2006;11(4):147-57.
- Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell*. 2004;3(2):536-45.
- Ghalichebaf M, Graser GN, Zander HA. The efficacy of denture-cleansing agents. *J Prosthet Dent*. 1982;48(5):515-20.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(1):122-43, table of contents.
- Gillum, AM, Tsay, EYH, Kirsch, DR. Isolation of then *Candida albicans* genes for orotidine-59-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet*. 1984;198(1):179-82.
-

Gonsalves WC, Wrightson AS, Henry RG. Common oral conditions in older persons. *Am Fam Physician*. 2008;78(7):845-52.

Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology*. 2004;150(Pt 2):267-75.

Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*. 1994;62(3):915-21.

Henderson CW, Schwartz RS, Herbold ET, Mayhew RB. Evaluation of the barrier system, an infection control system for the dental laboratory. *J Prosthet Dent*. 1987;58(4):517-21.

Howlett JA, Squier CA. *Candida albicans* ultrastructure: colonization and invasion of oral epithelium. *Infect Immun*. 1980;29(1):252-60.

Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol*. 2008;46(1):1-15.

Hoyer LL, Payne TL, Bell M, Myers AM, Scherer S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr Genet*. 1998;33(6):451-9.

Hoyer LL, Payne TL, Hecht JE. Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface. *J Bacteriol*. 1998;180(20):5334-43.

Hoyer LL. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(4):176-80.

Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol*. 2000;174(5):362-74.

Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2004;7(4):336-41.

Hume WR, Makinson OF. Sterilizing dental instruments: evaluation of lubricating oils and microwave radiation. *Oper Dent*. 1978;3(3):93-6.

Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc.* 1992;123(1):46-51.

Ibrahim AS, Filler SG, Sanglard D, Edwards JE, Jr., Hube B. Secreted aspartyl proteinases and interactions of *Candida albicans* with human endothelial cells. *Infect Immun.* 1998;66(6):3003-5.

Kindle G, Busse A, Kampa D, Meyer-König U, Daschner FD. Killing activity of microwaves in milk. *J Hosp Infect.* 1996;33(4):273-8.

Kozioł-Montewka M, Magrys A, Paluch-Oles J, Bogut A, Buczyński K, Jablonka S. MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection. *Immunol Invest.* 2006;35(2):167-79.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun.* 2002;70(2):878-88.

Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E. Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients. *J Oral Rehabil.* 1997;24(10):788-90.

Kumamoto CA, Vines MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 2005a;59:113-33.

Kumamoto CA, Vines MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol.* 2005b;7(11):1546-54.

Lima EM, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RC, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2006;33(5):356-62.

Lin JJ, Cameron SM, Runyan DA, Craft DW. Disinfection of denture base acrylic resin. *J Prosthet Dent.* 1999;81(2):202-6.

Lopes HP, Siqueira Júnior JF, Elias CN. Substâncias químicas empregadas no preparo dos canais radiculares. In: Lopes HPSJ, José Freitas, editor. *Endodontia: biologia e técnica*. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1999. P. 369-96.

Ma T, Johnson GH, Gordon GE. Effects of chemical disinfectants on the surface characteristics and color of denture resins. *J Prosthet Dent.* 1997;77(2):197-204.

Machado AL, Breeding LC, Vergani CE, da Cruz Perez LE. Hardness and surface roughness of reline and denture base acrylic resins after repeated disinfection procedures. *J Prosthet Dent*. 2009;102(2):115-22.

Mahonen K, Virtanen K, Larmas M. The effect of prosthesis disinfection on salivary microbial levels. *J Oral Rehabil*. 1998;25(4):304-10.

Marchais V, Kempf M, Licznar P, Lefrancois C, Bouchara JP, Robert R, et al. DNA array analysis of *Candida albicans* gene expression in response to adherence to polystyrene. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;245(1):25-32.

McGowan MJ, Shimoda LM, Woolsey GD. Effects of sodium hypochlorite on denture base metals during immersion for short-term sterilization. *J Prosthet Dent*. 1988;60(2):212-8.

Meloto CB, Silva-Concilio LR, Machado C, Ribeiro MC, Joia FA, Rizzatti-Barbosa CM. Water sorption of heat-polymerized acrylic resins processed in mono and bimaxillary flasks. *Braz Dent J*. 2006;17(2):122-5.

Merchant VA, Molinari JA. Infection control in prosthodontics: a choice no longer. *Gen Dent*. 1989;37(1):29-32.

Merchant VA. An update on infection control in the dental laboratory. *Quintess Dent Technol*. Lombard 1997:157-169.

Mima EG, Pavarina AC, Neppelenbroek KH, Vergani CE, Spolidorio DM, Machado AL. Effect of different exposure times on microwave irradiation on the disinfection of a hard chairside reline resin. *J Prosthodont*. 2008;17(4):312-7.

Molinari JA, Gleason MJ, Cottone JA, Barrett ED. Cleaning and disinfectant properties of dental surface disinfectants. *J Am Dent Assoc*. 1988;117(1):179-82.

Molinari JA, Merchant VA, Gleason MJ. Controversies in infection control. *Dent Clin North Am*. 1990;34(1):55-69.

Molinari JA, Runnells RR. Role of disinfectants in infection control. *Dent Clin North Am*. 1991;35(2):323-37.

Murillo LA, Newport G, Lan CY, Habelitz S, Dungan J, Agabian NM. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2005;4(9):1562-73.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400-28, table of contents.

Naglik JR, Fostira F, Ruprai J, Staab JF, Challacombe SJ, Sundstrom P. *Candida albicans* HWP1 gene expression and host antibody responses in colonization and disease. *J Med Microbiol.* 2006;55(Pt 10):1323-7.

Naglik JR, Moyes D, Makwana J, Kanzaria P, Tsihlaki E, Weindl G, et al. Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology.* 2008;154(Pt 11):3266-80.

Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006;7:25.

Nailis H, Kucharikova S, Ricicova M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiol.* 2010 Apr 16;10:114.

Nailis H, Vandenbroucke R, Tilleman K, Deforce D, Nelis H, Coenye T. Monitoring ALS1 and ALS3 gene expression during in vitro *Candida albicans* biofilm formation under continuous flow conditions. *Mycopathologia.* 2009;167(1):9-17.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Palomari Spolidorio DM, Sgavioli Massucato EM, Spolidorio LC, Vergani CE. Effectiveness of microwave disinfection of complete dentures on the treatment of *Candida*-related denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 2008;35(11):836-46.

Neppelenbroek KH, Pavarina AC, Vergani CE, Giampaolo ET. Hardness of heat-polymerized acrylic resins after disinfection and long-term water immersion. *J Prosthet Dent.* 2005;93(2):171-6.

Neppelenbroek KH. Efetividade da desinfecção de próteses totais por energia de Microondas no tratamento da estomatite protética associada à *Candida* spp Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2003.

Neppelenbroek KH. Efetividade da desinfecção de próteses totais por energia de microondas no tratamento de estomatite protética Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2005.

Newton A, Dendy PP, Smith CL, Wildy P. A pool size problem associated with the use of tritiated thymidine. *Nature*. 1962;194:886-7.

Nikawa H, Kotani H, Sadamori S, Hamada T. Denture stomatitis and ABO blood types. *J Prosthet Dent*. 1991;66(3):391-4.

Nikawa H, Nishimura H, Hamada T, Kumagai H, Samaranayake LP. Effects of dietary sugars and, saliva and serum on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. *Mycopathologia*. 1997;139(2):87-91.

Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, Smith FJ, Yue F, Phan QT, et al. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathog*. 2006a;2(7):e63.

Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol*. 2006;8(9):1382-91.

Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesin Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot Cell*. 2006b;5(10):1604-10.

Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008;18(14):1017-24.

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. *Mol Cell Probes*. 2005;19(3):153-62.

Ogrydziak DM. Yeast extracellular proteases. *Crit Rev Biotechnol*. 1993;13(1):1-55.

Olsen I. Denture stomatitis. Occurrence and distribution of fungi. *Acta Odontol Scand*. 1974;32(5):329-33.

Pavarina AC, Pizzolitto AC, Machado AL, Vergani CE, Giampaolo ET. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. *J Oral Rehabil*. 2003;30(5):532-6.

Phan QT, Belanger PH, Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. *Infect Immun*. 2000;68(6):3485-90.

- Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil*. 2002;29(11):1115-9.
- Ponniah G, Rollenhagen C, Bahn YS, Staab JF, Sundstrom P. State of differentiation defines buccal epithelial cell affinity for cross-linking to *Candida albicans* Hwp1. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(8):456-67.
- Quirynen M, Bollen CM. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol*. 1995;22(1):1-14.
- Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An in vivo study in man. *J Clin Periodontol*. 1990; 17(3):138-44.
- Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials in vivo and in vitro. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(1):99-116.
- Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;98(1):53-9.
- Ricicova M, Kucharikova S, Tournu H, Hendrix J, Bujdakova H, Van Eldere J, et al. *Candida albicans* biofilm formation in a new in vivo rat model. *Microbiology*. 156(Pt 3):909-19.
- Rogers TJ, Balish E. Immunity to *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. 1980;44(4):660-82.
- Rohrer MD, Bulard RA. Microwave sterilization. *J Am Dent Assoc*. 1985;110(2):194-8.
- Rohrer MD, Terry MA, Bulard RA, Graves DC, Taylor EM. Microwave sterilization of hydrophilic contact lenses. *Am J Ophthalmol*. 1986;101(1):49-57.
- Romeo O, Racco C, Criseo G. Amplification of the hyphal wall protein 1 gene to distinguish *Candida albicans* from *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44(7):2590-2.
-

Rudd RW, Senia ES, McCleskey FK, Adams ED, Jr. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. *J Prosthet Dent.* 1984;51(3):318-21.

Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):597-610.

Samaranayake LP, McCourtie J, MacFarlane TW. Factors affecting the in-vitro adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces. *Arch Oral Biol.* 1980;25(8-9):611-5.

Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BP, Jayatilake JA, Yeung KW, Yau JY, et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS.* 2006;114(12):857-66.

Santos CF, Sakai, VT, Machado MAAM, Schippers DN, Greene, AS. Reverse Transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(1):1-11.

Sasaki K, Mori Y, Honda W, Miyake Y. Selection of biological indicator for validating microwave heating sterilization. *PDA J Pharm Sci Technol.* 1998;52(2):60-5.

Sato M, Tsuchiya H, Akagiri M, Takagi N, Iinuma M. Growth inhibition of oral bacteria related to denture stomatitis by anti-candidal chalcones. *Aust Dent J.* 1997;42(5):343-6.

Saunders TR, Guillory VL, Gregoire ST, Pimsler M, Mitchell MS. The effect of bioburden on in-depth disinfection of denture base acrylic resin. *J Calif Dent Assoc.* 1998;26(11):846-50.

Silva MM. Efetividade da irradiação por microondas na desinfecção de próteses totais Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2005.

Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science.* 1999;283(5407):1535-8.

Staab JF, Sundstrom P. Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*. *Yeast.* 1998;14(7):681-6.

Stehr F, Felk A, Gacser A, Kretschmar M, Mahnss B, Neuber K, et al. Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res.* 2004;4(4-5):401-8.

Sundstrom P. Adhesins in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*. 1999;2(4): 329-452

Sundstrom P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol*. 2002;4(8):461-9.

Tate WH, Goldschmidt MC, Ward MT, Grant RL. Disinfection and sterilization of composite polishing instruments. *Am J Dent*. 1995;8(5):270-2.

Tommasi MH, Birman EG. *Diagnóstico em Patologia Bucal*. 3 ed. São Paulo: Pancast; 2002.

Ureña JL. Características generales de los hongos patógenos humanos. In: Hill MMG, editor. *Microbiología Oral*; 1995. p. 362-75.

Vasilas A, Molina L, Hoffman M, Haidaris CG. The influence of morphological variation on *Candida albicans* adhesion to denture acrylic in vitro. *Arch Oral Biol*. 1992;37(8):613-22.

Vitkov L, Krautgartner WD, Hannig M, Weitgasser R, Stoiber W. *Candida* attachment to oral epithelium. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(1):60-4.

Webb BC, Thomas CJ, Harty DW, Willcox MD. Effectiveness of two methods of denture sterilization. *J Oral Rehabil*. 1998;25(6):416-23.

Webb BC, Willcox MD, Thomas CJ, Harty DW, Knox KW. The effect of sodium hypochlorite on potential pathogenic traits of *Candida albicans* and other *Candida* species. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(6):334-41.

Whitacre RJ. Environmental barriers in dental office infection control. *Dent Clin North Am*. 1991;35(2):367-81.

Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J*. 1998;185(8):380-4.

Yeater KM, Chandra J, Cheng G, Mukherjee PK, Zhao X, Rodriguez-Zas SL, et al. Temporal analysis of *Candida albicans* gene expression during biofilm development. *Microbiology*. 2007;153(Pt 8):2373-85.

Yilmaz H, Aydin C, Bal BT, Ozcelik B. Effects of disinfectants on resilient denture-lining materials contaminated with *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sobrinus*, and *Candida albicans*. *Quintessence Int*. 2005;36(5):373-81.

ZAITS C, CAMPBELL I, MARQUES AS, RUIZ LRB, SOUZA VMC. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Médica e Científica LTDA - MEDSI; 1998.

Zakikhany K, Naglik JR, Schmidt-Westhausen A, Holland G, Schaller M, Hube B. In vivo transcript profiling of *Candida albicans* identifies a gene essential for interepithelial dissemination. *Cell Microbiol*. 2007;9(12):2938-54.

Zhao X, Daniels KJ, Oh SH, Green CB, Yeater KM, Soll DR, et al. *Candida albicans* Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. *Microbiology*. 2006;152(Pt 8):2287-99.

Zissis A, Yannikakis S, Harrison A. Comparison of denture stomatitis prevalence in 2 population groups. *Int J Prosthodont*. 2006;19(6):621-5.