**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

PATRICIA FREITAS FARIA

**Produção de citocinas pelos monócitos de idosos com estomatite
protética associada a *Candida***

**BAURU
2011**

PATRICIA FREITAS FARIA

**Produção de citocinas pelos monócitos de idosos com estomatite
protética associada a *Candida***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara.

Versão Corrigida

BAURU

2011

Faria, Patricia Freitas

F225p Produção de citocinas pelos monócitos de
idosos com estomatite protética associada a
Candida / Patricia Freitas Faria. – Bauru, 2011.
135 p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Soares Lara

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 100/2008
Data: 24 de outubro de 2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

PATRICIA FREITAS FARIA

DADOS CURRICULARES

Nascimento	08/06/1982 Bauru - SP
Filiação	Jorge Antonio Freitas Suzel Pereira Lima Freitas
2001 – 2004	Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2007 – 2009	Curso de Especialização em Microbiologia Clínica, Faculdades Integradas de Bauru.
2006 – 2011	Doutorado Direto em Ciências, no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2010 – Atual	Odontologista da Polícia Civil do Estado de Rondônia.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **Jorge e Suzel**, pelo constante incentivo que me deram para que eu pudesse trilhar no caminho dos estudos. Proporcionaram-me uma base sólida, pautada em valores como honestidade, companheirismo, humildade, perseverança e dignidade, que muito cooperaram para a minha formação pessoal e profissional. Dedico a vocês, pois acreditaram em mim, sem nada me cobrar. Aliás, às vezes cobravam para eu parar de estudar um pouco...

Ao meu amado marido, **Mikaill**, que me enche de paz, amor, alegria, carinho... E me ensina a levar a vida com mais vida, com mais paixão, com mais intensidade! Obrigada pela paciência, pelo companheirismo e por respeitar os meus momentos “nerds”. Sua presença na minha vida é fundamental! Obrigada por existir e ser essa pessoa maravilhosa! Esta conquista é nossa!

Às minhas irmãs **Paula**, com seu espírito incessante de proteção, capaz de se prejudicar em prol de quem ama, e **Flávia**, a quem também admiro e de quem me orgulho muito, sempre me ofertando palavras de apoio e estímulo, nos momentos mais difíceis. Sem dúvida, minhas melhores amigas!

Aos meus avós, **Rodolpho e Francisca**, minhas verdadeiras paixões! Vocês servem de exemplo para mim, profissional e pessoal. Os momentos ao lado de vocês são muito felizes! Estudiosos, corretos, sábios e prestativos, contribuíram muito para a minha dedicação aos estudos.

À minha avó **Eulália** (*in memoriam*), mulher guerreira, que sempre acreditou no meu potencial! A você também dedico este trabalho, pois foi responsável pela minha base, auxiliando nos meus estudos durante tempos complicados.

Aos meus sobrinhos, **Lívia, Kaleb, Luana, Maria Luisa, Tiago e Isadora**, que encheram nossa família de alegrias e, portanto, também cooperaram para a minha conquista!

Aos meus sogros, **Faria e Maria Helena**, cunhados, **Luis Guilherme, Sílvio, Bruno, Michelli, Mikaell, Daniela, Faiçall e Lorena**, tios **Rodolfo e Mardene**, primos e outros familiares. Os elogios que sempre dispensaram a mim deram-me forças para percorrer o caminho da Pós-Graduação. Obrigada por entenderem as minhas ausências e correrias, sempre em prol da ciência!

AGRADECIMENTOS

À minha adorável orientadora, **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara**, que tanto me ensinou durante dez anos de convivência, desde a minha iniciação científica. Ensinou-me que a vida profissional deve ser pautada em dedicação, honestidade, integridade e espírito de equipe. Acolheu-me e apoiou-me incondicionalmente, com palavras, ações, atitudes e gestos, em todos os momentos pelos quais passei neste período. Mais do que isso, mostrou-me o valor de uma sincera e, certamente, eterna amizade! Obrigada por ser quem você é! Obrigada por tudo que fez por mim!

MULHER DE FIBRA

*“Mulher amiga de onde vem tanta fibra?
Que não se deixa abater pelas armadilhas
da vida...
Que luta e labuta por seus sonhos e segue
de cabeça erguida.....*

*Amiga mulher que vibra com nossas
conquistas...
Que divide suas alegrias, suas angústias....
Que canta e encanta quem por perto
estiver.....*

*Minha amiga, de onde vem tanta fibra?
Que mesmo nos momentos mais difíceis...
Encontras motivos para sorrir, para
sonhar...*

*Ahhhh... Eu sei de onde vem esta fibra.....
Vem do desejo de ser feliz, de amar e
realizar....
Vem de Deus, que está sempre por perto
para nos amparar...”*

Nivaldo Joaquim (adaptado)

Ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, muito presente na minha formação! Sua integridade serviu de exemplo para mim, em diversos momentos. Obrigada pelos ensinamentos pessoais e profissionais!

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, com quem muito aprendi durante esses anos! Obrigada também pelos momentos maravilhosos em São Francisco/CA!

Ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, que nos contagia com sua paixão pela Patologia! Obrigada pelos proveitosos debates e reuniões!

Ao **Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto**, sempre solícito e animado com os trabalhos científicos! Muito me ajudou no desenvolvimento desta tese e me mostrou como tratar e respeitar os voluntários da pesquisa. Precisamos de professores como o senhor!

Aos demais professores da Disciplina de Prótese, em especial ao **Prof. Dr. Milton Carlos G. Salvador** (*in memoriam*) e à **Profa. Dra. Lucimar Falavinha Vieira**, sempre muito carinhosos e atenciosos nas minhas passagens pelas clínicas em busca de pacientes!

À amiga **Karen Henriette Pinke**, uma pessoa muito correta, dedicada, disciplinada e guerreira! Nossa amizade, já muito sólida, consolidou-se ainda mais no momento em que você não mediu esforços para me ajudar, sendo fundamental na finalização deste trabalho. O meu agradecimento a você não cabe nesse pequeno espaço de papel. Você permitiu que eu concretizasse um sonho, e qualquer tipo de agradecimento não será capaz de pagar por isso!

À querida **Dra. Magda Paula Pereira do Nascimento**, com quem pouco tive o prazer de conviver, mas que de longe transmite sua energia positiva! Obrigada pela ajuda essencial que dedicou ao meu trabalho, tornando possível a sua finalização. Você também foi peça chave nessa minha conquista!

Ao **Dr. Narciso Almeida Vieira**, cujo profissionalismo é imensurável! Agradeço por cada segundo que dedicou ao meu trabalho, realizando as colheitas de sangue e os hemogramas, com solicitude e competência!

Aos professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, em especial à **Profa. Dra. Ana Paula Campanelli**, que muito me ensinou no início da minha pesquisa! Obrigada também pela permissão de uso da infraestrutura e dos equipamentos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

À **Profa. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen**, com quem tive o prazer de conviver em minha iniciação científica, contribuindo para minha formação profissional!

Ao **Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris** e ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório**, que auxiliaram na realização da análise estatística. E aos demais professores da FOB/USP, que direta ou indiretamente me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

À **Profa. Dra. Maria Terezinha Peraçoli** e aos colegas **Dra. Érika Nakaira-Takahashi** e **Dr. James Venturini**, fundamentais no meu aprendizado científico. Muito atenciosos, competentes e solícitos, não hesitaram em me ajudar! Meus sinceros agradecimentos!

Ao **Dr. Cleverson Teixeira Soares** e ao **Prof. Dr. Roman Carlos-Bregni**, pelos ensinamentos e proveitosas discussões de casos clínicos!

Às minhas queridas “mães postiças”, **Fátima Aparecida Silveira** e **Maria Cristina Carrara Felipe**, que sempre me abraçaram e me dirigiram palavras de carinho quando eu mais precisava. Mulheres admiráveis, exemplares e guerreiras! Nossa amizade é eterna!

Aos demais funcionários e ex-funcionários da Disciplina de Patologia, em especial à **Marilza Dias de Almeida**, que muito contribuíram para a organização e o bom andamento do serviço!

A todos os funcionários do Laboratório de Análises Clínicas, do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - HRAC/USP, sempre dispostos para realizarem as colheitas de sangue e os hemogramas.

A todos os funcionários do Centro Integrado de Pesquisas (CIP), em especial ao **Marcelo Milanda Ribeiro Lopes** e à **Ms. Márcia Sirlene Zardin Graeff**, que possuem qualidades muito especiais, como a paciência, a serenidade e a seriedade, sem as quais não chegamos a lugar nenhum. Obrigada pelos momentos que dispensaram a mim!

Aos funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, em especial ao **André Luis da Silva** e à **Dalva Ribeiro de Oliveira**, sempre sorridentes, carinhosos e dispostos a ajudar!

Aos funcionários da disciplina de Bioquímica, em especial ao **Ovídio dos Santos Sobrinho** e à **Thelma Lopes Silva**, que permitiram o uso de equipamentos do laboratório e sempre foram muito atenciosos com os meus pedidos de socorro!

A todos os funcionários, docentes e não-docentes, das Clínicas de Graduação e Pós-Graduação da disciplina de Prótese, que me receberam muito bem nas minhas várias idas às clínicas!

Aos funcionários da Pós-Graduação e do Serviço de Biblioteca e Documentação, em especial aos bibliotecários **José Roberto Plácido Amadei** e **Rita de Cássia Paglioni**, muito atenciosos, prestativos e competentes!

À **Dra. Camila Peres Buzalaf**, que com muita sabedoria e disposição me auxiliou nos meus experimentos.

À **Dra. Thaís Helena Gasparoto**, pelos diversos ensinamentos, pela disponibilidade e pelas ricas discussões, e aos demais alunos com quem tive o prazer de conviver no Laboratório de Microbiologia e Imunologia.

À **Taiane Gardizani**, tão nova e tão responsável. Uma aluna exemplar! Obrigada pela força que me concedeu na finalização deste trabalho!

À minha turma de Pós-Graduação, **Carine, Maria Carolina, Bruno, Aroldo** (*in memoriam*) e **Gastão**. Obrigada pelos momentos maravilhosos juntos!

Aos demais amigos da Patologia, **Ana Regina, Priscila, Heliton, Tadashi, Sylvie, Érika, Simone, Michele, Melaine, Rosário, Karen** e outros, com quem dividi momentos de estudo e de descontração. Aprendi um pouco com cada um de vocês!

Às amigas **Aline Carvalho Batista** e **Camila de Oliveira Rodini**, com quem me iniciei na vida científica, e hoje professoras doutoras, que me mostraram o significado das palavras equipe, humildade e companheirismo! Obrigada pelas lições de vida que me deram!

À **Camila Lopes Cardoso**, amiga para todas as horas! Obrigada pela amizade sincera, divertida e prazerosa!

A todos os voluntários da pesquisa, sem os quais este trabalho não seria possível. Meus profundos agradecimentos!

Aos novos colegas da Polícia Civil do Estado de Rondônia e aos amigos que fiz em Rondônia, em especial à **Talita Lima de Castro** e **D. Laidés e família**, pessoas que me acolheram com muito carinho, dando-me força emocional para que eu concluísse este trabalho.

A **Deus**, razão da minha existência e maior responsável por essa conquista, dando-me força, sabedoria, esperança, serenidade e, acima de tudo, saúde, imprescindíveis para o desenvolvimento e conclusão do trabalho!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB/USP) na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

À Comissão de Pós-Graduação da FOB/USP, na pessoa do presidente **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

Ao Departamento de Estomatologia, da FOB/USP, na pessoa da chefe **Profa. Dra. Ana Lúcia Álvares Capelozza**.

Ao Departamento de Prótese, da FOB/USP, na pessoa do chefe **Prof. Dr. José Henrique Rubo**, pela autorização da seleção de voluntários nas clínicas de Graduação e Pós-Graduação da Disciplina de Prótese.

Ao Departamento de Ciências Biológicas, da FOB/USP, em especial às Disciplinas de Microbiologia e Imunologia e Bioquímica, na pessoa do chefe **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, pela permissão de uso da infraestrutura e equipamentos das Disciplinas.

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental, da Faculdade de Ciências de Bauru, da Universidade Estadual Paulista, na pessoa da chefe **Profa. Dra. Maria Sueli Parreira de Arruda**, pela permissão de uso do leitor de ELISA.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Patologia Bucal, da FOB/USP, na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Guilherme Janson** e da responsável pela área **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**.

Ao Centro Integrado de Pesquisas (CIP), na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto**, pela autorização de acesso às dependências para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC/USP)**, em especial ao Laboratório de Análises Clínicas, pela permissão da colheita de sangue dos voluntários e da realização dos hemogramas das amostras.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, pela concessão das bolsas de Mestrado e Doutorado, respectivamente.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), que concedeu recursos financeiros para a viabilização deste trabalho, na forma de Auxílio Regular à Pesquisa (Processo n. 2008/03539-0).

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que a minha trajetória pelo doutorado se tornasse mais prazerosa e proveitosa, meus sinceros e eternos agradecimentos!

*"Ninguém nasce odiando outra pessoa pela cor de sua pele ou por sua origem, ou
sua religião.*

*Para odiar, as pessoas precisam aprender. E se podem aprender a odiar, podem
ser ensinadas a amar, pois o amor chega mais naturalmente ao coração humano
do que o seu oposto.*

A bondade humana é uma chama que pode ser oculta, jamais extinta."

Nelson Mandela

RESUMO

Estomatite protética associada a *Candida* (EPC), a lesão mais frequente em usuários de próteses removíveis, principalmente os idosos, caracteriza-se por uma inflamação da mucosa bucal que suporta a prótese. Está fortemente associada com *Candida albicans*, bem como com fatores locais e sistêmicos, como a deficiência da resposta imune. Os monócitos são importantes na resposta protetora contra o fungo, produzindo citocinas que recrutam e ativam leucócitos. Existem alterações funcionais dessas células com o avanço da idade. Não foi possível encontrar na literatura dados referentes à função imunomodulatória dos monócitos de idosos com EPC. O presente trabalho pretendeu avaliar a produção de citocinas por essas células, estimuladas in vitro com *C. albicans*, obtidas do sangue periférico de idosos usuários de prótese total superior (PTS) com EPC, comparando-se com idosos usuários de PTS sem EPC, e com idosos e jovens não usuários de PTS. Os monócitos isolados foram cultivados em placas de cultura de 24 poços, na ausência ou presença de lipopolissacarídeo (LPS) ou *C. albicans* ATCC 90028 morta pelo calor. Após 18 horas, o sobrenadante foi coletado e submetido ao ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA) para dosagem das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), IL-1 β , CXCL8 e proteína quimiotática de monócito (MCP-1), e anti-inflamatórias IL-10 e fator transformador de crescimento- β (TGF- β). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos para cada grupo, e foram analisados por meio de testes estatísticos não-paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados demonstraram, de uma forma geral, alterações nos monócitos oriundos dos idosos com EPC, em comparação aos outros grupos: menor produção espontânea de CXCL8 e de MCP-1; menores níveis de TNF- α , de IL-6, de IL-1 β , de CXCL8, de MCP-1 e de IL-10, após estímulo com LPS; e menor produção de TNF- α e de IL-6, após estímulo com *C. albicans*. Comparando-se idosos e jovens, independente da presença de EPC, os resultados revelaram alterações nos monócitos dos idosos: uma menor produção de TGF- β , espontânea e após estímulo com *C. albicans*. Em conclusão, a disfunção na produção in vitro de citocinas pró e anti-inflamatórias pelos monócitos de idosos com EPC pode representar um aspecto adicional associado à suscetibilidade ao desenvolvimento e à persistência da EPC. Ainda, a disfunção nos monócitos dos grupos de idosos, quanto à produção in vitro de TGF- β , pode representar aspectos referentes à imunossenescência.

Palavras-chave: Monócitos. Citocinas. *Candida albicans*. Estomatite sob prótese. Idoso.

ABSTRACT

Cytokine production by monocytes from elderly patients with *Candida*-associated denture stomatitis

Candida-associated denture stomatitis (DS), the most frequent lesion among denture wearers, especially the elderly, is characterized by inflammation of the denture-bearing mucosa. It is strongly associated with *Candida albicans*, as well as with local and systemic factors, such as impaired immune response. Monocytes are important in the protective immune response against the fungus, by the production of cytokines that recruit and activate leukocytes. There are functional changes of these cells with advancing age. No data were found in the literature concerning the immunomodulatory function of these phagocytes in elderly patients with DS. This study aimed to evaluate the cytokine production by monocytes, challenged in vitro with *C. albicans*, obtained from peripheral blood of elderly denture wearers with DS, compared with elderly denture wearers without DS and elderly and young non-denture wearers. The isolated monocytes were cultivated in 24-well flat-bottomed culture plates, in the absence or presence of lipopolysaccharide (LPS) or heat-killed *C. albicans* ATCC 90028. After 18 hours, the supernatant was collected and submitted to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), CXCL8, IL-1 β , monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and anti-inflammatory cytokines IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β). The results are expressed as mean $\pm$ standard deviation of the values obtained for each group, and were analyzed using nonparametric statistical tests; p values <0.05 were considered statistically significant. The results demonstrated, in general, changes in monocytes from the elderly with DS, as compared to other groups: lower spontaneous production of CXCL8 and MCP-1; lower levels of TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8, MCP-1 and IL-10 after stimulation with LPS; and reduced production of TNF- α and IL-6 after stimulation with *C. albicans*. Comparing young and old, regardless of the presence of DS, the results revealed changes in the monocytes of the elderly: a lower production of TGF- β , spontaneous and after stimulation with *C. albicans*. In conclusion, the dysfunctional in vitro production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from elderly patients with EPC may represent an additional aspect associated with susceptibility to the development and to the persistence of DS. Still, the dysfunction in monocytes of elderly groups, regarding the in vitro production of TGF- β , may represent aspects related to immunosenescence.

Key words: Monocytes. Cytokines. *Candida albicans*. Stomatitis, Denture. Aged.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1** - Monócitos isolados do sangue periférico de jovem não usuário de prótese total superior (grupo **Jov**) e incubados in vitro com lipopolissacarídeo (LPS) por 18 horas expressando CD14-FITC e apresentando o núcleo corado com DAPI..... 86

- GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Valor absoluto dos monócitos/mm³ de sangue (média $\pm$ desvio padrão) dos grupos **Id/PT/EPC** (idosos usuários de prótese total superior [PTS] com estomatite protética associada a *Candida* [EPC]; n=10), **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC; n=17), **Id** (idosos não usuários de PTS; n=17) e **Jov** (jovens não usuários de PTS; n=18); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05)..... 67
- Gráfico 2** - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com *C. albicans*, obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**; n=10); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)..... 70
- Gráfico 3** - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com *C. albicans*, obtidos de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT**; n=17); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)..... 73

Gráfico 4 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com <i>C. albicans</i> , obtidos de idosos não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo Id ; n=17); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05).....	76
Gráfico 5 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com <i>C. albicans</i> , obtidos de jovens não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo Jov ; n=18); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05).....	79
Gráfico 6 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados obtidos de idosos com estomatite protética associada a <i>Candida</i> (EPC) (grupo Id/PT/EPC , n=10; colunas brancas), de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem EPC (grupo Id/PT , n=17; colunas cinza-claras), de idosos não usuários de PTS (grupo Id , n=17; colunas cinza-escuras), e de jovens não usuários de PTS (grupo Jov , n=18; colunas pretas); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05).....	81

- Gráfico 7** - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos estimulados com LPS obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**, n=10; colunas brancas), de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem EPC (grupo **Id/PT**, n=17; colunas cinza-claras), de idosos não usuários de PTS (grupo **Id**, n=17; colunas cinza-escuras), e de jovens não usuários de PTS (grupo **Jov**, n=18; colunas pretas); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)..... **83**
- Gráfico 8** - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos estimulados com *C. albicans* obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**, n=10; colunas brancas), de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem EPC (grupo **Id/PT**, n=17; colunas cinza-claras), de idosos não usuários de PTS (grupo **Id**, n=17; colunas cinza-escuras), e de jovens não usuários de PTS (grupo **Jov**, n=18; colunas pretas); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)..... **85**

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Dados demográficos dos indivíduos dos grupos **Id/PT/EPC** (idosos usuários de prótese total superior [PTS] com estomatite protética associada a *Candida* [EPC]; n=10), **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC; n=17), **Id** (idosos não usuários de PTS; n=17) e **Jov** (jovens não usuários de PTS; n=18)..... **63**
- Tabela 2** - Espécies de *Candida* obtidas, de forma isolada ou mista, do palato e da superfície interna da prótese total superior (PTS) dos indivíduos do grupo **Id/PT/EPC** (idosos usuários de PTS com estomatite protética associada a *Candida*), a partir do crescimento em meio de cultura CHROMAgar Candida, no qual *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam-se como colônias verdes, *C. tropicalis* como colônias azuis e *C. krusei* como colônias rosa..... **64**
- Tabela 3** - Espécies de *Candida* obtidas, de forma isolada ou mista, do palato e da superfície interna da prótese total superior (PTS) dos indivíduos do grupo **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem estomatite protética associada a *Candida*), a partir do crescimento em meio de cultura CHROMAgar Candida, no qual *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam-se como colônias verdes, *C. tropicalis* como colônias azuis e *C. krusei* como colônias rosa..... **65**
- Tabela 4** - Número e porcentagem de idosos usuários de prótese total superior (PTS), com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**; n=10) e sem EPC (grupo **Id/PT**; n=17), exibindo diferentes espécies de *Candida*, de forma isolada ou mista, ou não apresentando crescimento fúngico, no palato e na superfície interna da PTS. A identificação presuntiva foi realizada pelo meio de cultura CHROMAgar Candida, no qual *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam-se como colônias verdes, *C. tropicalis* como colônias azuis e *C. krusei* como colônias rosa..... **66**

Tabela 5 - Valor absoluto dos monócitos/mm ³ de sangue, considerando-se a média $\pm$ desvio padrão (SD) e os valores mínimo e máximo de monócitos/mm ³ dos grupos Id/PT/EPC (idosos usuários de prótese total superior [PTS] com estomatite protética associada a <i>Candida</i> [EPC]; n=10), Id/PT (idosos usuários de PTS sem EPC; n=17), Id (idosos não usuários de PTS; n=17) e Jov (jovens não usuários de PTS; n=18).....	67
Tabela 6 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín-Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com <i>C. albicans</i> (Ca), obtidos de idosos com estomatite protética associada a <i>Candida</i> (EPC) (grupo Id/PT/EPC ; n=10).....	69
Tabela 7 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín-Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com <i>C. albicans</i> (Ca), obtidos de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem estomatite protética associada a <i>Candida</i> (EPC) (grupo Id/PT ; n=17).....	72
Tabela 8 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín-Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com <i>C. albicans</i> (Ca), obtidos de idosos não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo Id ; n=17).....	75

Tabela 9 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín-Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com <i>C. albicans</i> (Ca), obtidos de jovens não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo Jov ; n=18).....	78
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcento
°C	graus Celsius
xg	x a aceleração gravitacional
µL	microlitro
µm	micrômetro
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca	<i>Candida albicans</i>
CCL2	<i>CC chemokine ligand-2</i>
CD	agrupamento de diferenciação (<i>cluster of differentiation</i>)
CO ₂	dióxido de carbono
CXCL8	<i>CXC chemokine ligand-8</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
EDTA	ácido etileno diamino tetra-acético (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EPC	estomatite protética associada a <i>Candida</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (<i>granulocyte-monocyte colony-stimulating factor</i>)
HCl	ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN-γ	interferon-gama
IL	interleucina
LBP	proteína de ligação ao LPS (<i>LPS binding protein</i>)
LPS	lipopolissacarídeo (<i>lipopolysaccharide</i>)
MCP	proteína quimiotática de monócito (<i>monocyte chemoattractant protein</i>)
M-CSF	fator estimulador de colônias de monócitos (<i>monocyte colony-stimulating factor</i>)
mg/L	miligrama por litro

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

MIP	proteína inflamatória de macrófago (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
N	Normal
NaOH	hidróxido de sódio
NF- κ B	fator nuclear-kappa B (<i>nuclear factor-kappa B</i>)
ng/mL	nanogramas por mililitro
nm	nanômetros
NK	célula <i>natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrão Molecular Associado ao Patógeno
PAS	Ácido Periódico de Schiff (<i>Periodic acid-Schiff</i>)
PBMC	célula mononuclear do sangue periférico (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pg/mL	picogramas por mililitro
pH	potencial hidrogeniônico
PTS	prótese total superior
RNA	ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	rotação por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
TGF- β	fator transformador de crescimento-beta (<i>transforming growth factor-beta</i>)
Th	linfócito T auxiliar (<i>T helper</i>)
THP-1	linhagem de células da leucemia monocítica aguda humana (<i>human acute monocytic leukemia cell line</i>)
TLR	receptor do tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa (<i>tumor necrosis factor-alpha</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	25
1.1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	27
1.2	ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA A <i>CANDIDA</i> (EPC)	28
1.2.1	Análise microscópica da estomatite protética associada a <i>Candida</i>	31
1.3	MECANISMOS DE DEFESA CONTRA <i>C. ALBICANS</i>	33
1.4	MONÓCITOS E <i>C. ALBICANS</i>	36
1.5	ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA A <i>CANDIDA</i> E CITOCINAS	39
1.6	IMUNOSSENESCÊNCIA	40
1.6.1	Imunossenescência e <i>C. albicans</i>	43
2	PROPOSIÇÃO	47
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	51
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	53
3.1.1	Diagnóstico microbiológico (Isolamento de <i>Candida</i>)	54
3.2	MANIPULAÇÃO DE <i>C. ALBICANS</i> ATCC 90028	55
3.3	OBTENÇÃO E CULTURA DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	56
3.4	DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO	57
3.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD14 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	58
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4	RESULTADOS	61
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO	63
4.2	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	64
4.3	QUANTIFICAÇÃO DOS MONÓCITOS CIRCULANTES	66
4.4	PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO PELOS MONÓCITOS	68
4.4.1	Comparação dentro de cada grupo	68
4.4.1.1	Grupo Id/PT/EPC (idosos usuários de PTS com EPC)	68
4.4.1.2	Grupo Id/PT (idosos usuários de PTS sem EPC)	71
4.4.1.3	Grupo Id (idosos não usuários de PTS)	74
4.4.1.4	Grupo Jov (jovens não usuários de PTS)	77
4.4.2	Comparação entre os grupos	80
4.5	EXPRESSÃO DE CD14 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	86
5	DISCUSSÃO	87

5.1	INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES ESTÍMULOS SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO PELOS MONÓCITOS EM COMPARAÇÃO COM A PRODUÇÃO ESPONTÂNEA (GRÁFICOS 2 a 5).....	91
5.2	PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO PELOS MONÓCITOS NOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO (GRÁFICOS 6 a 8).....	95
6	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICES.....	127
	ANEXO	133

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Em virtude do declínio dos níveis de fecundidade e mortalidade, o número de idosos vem aumentando em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define a população idosa como aquela a partir dos 60 anos de idade, apesar de afirmar que a idade cronológica não seja um marcador preciso das mudanças que acompanham o envelhecimento, visto que existem muitas variações relacionadas ao estado de saúde entre pessoas mais velhas que possuem a mesma idade, especialmente em países em desenvolvimento (OPAS, 2005).

No Brasil também se observou um acréscimo dos idosos ao longo dos anos, sendo que a população com 65 anos ou mais representava, em 1991, 4,8% da população total, passando para 5,9% em 2000 e chegando a 7,4% em 2010, conforme verificado no último Censo Demográfico de 2010, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2011).

Ainda de acordo com o IBGE, em 2009, a expectativa de vida no Brasil alcançou 73,17 anos (73 anos, 2 meses e 1 dia), representando um acréscimo de 10,60 anos (10 anos, 7 meses e 6 dias) em relação a 1980, quando a expectativa de vida era de 62,57 anos. Segundo o Instituto, o país continuará galgando anos na expectativa de vida de sua população, podendo alcançar, em 2050, o patamar de 81,29 anos (IBGE, 2010).

Esse aumento na expectativa de vida precisa ser acompanhado por melhoria ou manutenção da saúde e da qualidade de vida da população idosa. O envelhecimento da população representa, portanto, um desafio para as políticas de saúde, visto que infecções e doenças crônicas (doença cardiovascular, hipertensão, câncer, diabetes e outras), exacerbadas pelo sistema imune comprometido, são prevalentes nesses indivíduos (PETERSEN, 2003; PETERSEN; YAMAMOTO, 2005).

As doenças bucais também representam um impacto negativo na saúde geral e na qualidade de vida dos idosos, particularmente dos edêntulos (PETERSEN; YAMAMOTO, 2005). No Brasil há um alto índice de edêntulos totais, que

representam de 47% (FERNANDES et al., 1997) a 84% dos idosos (ROSA et al., 1992). O elevado grau de edentulismo na população idosa brasileira resulta em um grande número de idosos usuários de próteses totais: dados do Ministério da Saúde publicados em 2004 revelaram que 57,91% da população brasileira entre 65 e 74 anos de idade usam prótese total superior (PTS) e 34,18% usam prótese total inferior (BRASIL, 2004).

Além da perda dentária, doenças relacionadas à prótese removível também representam um frequente problema de saúde bucal em indivíduos idosos (PETERSEN; YAMAMOTO, 2005). A estomatite protética é a lesão mais comum em usuários de prótese removível (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; JORGE et al., 1991; MOSKONA; KAPLAN, 1992; ESPINOZA et al., 2003), apresentando uma alta prevalência, que varia de 15% a 70% (GENDREAU; LOEWY, 2011), sendo a porcentagem na população brasileira de 47,8% (JORGE et al., 1991).

1.2 ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA A *CANDIDA* (EPC)

A estomatite protética é caracterizada por eritema e edema da mucosa em contato direto com as bases acrílicas das próteses removíveis, parciais ou totais, sendo mais comumente encontrada sobre PTS. Geralmente é assintomática, mas alguns pacientes queixam-se de leve dor (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000). A primeira classificação clínica da doença, proposta por Newton, em 1962 (NEWTON, 1962), é ainda hoje utilizada, e a subdivide em três tipos: Tipo I: Pontos hiperêmicos localizados em uma área limitada da mucosa; Tipo II: Hiperemia difusa em toda a área da mucosa em contato com a prótese; Tipo III: Inflamação com hiperplasia papilar (mucosa com superfície hiperêmica nodular). Muitos trabalhos citam a do Tipo I como a mais comum (PIRES et al., 2002; FIGUEIRAL et al., 2007), e as lesões, se não tratadas, tendem a evoluir do Tipo I para o II e em seguida para o III (NEWTON, 1962).

A etiologia da estomatite protética é multifatorial, sendo fortemente associada com o fungo *Candida albicans* (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010), que está presente

nas superfícies das próteses removíveis e/ou da mucosa (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; RAMAGE et al., 2004). Outras espécies do gênero *Candida* (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e outras) (DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; SANITÁ et al., 2011) e outros microrganismos (KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; BAENA-MONROY et al., 2005; CAMPOS et al., 2008) também são comumente detectados na doença. Entretanto, *C. albicans* é a espécie mais patogênica de *Candida* (MORAN; COLEMAN; SULLIVAN, 2011) e a mais prevalente na estomatite protética, sendo identificada em 70% a 100% dos casos (MCMULLAN-VOGEL et al., 1999; BAENA-MONROY et al., 2005; SANITÁ et al., 2011).

Em razão da forte associação da doença com espécies de *Candida*, a nomenclatura estomatite protética (ou por dentadura) associada a *Candida* (EPC) tem sido muito utilizada (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; PEREIRA-CENCI et al., 2008; GASPAROTO, 2009) e foi o termo selecionado para se referir à doença na presente tese. Porém, outros termos também são encontrados na literatura como referência dessa doença, como candidose eritematosa associada à prótese (FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010), candidose atrófica crônica (CHALLACOMBE, 1994), estomatite protética e estomatite relacionada à prótese (HADJIEVA; DIMOVA; TODOROV, 2006; FIGUEIRAL et al., 2007; SCALERCIO et al., 2007).

C. albicans é um fungo oportunista, usualmente encontrado na forma comensal na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, usuários ou não de prótese removível, embora o uso de prótese favoreça uma maior presença do fungo na mucosa do palato (LYON et al., 2006), e essa maior presença, por sua vez, tem sido associada com risco aumentado à infecção fúngica (FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010). A existência de *Candida* na saliva e na mucosa de palato clinicamente normal em usuários de próteses removíveis varia de 15% a 75%, comprovando a alta frequência do fungo na forma comensal, não provocando infecção (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; PIRES et al., 2002; LYON et al., 2006). A transição de *C. albicans* de comensal para patógeno, provocando a candidose, é um processo complexo e depende de fatores de virulência do fungo, como a capacidade

de adesão, a secreção de enzimas (proteínases, fosfolipases e outras) e a formação de hifas (YANG, 2003), mas principalmente de fatores de risco locais e sistêmicos do hospedeiro (PIROFSKI; CASADEVALL, 2009; FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010).

Em combinação com o fator microbiano, os principais fatores predisponentes relacionados com o desenvolvimento da EPC são aqueles associados à prótese, tais como: trauma (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; AL-DWAIRI, 2008), uso contínuo (JORGE et al., 1991; ESPINOZA et al., 2003; SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; FIGUEIRAL et al., 2007; AL-DWAIRI, 2008), limpeza inadequada (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; JORGE et al., 1991; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; ESPINOZA et al., 2003), retenção, estabilidade e adaptação impróprias (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005), idade da prótese (MOSKONA; KAPLAN, 1992; FIGUEIRAL et al., 2007; AL-DWAIRI, 2008) e alergia ao material da prótese (JEGANATHAN; LIN, 1992; KOUTIS; FREEMAN, 2001), bem como fatores locais e sistêmicos do hospedeiro, como diminuição do fluxo salivar (TANIDA et al., 2001), vício de fumar (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; AL-DWAIRI, 2008; DOS SANTOS et al., 2010), uso de medicamentos antimicrobianos, imunossupressores ou com efeitos colaterais xerostômicos (KREHER et al., 1991; FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000), idade avançada (MOSKONA; KAPLAN, 1992; LOCKHART et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2010), deficiência de vitaminas A, B₁₂ e ferro (SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005), diabetes (DOROCKA-BOBKOWSKA; BUDTZ-JORGENSEN; WLOCH, 1996) e resposta imune deprimida (DAVENPORT; WILTON, 1971; IACOPINO; WATHEN, 1992; GASPAROTO, 2009; GASPAROTO et al., 2009b, 2011). Esses fatores favorecem a proliferação do fungo e sua transição da forma comensal para a patogênica, resultando no estabelecimento da EPC (CHALLACOMBE, 1994; SHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005; FARAH; LYNCH; MCCULLOUGH, 2010).

Com relação ao fator predisponente resposta imune comprometida, os estudos são relativamente escassos. Alguns autores afirmam que a presença de “células T supressoras” e defeitos na resposta dos linfócitos e fagócitos favorecem o surgimento da EPC (DAVENPORT; WILTON, 1971; IACOPINO; WATHEN, 1992). Similarmente, trabalhos recentes demonstraram que a EPC está associada a

alterações do fenótipo e da função de neutrófilos sanguíneos e salivares, incluindo a produção de citocinas imunomodulatórias (GASPAROTO, 2009; GASPAROTO et al., 2009b, 2011). Estudos focando especificamente a produção de citocinas em pacientes com EPC serão citados no item 1.5. Outros pesquisadores defendem a improbabilidade de a supressão da resposta imune celular adaptativa ser a causa direta da EPC, sugerindo que a infecção crônica por *Candida* possa resultar tal supressão (BUDTZ-JORGENSEN, 1973).

Além da resposta imune comprometida, outro fator de risco relevante associado com o desenvolvimento da EPC é a idade avançada. Os idosos apresentam uma predisposição para o desenvolvimento de candidose bucal devido à diminuição do fluxo salivar, e, conseqüentemente, dos fatores candidacidas nela presentes (Imunoglobulina A, lactoferrina, histatina e defensina) (LOCKHART et al., 1999; TANIDA et al., 2001), bem como devido à função diminuída dos neutrófilos salivares e ao aumento dos locais de ligação de *Candida* nos queratinócitos (TANIDA et al., 2001). Gasparoto et al. (2009b) demonstraram que a idade avançada altera as funções in vitro dos neutrófilos sanguíneos e salivares, como a fagocitose de *Candida* e a atividade candidacida, o que pode favorecer o estabelecimento da EPC (GASPAROTO et al., 2009b). Nota-se, portanto, que os fatores idade avançada e resposta imune deprimida podem estar combinados para favorecer o desenvolvimento da EPC.

O envolvimento direto de *C. albicans* no desenvolvimento da estomatite protética é questionado por alguns autores (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970; FOUCHÉ; SLABBERT; COOGAN, 1987; BARBEAU et al., 2003), que sugerem que as lesões do Tipo I de Newton apresentam uma etiologia apenas traumática, e não microbiana (BUDTZ-JORGENSEN; BERTRAM, 1970), e consideram a hipótese de que a infecção por *Candida* possa ocorrer posteriormente a uma resposta inflamatória decorrente de fatores ainda indefinidos (BARBEAU et al., 2003).

1.2.1 Análise microscópica da estomatite protética associada a *Candida*

Com relação às células inflamatórias presentes nas lesões de EPC, estudos microscópicos revelaram linfócitos e neutrófilos no epitélio (MORIMOTO; KIHARA;

SUETSUGU, 1987; PEREIRA, 2007), bem como moderado a intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear no tecido conjuntivo fibroso subjacente (MORIMOTO; KIHARA; SUETSUGU, 1987; BARS et al., 2001; PEREIRA, 2007), composto principalmente por linfócitos T, plasmócitos, mastócitos (MORIMOTO; KIHARA; SUETSUGU, 1987) e macrófagos (JOHANNESSEN et al., 1986). Embora a presença de células inflamatórias e imunocompetentes aparentemente não seja compatível com uma resposta imune prejudicada, tal correlação não pode ser afirmada, pois a função desempenhada por essas células frente a *Candida* não foi avaliada nesses estudos morfológicos.

Com relação à presença fúngica, sabe-se que, nas diversas apresentações clínicas da candidose bucal, *C. albicans* coloniza principalmente as camadas mais externas do epitélio, raramente invadindo a camada espinhosa (DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005). Entretanto, após a colonização do epitélio, *C. albicans* é capaz de penetrar áreas agredidas ou traumatizadas, nas quais a integridade epitelial esteja prejudicada, podendo atingir até as camadas mais profundas do epitélio e, inclusive, o tecido conjuntivo fibroso subjacente (DONGARI-BAGTZOGLOU; WEN; LAMSTER, 1999).

Especificamente na EPC, invasão tecidual de *C. albicans* não tem sido verificada em cortes microscópicos das lesões corados pelos métodos de Grocott de Prata (GOULART, 2009) e Ácido Periódico de Schiff (*Periodic acid-Schiff* - PAS) (MORIMOTO; KIHARA; SUETSUGU, 1987; GOULART, 2009). Por meio de imunofluorescência, *C. albicans* foi encontrada em lesões de EPC do Tipo III de Newton (hiperplasia papilar), predominantemente na forma de leveduras e na superfície do revestimento epitelial (GOULART, 2009). Farah, Ashman e Challacombe (2000) sugeriram que deva existir uma reação de hipersensibilidade aos antígenos de *Candida* nos pacientes com EPC, que possa justificar o aparecimento da doença mesmo com baixa invasão tecidual do fungo (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000). É concebível ainda que *Candida*, uma vez aderida na superfície mucosa, mesmo não invadindo os tecidos, libere os componentes de sua parede celular, os quais penetram no epitélio, contribuindo para a inflamação tecidual (SANTARPIA et al., 1990).

1.3 MECANISMOS DE DEFESA CONTRA *C. ALBICANS*

A maioria das pessoas adquire *C. albicans* da microbiota materna no período perinatal, quando então o fungo coloniza as mucosas do recém-nascido e permanece em estado de comensalismo, exceto raros casos de candidose neonatal (PIROFSKI; CASADEVALL, 2009). Essa aquisição resulta na presença, em praticamente todos os indivíduos, de anticorpos e resposta imune celular contra *Candida* (ASHMAN, 1997).

O estado de comensalismo, que não resulta em dano ao hospedeiro, é estabelecido como resultado da homeostasia e fisiologia do hospedeiro e do desenvolvimento do sistema imune. Assim, as barreiras físicas e imunológicas das mucosas impedem a infecção mucosa por *Candida* (candidose mucosa). No entanto, conforme já salientado, o fungo pode passar de comensal para patógeno, provocando a candidose, e essa transição depende de fatores do fungo e, especialmente, de fatores do hospedeiro, com destaque para a resposta imune comprometida (PIROFSKI; CASADEVALL, 2009).

Dentre os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção da mucosa bucal por *C. albicans* destaca-se inicialmente a barreira física constituída pelas células epiteliais bucais; o rompimento dessa barreira devido a traumas ou mucosites, como as induzidas por quimioterapia e radioterapia, contribui para a invasão do fungo, presente localmente na forma comensal (VAN DE VEERDONK; KULLBERG; NETEA, 2010). As células epiteliais bucais também produzem compostos antimicrobianos - como defensina e histatina - e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 α (IL-1 α), IL-1 β , fator de necrose tumoral- α (TNF- α), CXCL8 (principal quimiotático de neutrófilos) e fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (SCHALLER et al., 2002; STEELE; FIDEL, 2002), as quais apresentam uma função protetora contra *Candida*, iniciando e perpetuando a inflamação da mucosa por meio da ativação de leucócitos locais. Além das células epiteliais, fibroblastos da mucosa bucal também liberam, in vitro, citocinas pró-inflamatórias (IL-6) e quimiocinas (CXCL8) em resposta a *C. albicans* (DONGARI-BAGTZOGLOU; WEN; LAMSTER, 1999).

A microbiota bucal também representa um mecanismo de defesa contra a candidose mucosa, pois fornece antagonismo a *Candida*. Antibióticos de amplo

espectro podem levar a um desequilíbrio nessa relação, resultando em crescimento descontrolado do fungo e infecção (VAN DE VEERDONK; KULLBERG; NETEA, 2010).

A saliva também se destaca como mecanismo local de defesa, pois apresenta uma ação de limpeza mecânica e possui agentes que dificultam a adesão e o crescimento de *Candida*, tais como lactoferrina, defensina, histatina, transferrina, Imunoglobulina A e outros. A saliva contém ainda citocinas e células do sistema imune, especialmente neutrófilos, que auxiliam na defesa contra o fungo (SHOHAM; LEVITZ, 2005).

O sistema imune também é importante na defesa contra *Candida* (ROMANI, 2000; FIDEL, 2002; ASHMAN et al., 2004; ASHMAN, 2008), e deficiências da resposta imunológica podem constituir fatores que contribuem para a patogênese da candidose (VAN DE VEERDONK; KULLBERG; NETEA, 2010), permitindo que o fungo cause infecção (ASHMAN et al., 2004).

Tanto o sistema imune inato, quanto o adaptativo, em especial a imunidade celular, são importantes na defesa contra *Candida* (ROMANI, 2000; FIDEL, 2002; ASHMAN et al., 2004; ASHMAN, 2008). A imunidade inata, mediada por neutrófilos e monócitos/macrófagos, é o principal mecanismo de defesa contra a infecção sistêmica por *Candida*; e a imunidade mediada por células, principalmente células T CD4⁺, é a principal defesa contra a infecção mucosa. A imunidade humoral também contribui para a defesa contra o fungo, embora o papel de anticorpos específicos para *Candida* na proteção ou eliminação da infecção ainda não esteja completamente definido (FIDEL, 2002). Sabe-se que os anticorpos funcionam como opsoninas, facilitando a ingestão do fungo por fagócitos (MARÓDI; KORCHAK; JOHNSTON, 1991).

Neutrófilos e macrófagos representam a primeira linha de defesa contra a infecção por *Candida* (ASHMAN et al., 2004). Na ausência desses fagócitos, camundongos desenvolvem uma candidose bucal mais severa, evidenciando a importância dessas células no controle da infecção bucal (FARAH et al., 2001). Neutrófilos e macrófagos tentam manter o fungo na forma comensal, ou tentam eliminá-los, quando a infecção se estabelece. Além dessas funções, esses fagócitos, junto com as células dendríticas, possibilitam o estabelecimento de uma resposta imune adaptativa protetora. Em resposta a *Candida*, as células do sistema imune

inato liberam citocinas que podem levar ao desenvolvimento de uma resposta T *helper*-1 (Th-1) ou Th-2. A resposta Th-1 está relacionada com resistência à infecção por *Candida* e é induzida principalmente pela IL-12; caracteriza-se pela imunidade celular, com liberação de Interferon- γ (IFN- γ), IL-2, IL-12 e outras citocinas. Essa resposta ativa os fagócitos para um estado fungicida. Por outro lado, a resposta Th-2, relacionada com susceptibilidade à infecção fúngica, é induzida pela IL-4 e é caracterizada pela imunidade humoral e liberação de IL-4 e IL-10 (FARAH et al., 2001; ASHMAN et al., 2004; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005; ASHMAN; VIJAYAN; WELLS, 2011).

Também as citocinas pró e anti-inflamatórias, liberadas pelas células do sistema imune inato e adaptativo, são importantes para regular a resposta ao fungo. As citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , CXCL8, IL-6, TNF- α e GM-CSF) regulam a migração e a proliferação de leucócitos e ativam os mecanismos antifúngicos nas células do sistema imune; já as citocinas anti-inflamatórias, como o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) e a IL-10, inibem a secreção de citocinas pró-inflamatórias e prejudicam as funções efetoras antifúngicas dos fagócitos (ROILIDES et al., 1998; BALCH et al., 2001; LILIC et al., 2003; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005).

Uma integração apropriada entre o sistema imune inato e adaptativo é necessária para o controle da infecção, ou seja, a resistência à infecção por *Candida* é determinada por células fagocíticas, cuja atividade é aumentada por citocinas Th-1 e pró-inflamatórias e prejudicada por citocinas Th-2 e anti-inflamatórias (ROMANI, 2000; FARAH et al., 2001). No entanto, é importante que ocorra um equilíbrio entre essas citocinas, pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, Th-1 e Th-2, e não ausência de determinado tipo, para que se desenvolva uma imunidade protetora contra *Candida* (ROMANI, 2000).

Existe ainda outro subtipo de células T *helper*, as Th-17, caracterizadas pela produção de IL-17, IL-21 e IL-22, e que são importantes para a indução da liberação de defensinas e recrutamento de neutrófilos, contribuindo para o controle do crescimento fúngico na mucosa, impedindo a invasão tecidual e a infecção (VAN DE VEERDONK; KULLBERG; NETEA, 2010).

Apesar de todo esse arsenal para impedir a instalação da candidose, o patógeno oportunista utiliza mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro para

estabelecer a infecção. A capacidade de mudar da forma de levedura para a forma de hifa, que é a forma filamentosa utilizada para penetrar e invadir os tecidos do hospedeiro, é um importante fator de virulência de *C. albicans* (YANG, 2003). A forma filamentosa apresenta ainda atividades imunossupressoras nos monócitos e nas células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs), como a indução da liberação de IL-10 (XIONG et al., 2000; VAN DER GRAAF et al., 2005) e a inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (NAKAGAWA; OHNO; MURAI, 2003), de citocinas Th-1, como a IL-12 (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000; XIONG et al., 2000; LIU et al., 2001) e o IFN- γ (NAKAGAWA; OHNO; MURAI, 2003; VAN DER GRAAF et al., 2005), e de quimiocinas, como a proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α), a MIP-1 β , a proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1/CCL2) e o CXCL8 (TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000).

1.4 MONÓCITOS E *C. ALBICANS*

As células fagocitárias mononucleares se originam de células hematopoiéticas na medula óssea em resposta a fatores de crescimento, como o fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF), o GM-CSF e a IL-3 (GOMEZ et al., 2008), e entram no sangue periférico, por onde circulam como monócitos, que são células com 10 a 15 μ m de diâmetro e apresentam um núcleo em forma de rim e um citoplasma finamente granular contendo lisossomos, vacúolos fagocitários e filamentos citoesqueléticos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os monócitos migram da corrente sanguínea para os diferentes tecidos do organismo, onde se estabelecem e amadurecem, tornando-se macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; NAITO, 2008).

A migração dos monócitos para os locais de infecção é mediada por ligação a moléculas de adesão nas células endoteliais (STOHLAWETZ et al., 1998; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), e é também regulada por quimiocinas, como a MCP-1 (JIANG et al., 1996; TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000), que é produzida por diversos tipos celulares, como fagócitos mononucleares (JIANG et al., 1996; TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000; XIONG et al., 2000), células epiteliais

e endoteliais (TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000). Nos tecidos, os macrófagos reconhecem e fagocitam os microrganismos, se ativam e tentam eliminá-los.

Os monócitos/macrófagos são também importantes na ativação da resposta imune adaptativa por meio da apresentação de antígenos aos linfócitos T e da secreção de citocinas, as quais estimulam as células T e outras células imunocompetentes e inflamatórias. Os linfócitos T, por sua vez, produzem citocinas que estimulam as funções efetoras das células mono e polimorfonucleares, auxiliando na eliminação do agente infeccioso (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Uma resposta imune adequada depende do reconhecimento do patógeno. Assim, as células do sistema imune inato expressam na superfície muitos receptores que se ligam aos padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), estruturas conservadas dos microrganismos. O reconhecimento de *C. albicans* ocorre principalmente pela interação de receptores expressos pelos monócitos, tais como receptor do tipo Toll-2 (TLR-2), TLR-4 (NETEA et al., 2006), CD14 (TADA et al., 2002), receptor de manose e dectina-1 (NETEA et al., 2006; GOW et al., 2007; LI et al., 2009), com os componentes da parede celular do fungo, como β -glucana (GOW et al., 2007; LI et al., 2009), nas camadas internas, e manana, nas camadas externas (TADA et al., 2002; NETEA et al., 2006).

Após ativação pelo reconhecimento do fungo, os monócitos liberam citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (XIONG et al., 2000; TADA et al., 2002; NETEA et al., 2004; BARKER; LIU; ROGERS, 2005), IL-1 β (XIONG et al., 2000; BARKER; LIU; ROGERS, 2005), IFN- γ , IL-6 (NETEA et al., 2004), CXCL8 (JIANG et al., 1996; TADA et al., 2002; NETEA et al., 2004; BARKER; LIU; ROGERS, 2005), MIP-1 α , MIP-1 β (BARKER; LIU; ROGERS, 2005) e MCP-1 (JIANG et al., 1996; XIONG et al., 2000), e citocinas Th-1, como a IL-12 (LARSSON; LINDEN, 1998). Essas citocinas induzem uma resposta imune protetora contra *C. albicans*, ou seja, estimulam o recrutamento e a ativação de leucócitos e modulam a resposta imune adaptativa contra o fungo, favorecendo sua eliminação (XIONG et al., 2000). Citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , que inibem o desenvolvimento de uma resposta Th-1 e favorecem suscetibilidade à infecção, também são liberadas pelos monócitos após o estímulo fúngico (XIONG et al., 2000; LETTERIO et al., 2001).

A avaliação da cinética da expressão de genes, por meio da técnica de *microarray*, em monócitos humanos estimulados com *C. albicans* demonstrou uma *up-regulation* dos genes que expressam as citocinas TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e GM-CSF e as quimiocinas CXCL8, MIP-1 e MCP-1 durante as primeiras 6 horas de exposição ao fungo, que corresponde ao período de infiltração e ativação de neutrófilos e monócitos no local da infecção. Os genes envolvidos na codificação de moléculas que regulam as células T, incluindo as citocinas IL-12, IFN- γ e TGF- β não foram significativamente alterados durante as 18 horas de incubação, indicando que elas não devam exibir uma função importante nas primeiras 18 horas de exposição ao fungo. Portanto, esse trabalho confirmou que *C. albicans* é um potente indutor de uma cascata de expressão de genes nos monócitos cujos produtos estão relacionados com o recrutamento, a ativação e a atividade efetora de neutrófilos e monócitos e a resposta imune inicial ao fungo é mais dependente da imunidade inata do que da imunidade adaptativa (KIM et al., 2005).

Os monócitos liberam ainda, em resposta a *C. albicans*, fatores do complemento, como o fator C3, que são importantes na resistência contra a infecção fúngica, funcionando como mediadores inflamatórios e opsoninas (HØGÅSEN; ABRAHAMSEN, 1993).

Além da produção de fatores do complemento e citocinas imunomodulatórias, os monócitos têm a capacidade de fagocitar e matar leveduras de *Candida* por mecanismos intracelulares oxidativos (intermediários reativos de oxigênio, sistema mieloperoxidase-peróxido de hidrogênio-íons cloro e intermediários reativos de nitrogênio) e não oxidativos (proteínas lisossomais) (MARÓDI; FOREHAND; JOHNSTON, 1991; VÁZQUEZ-TORRES; BALISH, 1997; TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000). Os monócitos não fagocitam, porém são capazes de matar hifas de *Candida* (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000; NETEA et al., 2004), que são as formas invasivas do fungo, principalmente por mecanismos extracelulares oxidativos (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000; TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000).

Algumas citocinas, tais como IL-3 (WANG; FRIEDMAN; DJEU, 1989), GM-CSF (WANG; FRIEDMAN; DJEU, 1989; BALCH et al., 2001; FIDAN et al., 2007; HAMILTON, 2008), M-CSF (WANG; FRIEDMAN; DJEU, 1989), IFN- γ (FIDAN et al.,

2007) e IL-15 (VÁSQUEZ et al., 1998), auxiliam na ativação da função candidacida dos monócitos.

1.5 ESTOMATITE PROTÉTICA ASSOCIADA A *CANDIDA* E CITOCINAS

Em outras formas de candidose, como na candidose mucocutânea crônica (caracterizada por infecções persistentes por *Candida* na pele, unhas e mucosas), já foi demonstrado que os pacientes com a doença exibem uma menor produção de citocinas Th-1 e uma maior produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, em comparação com indivíduos saudáveis. Essas alterações resultam em deficiência na elaboração de uma resposta celular protetora e, conseqüentemente, em falha na eliminação do fungo (LILIC et al., 2003).

Em trabalho avaliando a resposta imune sistêmica de indivíduos com candidose bucal (associada ou não ao uso de prótese total), observou-se maior produção de TNF- α e de IFN- γ em relação à de IL-5 e de IL-10 pelas PBMCs de indivíduos com a doença, estimuladas com *C. albicans*; o estudo concluiu que o predomínio da resposta Th-1 em relação à Th-2 encontrado nesses pacientes deva ser importante no controle da doença no nível da mucosa bucal, impedindo a disseminação de *C. albicans*. No entanto, tal estudo incluiu as diversas formas de candidose bucal, e não especificamente a EPC (OLIVEIRA et al., 2007).

Com relação à EPC, os trabalhos encontrados na literatura a respeito da produção de citocinas são escassos, ou até mesmo ausentes, se considerarmos a produção exclusiva pelos monócitos de idosos. Avaliando a resposta imune local, autores verificaram um perfil misto de citocinas Th-1 (IFN- γ e IL-12) e Th-2 (IL-4 e IL-10) na saliva de usuários de PTS com ou sem EPC, ou seja, os indivíduos com a doença não apresentaram uma mudança para uma resposta Th-2 ou uma redução nas citocinas Th-1 salivares. Os autores concluíram, portanto, que a EPC não está associada com disfunção imune local manifestada por mudanças nas citocinas T *helper* locais (LEIGH et al., 2002).

Outros estudos demonstraram uma maior concentração de CXCL8, TNF- α (GASPAROTO et al., 2009b), IL-6 e MIP-1 α (GASPAROTO et al., 2011) na saliva de idosos com EPC, em comparação com idosos saudáveis, e concluíram que essa

maior produção pode contribuir para evitar uma infecção invasiva por *Candida*, visto que essas citocinas são importantes na resistência imune contra as candidoses bucal e sistêmica. Por outro lado, os mesmos autores verificaram maiores níveis de TGF- β na saliva de idosos com EPC, em comparação com idosos saudáveis, o que pode influenciar o estabelecimento da EPC, uma vez que essa citocina está associada com eventos apoptóticos e supressão imune (GASPAROTO et al., 2011).

Já com relação à imunidade sistêmica, autores demonstraram uma maior produção de IL-2 pelos linfócitos do sangue periférico de indivíduos com EPC, em comparação com usuários de PTS saudáveis, e ressaltaram a importância dessa citocina como mediador da inflamação, visto que ela estimula a proliferação de linfócitos (RODRIGUEZ-ARCHILLA et al., 1996).

Em tese de doutorado, Gasparoto (2009) demonstrou que neutrófilos sanguíneos de indivíduos com EPC, em comparação com indivíduos saudáveis, produziram baixos níveis de GM-CSF e altos níveis de IL-4 e IL-10, quando desafiados com *C. albicans*, o que pode favorecer a instalação e a persistência da doença (GASPAROTO, 2009).

Diante da constatação da importância dos monócitos e das citocinas pró e anti-inflamatórias no controle da candidose bucal, pode-se inferir que alterações na função imunomodulatória dessas células podem predispor os usuários de PTS à EPC.

1.6 IMUNOSSENESCÊNCIA

O envelhecimento afeta inúmeras funções fisiológicas, incluindo alterações numéricas, fenotípicas e funcionais das células do sistema imune inato (BUTCHER; CHAHÉL; LORD, 2000; PLOWDEN et al., 2004; STOUT; SUTTLES, 2005; DELLA BELLA et al., 2007; CIARAMELLA et al., 2011) e adaptativo (GRUVER; HUDSON; SEMPOWSKI, 2007). A alteração do sistema imune com a idade, denominada imunossenescência, está associada com um aumento da incidência de doenças infecciosas, câncer e doenças autoimunes na população idosa (PAWELEC, 2006). Os estudos nessa área são abundantes, porém, os resultados são muitas vezes contraditórios.

A literatura predominante aponta para um aumento dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias no idoso, como TNF- α (PAOLISSO et al., 1998; BRUUNSGAARD et al., 1999a; DELLA BELLA et al., 2007) e IL-6 (ERSHLER et al., 1993, COHEN et al., 1997; FORSEY et al., 2003). A principal fonte dessas citocinas encontradas na circulação são os monócitos e os macrófagos (GOMEZ; BOEHMER; KOVACS, 2005). O aumento desses mediadores inflamatórios circulantes pode ser consequência de condições pré-existentes, como doenças subclínicas, fumo e maior quantidade de tecido adiposo (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004; GOMEZ; BOEHMER; KOVACS, 2005), e apresenta-se muitas vezes associado com o desenvolvimento ou a exacerbação de algumas doenças inflamatórias relacionadas com a idade, como a aterosclerose (BRUUNSGAARD et al., 2000).

Outros trabalhos, entretanto, apontam para níveis plasmáticos semelhantes de TNF- α (PETERSON et al., 1994; KIM et al., 2011), IL-1 β (DELLA BELLA et al., 2007; KIM et al., 2011), IL-6 (PETERSON et al., 1994; DELLA BELLA et al., 2007; KIM et al., 2011), IFN- γ (KIM et al., 2011), CXCL8 (KIM et al., 2011), MIP-1 α (SEIDLER et al., 2010) e MIP-1 β (SEIDLER et al., 2010; KIM et al., 2011) entre jovens e idosos. Há ainda autores que detectaram menores níveis plasmáticos de G-CSF, GM-CSF e MCP-1 em idoso em relação ao jovem, e afirmam que esses achados podem contribuir para deficiências na resposta inflamatória e no recrutamento de leucócitos em resposta a infecções na população senescente (KIM et al., 2011).

A literatura sugere que a discrepância entre os estudos acerca dos níveis plasmáticos de citocinas possa ser em decorrência de uma combinação de fatores, tais como: diferenças, entre os trabalhos, na idade média do grupo estudado; falta de rigor na seleção dos idosos, os quais podem exibir doenças capazes de alterar o estado inflamatório do voluntário (como a hipertensão e a diabetes); e variabilidade nas metodologias empregadas (FORSEY et al., 2003; KIM et al., 2011).

Apesar de a literatura predominante descrever um aumento das citocinas pró-inflamatórias circulantes no idoso, a maioria dos trabalhos analisando a produção *in vitro* por células do sangue estimuladas (com LPS ou outros fatores estimulantes) demonstra uma menor produção desses mediadores pró-inflamatórios no idoso, em comparação com o jovem, sugerindo um defeito funcional dos leucócitos na população idosa após estímulo (MCLACHLAN et al., 1995; GON et al., 1996; BRUUNSGAARD et al., 1999b; SADEGUI et al., 1999).

Nessa linha de resultados, Bruunsgaard et al. (1999b) detectaram menor produção de TNF- α e de IL-1 β pelas células do sangue total de idosos estimuladas com LPS, em comparação com células de indivíduos jovens (BRUUNSGAARD et al., 1999b). Outros trabalhos também demonstraram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , G-CSF, GM-CSF, CXCL8, MIP-1 α (GON et al., 1996) e IL-1 β (MCLACHLAN et al., 1995; GON et al., 1996; SADEGUI et al., 1999), em sobrenadante de cultura de monócitos de idosos estimulados com LPS, em comparação com células obtidas de população jovem. Uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias com a idade pode ser resultado de uma menor expressão e função do TLR-4 nos macrófagos de camundongos idosos, que torna essas células menos responsivas ao LPS (RENSHAW et al., 2002).

Da mesma forma, monócitos de idosos estimulados com agonistas de TLR-1/TLR-2 (pam3Cys) produziram menores concentrações de IL-6 e de TNF- α do que células de jovens, e essa menor produção pode ter sido resultante de uma diminuição na expressão de TLR-1 em idosos (NYUGEN et al., 2010).

Outros autores, no entanto, contradizem os achados acima, e demonstram maior produção de IL-1 β pelas PBMCs de idosos estimuladas com LPS, em relação às células oriundas de jovens, bem como não demonstram alteração relacionada com a idade na produção de TNF- α (RIANCHO et al., 1994).

Vários fatores podem alterar os resultados e explicar essas divergências entre os trabalhos que avaliam a produção de citocinas *in vitro*, entre eles: dosagem da produção de citocinas em apenas um período de cultivo; comparação entre trabalho que utilizou cultura de PBMC e trabalho que utilizou cultura de sangue total; e sexo e estado de saúde dos voluntários do estudo (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004).

O prejuízo na resposta pró-inflamatória do idoso frente ao estímulo derivado de patógeno, conforme verificado pela maioria dos trabalhos, é acompanhado por uma possível deficiência na elaboração de uma resposta Th-1, visto que a produção de IL-12 pelo monócito do idoso mostrou-se menor do que do jovem, após estímulo com LPS (DELLA BELLA et al., 2007). Apesar dessa diferença encontrada na produção de IL-12, o mesmo trabalho demonstrou que a produção de IL-10 pelos monócitos não estimulados bem como estimulados com LPS não foi afetada com a idade (DELLA BELLA et al., 2007). De forma semelhante, outros trabalhos

detectaram evidências de um perfil de citocinas Th-2 no indivíduo idoso (SANDMAND et al., 2002), que apresentou menor produção in vitro de IFN- γ e maior produção de IL-10 pelas células do sangue total estimuladas com mitógeno, em comparação com indivíduos jovens (CAKMAN et al., 1996). Essa mudança para um padrão Th-2 no idoso pode estar relacionada com maior suscetibilidade a infecções intracelulares, apesar de outros autores demonstrarem o contrário, ou seja, um predomínio de uma resposta Th-1, pela maior produção de IFN- γ e menor produção de IL-4 pelos linfócitos do idoso (SAKATA-KANEKO et al., 2000).

Além das alterações na produção de citocinas com a idade, os monócitos de idosos também apresentam diferenças quanto ao número e à ativação em comparação com a população jovem, embora muitos estudos nessa linha apresentem resultados contraditórios. Alguns pesquisadores não detectaram diferenças no número de monócitos circulantes entre jovens e idosos (BRUUNSGAARD et al., 1999b; SEIDLER et al., 2010); outros, entretanto, observaram um aumento (DELLA BELLA et al., 2007) ou uma diminuição (DE MARTINIS; MODESTI; GINALDI, 2004) dessas células circulantes em idosos.

Quanto ao estado de ativação, a maioria dos trabalhos verificou que os idosos exibem um maior número de monócitos circulantes CD14⁺CD16⁺ e um menor número de CD14⁺CD16⁻, em comparação com os jovens (NYUGEN et al., 2010; SEIDLER et al., 2010). Monócitos CD14⁺CD16⁺ são células ativadas (MERINO et al., 2011) e que exibem atividade pró-inflamatória aumentada, visto que produzem maiores níveis de TNF- α e menores de IL-10 em resposta a agonistas dos TLRs (NYUGEN et al., 2010). A presença desse estado de ativação in vivo no idoso é também reforçada pela detecção de maior produção espontânea de IL-1 β e IL-6 pelos monócitos não estimulados de idosos, em comparação com jovens (SADEGUI et al., 1999).

1.6.1 Imunossenescência e *C. albicans*

Trabalhos avaliando a resposta imune de idosos contra *C. albicans* demonstram que as alterações do sistema imune com a idade estão relacionadas com maior suscetibilidade ao desenvolvimento das candidoses mucosa (TANIDA et

al., 2001; GASPAROTO et al., 2009b) e sistêmica (ASHMAN; PAPADIMITRIOU; FULURIJA, 1999; MURCIANO et al., 2006, 2008).

A maior suscetibilidade do idoso à candidose bucal tem mostrado relação com a imunossenescência, visto que os idosos exibem uma redução da atividade candidacida dos neutrófilos salivares (TANIDA et al., 2001; GASPAROTO et al., 2009b), bem como da fagocitose de *C. albicans* pelos neutrófilos sanguíneos e salivares, em relação aos jovens (GASPAROTO et al., 2009b). Adicionalmente, os idosos exibem menores níveis de GM-CSF na saliva do que jovens, e essa redução pode favorecer a apoptose de neutrófilos salivares induzida por *C. albicans* na população idosa, visto que esse fator de crescimento desempenha um importante papel na ativação e sobrevivência desses fagócitos (GASPAROTO et al., 2009b).

A maior suscetibilidade do idoso à infecção por *Candida* não se relacionou com defeitos na expressão e na sinalização dos TLRs, e nem com uma atividade fungicida prejudicada das células do sangue, visto que não foram verificadas diferenças na expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-6 nos leucócitos, na produção das citocinas CXCL8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12, bem como na atividade fungicida de células do sangue total estimuladas in vitro com *C. albicans*, comparando-se indivíduos jovens e idosos (MURCIANO et al., 2007).

Com relação à candidose sistêmica, já foi demonstrado que camundongos idosos são mais suscetíveis, em comparação com animais jovens (ASHMAN; PAPADIMITRIOU; FULURIJA, 1999; MURCIANO et al., 2006), devido à menor produção de TNF- α pelos macrófagos e de IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ em resposta ao fungo (MURCIANO et al., 2006). Essa maior suscetibilidade também se mostrou associada com uma menor produção in vitro de IL-6, IL-1 β e TNF- α pelos macrófagos peritoneais murinos de idosos estimulados com *C. albicans*, bem como com uma menor expressão de TLR-2 pelos macrófagos peritoneais residentes de idosos, em comparação com células de animais jovens (MURCIANO et al., 2008).

Agius et al. (2009) avaliaram a reação de hipersensibilidade tardia em idosos e jovens por meio de injeção intra-dérmica de antígenos de *C. albicans* e posterior indução de formação de bolha na pele (por sucção no local do desafio antigênico), coleta do fluido da bolha e biópsia da pele na região. Observaram que os idosos apresentavam uma diminuição da reação de hipersensibilidade tardia cutânea aos

antígenos de *Candida*, com reduzidas resposta clínica e infiltração de linfócitos T CD4⁺ específicos para o antígeno, conforme avaliação imuno-histoquímica dos espécimes de pele. Demonstraram ainda, por meio de imunofluorescência, que essa infiltração reduzida ocorreu em decorrência da menor expressão de moléculas de adesão no endotélio dos vasos sanguíneos dérmicos dos idosos, que, por sua vez, ocorreu em consequência da menor concentração de TNF- α , IL-1 β e IL-6 no fluido da bolha e da redução na produção de TNF- α pelos macrófagos cutâneos. Os autores indicaram que o maior número de células T reguladoras (CD4⁺Foxp3⁺) encontrado na pele dos idosos pode explicar, em parte, a secreção diminuída das citocinas pelos macrófagos cutâneos do idoso em resposta a *Candida* e concluíram que esse aspecto observado nos idosos pode ser um fator predisponente para o desenvolvimento de infecções na pele durante o envelhecimento (AGIUS et al., 2009).

Considerando a importância dos monócitos e das citocinas pró e anti-inflamatórias no controle da candidose bucal, e as alterações funcionais e numéricas dessas células com a idade, bem como a escassez de estudos analisando a produção in vitro de citocinas por células inflamatórias de idosos com EPC, torna-se necessário avaliar a existência de alterações funcionais nos monócitos de idosos com EPC frente a *C. albicans*, que possam representar aspectos sistêmicos adicionais associados com suscetibilidade ao desenvolvimento e à persistência da EPC na população senescente.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar e comparar a função imunomodulatória dos monócitos obtidos do sangue periférico de idosos usuários de PTS com e sem EPC, idosos não usuários de PTS e jovens não usuários de PTS, por meio da análise da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, frente ao estímulo in vitro dessas células com *C. albicans*.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os indivíduos foram avaliados e selecionados nas Clínicas de Graduação e Pós-Graduação da Disciplina de Prótese, do Departamento de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB/USP), sob a supervisão do Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto, do Departamento de Prótese (FOB/USP).

Inicialmente, os voluntários foram informados detalhadamente sobre a pesquisa e seus objetivos enfatizando que seria necessário realizar coleta de amostra de sangue. Os participantes da pesquisa responderam a uma anamnese direcionada (Apêndice A), na qual foram registrados dados sobre a história médica e dados relacionados com a PTS, como o tempo de uso, quando usuários. Foi realizado exame físico intrabucal para avaliação das condições bucais gerais e, na presença de EPC, registrou-se o aspecto clínico da lesão, de acordo com a classificação proposta por Newton (NEWTON, 1962). As coletas de sangue e dados e o exame intrabucal foram realizados após a concordância do voluntário, documentada com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme prevê a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Apêndice B).

Este trabalho recebeu a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP), em 24 de outubro de 2008 (Anexo A).

Para a realização da pesquisa foram excluídos os indivíduos com história médica evidenciando modificadores sistêmicos da EPC e/ou da resposta imune, tais como: doença infecciosa sistêmica, de qualquer natureza, aguda ou crônica, com ou sem manifestação bucal; neoplasias malignas, de natureza bucal ou não; indivíduos sob tratamento quimioterápico ou radioterápico; alterações endócrinas (diabetes, gravidez, hipotireoidismo, hipertireoidismo); indivíduos sob tratamento com antibióticos ou antifúngicos; doenças hematológicas de qualquer natureza; doenças autoimunes ou outras doenças que envolvam o sistema imunológico; fumantes;

indivíduos sob tratamento com antipsicóticos, metais pesados, anticonvulsivantes e cardiotônicos (GASPAROTO, 2009).

Os indivíduos selecionados foram divididos em quatro grupos, cada um composto por 10-18 voluntários, assim constituídos:

- a) Indivíduos com idade igual ou acima de 60 anos (idosos), usuários de PTS por no mínimo dois anos, apresentando EPC, sem qualquer outra lesão bucal induzida por microrganismo (grupo **Id/PT/EPC**);
- b) Indivíduos com idade igual ou acima de 60 anos (idosos), usuários de PTS por no mínimo dois anos, sem EPC ou qualquer outra lesão bucal induzida por microrganismo (grupo **Id/PT**);
- c) Indivíduos com idade igual ou acima de 60 anos (idosos), não usuários de PTS e sem qualquer lesão bucal induzida por microrganismo (grupo **Id**);
- d) Indivíduos com idade entre 25 e 45 anos (jovens), não usuários de PTS e sem qualquer lesão bucal induzida por microrganismo (grupo **Jov**).

As lesões de EPC foram diagnosticadas clinicamente e por meio de confirmação microbiológica da presença de *Candida* no palato ou na superfície interna da PTS.

Os pacientes com diagnóstico clínico de estomatite protética, após participação na presente pesquisa, foram tratados e acompanhados pelos professores das Clínicas da Disciplina de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

3.1.1 Diagnóstico microbiológico (Isolamento de *Candida*)

Nos pacientes com diagnóstico clínico de estomatite protética, objetivando a confirmação da presença de *Candida* no palato e/ou na prótese, foi coletado material biológico da lesão (palato) e da superfície interna da prótese, utilizando-se suabe, que depois foi transferido para tubos de ensaio contendo caldo Sabouraud Dextrose (Difco) (acrescido de cloranfenicol, 50 mg/L). Em seguida, o tubo foi mantido a 37°C por 48 a 72 horas e, após esse período, foi realizada a semeadura por esgotamento

em placas de CHROMAgar Candida (Difco), preparadas segundo instruções do fabricante, que foram incubadas a 37°C por 48 horas para a identificação presuntiva das espécies de *Candida* (PFALLER; HOUSTON; COFFMANN, 1996). Colônias verdes foram identificadas como *C. albicans* ou *C. dubliniensis*, colônias azuis como *C. tropicalis* e colônias rosa como *C. krusei*.

As colônias foram armazenadas a -80°C em microtubos contendo caldo Sabouraud e glicerol, para futuras análises pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), objetivando identificar precisamente as espécies de *Candida* isoladas, em especial, *C. dubliniensis* e *C. albicans*, já que ambas apresentam-se como colônias verdes em CHROMAgar Candida e trabalhos recentes demonstraram a presença de *C. dubliniensis*, em associação com *C. albicans*, em usuários de PTS (GASPAROTO et al., 2009a; OLIVEIRA et al., 2010).

Os procedimentos descritos neste item também foram realizados nos usuários de PTS sem EPC (grupo **Id/PT**), para identificação da presença de *Candida* no palato e na superfície interna da PTS.

3.2 MANIPULAÇÃO DE *C. ALBICANS* ATCC 90028

Para estímulo dos monócitos in vitro foram utilizadas leveduras do fungo *C. albicans* ATCC 90028, o qual se apresentava armazenado a -80°C e foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Denise Spolidorio, da Faculdade de Odontologia de Araraquara – Universidade Estadual Paulista, sob responsabilidade do Prof. Dr. Vinicius Carvalho Porto, colaborador desta pesquisa.

Um volume de 10 µL da suspensão do fungo foi transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Difco) (acrescido de cloranfenicol, 50 mg/L), o qual foi mantido a 37°C por 24 horas. Em seguida, para a lavagem de *Candida*, o material foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi dispensado e, no precipitado, foram acrescentados 10 mL de PBS (Solução salina tamponada em fosfato - *Phosphate Buffered Saline*; pH 7,2) filtrado. Após a homogeneização da suspensão, essa foi novamente centrifugada por 10 minutos na rotação citada. O procedimento foi repetido mais duas vezes. Na última lavagem, o sobrenadante foi

desprezado e foram colocados 5 mL de PBS filtrado no tubo. Após a homogeneização, foi feita a contagem das leveduras em Câmara de Neubauer. As leveduras foram mortas pelo calor, em autoclave, a 121°C, por 12 minutos. A concentração utilizada para estimular os monócitos foi 1×10^6 leveduras por mL de meio de cultura.

3.3 OBTENÇÃO E CULTURA DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Foi obtido sangue venoso das veias braquiais dos indivíduos com auxílio de tubos a vácuo (BD Vacutainer), sendo 30 mL coletados em tubos contendo heparina sódica como anticoagulante (para os experimentos de cultura de células) e 2 mL coletados em tubo contendo K_2 (dipotássio) EDTA (ácido etileno diamino tetraacético – *ethylene diamine tetraacetic acid*) como anticoagulante (para a realização do hemograma). A coleta foi gentilmente realizada pelo Dr. Narciso Almeida Vieira (biólogo do Laboratório de Análises Clínicas – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - HRAC/USP).

As amostras de sangue destinadas à cultura de células foram aplicadas em 5 mL do gradiente Histopaque 1083 (Sigma-Aldrich) e centrifugadas por 28 minutos, a 480 xg, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a interface contendo as células mononucleares foi coletada, colocada em outro tubo e lavada duas vezes em RPMI 1640 contendo L-glutamina (300 mg/L) (Invitrogen), sendo a primeira por 15 minutos e a segunda por 10 minutos, ambas a 370 xg, em temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e os monócitos foram corados com vermelho neutro 0,05% (Carlo Erba Reagents) e contados em Câmara de Neubauer, ajustando-se a concentração para 1×10^6 monócitos por mL de meio de cultura.

Essa suspensão de células foi colocada em placas de cultura de 24 poços contendo, no fundo de cada poço, lamínulas de vidro estéreis circulares (13 mm de diâmetro). As placas foram incubadas a 37°C em estufa 5% CO₂. Após 2 horas de incubação, o meio e as células não aderentes, incluindo os linfócitos, foram desprezados e os poços lavados 2 vezes com RPMI 1640. Em seguida, foi

acrescentado 1 mL de RPMI 1640 completo aos monócitos aderentes, os quais foram cultivados na ausência (controle negativo) ou na presença de 100 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich) (controle positivo) (OLAS et al., 2005) ou *C. albicans* ATCC 90028 morta pelo calor, na proporção de 1 levedura morta para 1 monócito. Esse ensaio foi realizado em duplicata.

Após 18 horas de incubação a 37°C em estufa 5% CO₂, na ausência ou na presença de estímulo, o material de cada poço foi aspirado e depositado em microtubos, os quais foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos, a 4°C; em seguida, os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80°C para dosagem de citocinas, por meio do ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA), conforme descrito no item 3.4.

As lamínulas de vidro, acondicionadas em cada poço, foram lavadas duas vezes com PBS estéril em temperatura ambiente, removidas das placas, fixadas em acetona 100% por 1 minuto e congeladas a -80°C para posterior caracterização das células aderidas por meio da avaliação, pela técnica de imunofluorescência, da expressão da molécula CD14. Essa molécula é considerada um marcador de monócito (XIONG et al., 2000; MIRLASHARI; LYBERG, 2003; NETEA et al., 2004; TOROSANTUCCI et al., 2004; LEE et al., 2008), não sendo, portanto, expressa pelos linfócitos e pela maioria dos granulócitos (MIRLASHARI; LYBERG, 2003; GOMES et al., 2010).

O hemograma de todos os indivíduos foi realizado pelo biólogo Dr. Narciso Almeida Vieira, em duplicata, no aparelho Coulter – T890. Indivíduos com a contagem de leucócitos fora dos valores absolutos de referência (TONTE; STEVENS, 1995) foram excluídos do trabalho.

3.4 DOSAGEM DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO

Os sobrenadantes removidos das culturas celulares foram submetidos ao ensaio ELISA, utilizando-se os Kits OptEIA (BD Biosciences), sendo avaliadas, em duplicata, as seguintes citocinas com função imunomodulatória: TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8, MCP-1, IL-10 e TGF- β .

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura (100 µL por poço) diluído em tampão de ligação carbonato de sódio, de acordo com especificações do fabricante, e foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas em lavadora automática (ELx50/12, BioTek Instruments) 3 vezes com PBS/Tween-20 (0,05%) e foram feitos os bloqueios de ligações inespecíficas com solução proteica por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS/Tween-20 (0,05%) e colocadas as citocinas recombinantes e as amostras obtidas das culturas. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS/Tween-20 (0,05%) e os anticorpos de detecção biotinilados colocados (diluídos em PBS contendo 10% de soro fetal bovino), junto com o conjugado estreptoavidina-peroxidase, diluído no anticorpo de detecção, de acordo com instruções do fabricante. Após uma hora, foram feitas 7 lavagens com PBS/Tween-20 (0,05%) e adicionada, 100 µL por poço, a solução substrato (tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio, em volumes iguais). Após 30 minutos de incubação protegida da luz, a reação foi interrompida com o auxílio de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N, e o resultado lido em leitor de ELISA (SynergyTM Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments), a 450 nm. A concentração presente em cada amostra foi inferida pela comparação com valores detectados em uma curva padrão feita com diluição seriada de citocinas recombinantes. A sensibilidade dos Kits de ELISA foi de 5 pg/mL.

Para a dosagem de TGF-β, antes de colocar as amostras (os sobrenadantes das culturas) nas placas de ELISA, foram realizadas, conforme instruções do fabricante, ativação prévia das amostras incubando-as por 1 hora com ácido clorídrico (HCl) 1N, (4 µL de HCl para 100 µL de amostra), e posterior inativação com hidróxido de sódio (NaOH) 1N, na mesma proporção.

3.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD14 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

As lamínulas foram descongeladas em temperatura ambiente e pós-fixadas em acetona 100% por 2 minutos. Em seguida, foram lavadas com PBS e incubadas com PBS acrescido de 20% de soro normal de coelho, por 20 minutos, em

temperatura ambiente, para o bloqueio das ligações inespecíficas. Após esse período, as lamínulas foram incubadas a 4°C, por 60 minutos, protegidas da luz, com o anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD14 humano conjugado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (AbD Serotec), diluído em PBS-BSA (albumina sérica bovina) na proporção de 1:10. A seguir, as lamínulas foram lavadas 3 x com PBS-BSA e montadas sobre lâminas de vidro para microscopia, com meio de montagem contendo DAPI (Vectashield with DAPI - Vector laboratories).

As células foram analisadas e quantificadas por meio de microscopia de fluorescência (microscópio de fluorescência Axiostar Plus HBO 50/AC – Carl Zeiss), a partir de 10 campos das lâminas escolhidos aleatoriamente, utilizando-se a objetiva de 100x, sendo calculada a porcentagem de células CD14⁺ (identificadas pela fluorescência verde) pela relação entre as células CD14⁺ e o número total de células (DAPI⁺). Foi também avaliada a intensidade de fluorescência nas células CD14⁺, sendo classificadas em expressão normal (+) ou intensa (++), baseando-se em uma análise qualitativa por meio da comparação das lamínulas imunomarcadas do mesmo indivíduo.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da dosagem de citocinas (ELISA) e do número de monócitos circulantes por mm³ de sangue (hemograma) estão expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores obtidos para cada grupo. Para a análise da dosagem de citocinas foram utilizados os seguintes testes estatísticos: testes de Friedman e Dunnett, para comparação entre os estímulos (dentro de cada grupo), e testes de Kruskal-Wallis e Dunnett, para comparação entre os grupos. A análise estatística do número de monócitos circulantes por mm³ de sangue foi realizada por meio dos testes Kruskal-Wallis e Dunnett.

Para a análise estatística da intensidade de fluorescência da molécula CD14 foram utilizados os scores 1 (expressão normal) e 2 (expressão intensa) e foram aplicados os testes Kruskal-Wallis (para comparação entre os grupos) e Friedman (para comparação entre os estímulos).

A relação entre a EPC e a presença de *Candida* spp. ou *C. albicans* na mucosa palatina e na superfície interna da PTS nos grupos de usuários de PTS com ou sem EPC foi analisada estatisticamente por meio do teste de Fisher.

Os testes estatísticos foram realizados no programa estatístico Statistica, versão 7, e valores de $p < 0,05$ foram considerados indicativos de significância estatística. As análises foram feitas por testes não paramétricos, pois os valores não apresentaram padrão de normalidade, segundo os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

O grupo **Id/PT/EPC** (idosos usuários de PTS com EPC) foi formado por 10 idosos, sendo 3 homens (30%) e 7 mulheres (70%), com idades variando de 60 a 79 anos (média $\pm$ SD = 69,4 $\pm$ 5,06 anos) (Tabela 1). Apenas 1 indivíduo do grupo apresentava EPC do Tipo II de Newton (10%), sendo que os demais exibiam o Tipo I de Newton (90%).

O grupo **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC) foi composto por 17 indivíduos, sendo 1 homem (5,88%) e 16 mulheres (94,12%), com idades entre 60 e 83 anos (68,88 $\pm$ 6,75 anos) (Tabela 1).

O grupo **Id** (idosos não usuários de PTS) foi constituído por 17 indivíduos, 7 homens (41,18%) e 10 mulheres (58,82%), com idades entre 60 e 86 anos (66,71 $\pm$ 7,08 anos) (Tabela 1).

O grupo **Jov** (jovens não usuários de PTS) foi formado por 18 indivíduos, 8 homens (44,44%) e 10 mulheres (55,56%), com idades entre 25 e 45 anos (31,56 $\pm$ 6,19 anos) (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos dos indivíduos dos grupos **Id/PT/EPC** (idosos usuários de prótese total superior [PTS] com estomatite protética associada a *Candida* [EPC]; n=10), **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC; n=17), **Id** (idosos não usuários de PTS; n=17) e **Jov** (jovens não usuários de PTS; n=18)

Grupos	Idade em anos (média $\pm$ SD)	Idades mínima e máxima (em anos)	Sexo
Id/PT/EPC	69,40 $\pm$ 5,06	60 - 79	3M / 7F
Id/PT	68,88 $\pm$ 6,75	60 - 83	1M / 16F
Id	66,71 $\pm$ 7,08	60 - 86	7M / 10F
Jov	31,56 $\pm$ 6,19	25 - 45	8M / 10F

M = sexo masculino; F = sexo feminino

4.2 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

No grupo **Id/PT/EPC** foi observado crescimento de *Candida* spp. no palato e/ou na superfície interna da PTS de todos os indivíduos (Tabelas 2 e 4). A espécie de *Candida* mais comumente isolada da mucosa palatina dos indivíduos foi *C. albicans*/*C. dubliniensis*, tanto de forma isolada (40%), quanto associada com *C. krusei* (10%) ou com *C. tropicalis* (10%) ou com ambas as espécies (10%), totalizando, portanto, 70% das amostras do palato deste grupo com crescimento de *C. albicans*/*C. dubliniensis*. As espécies *C. krusei* e *C. tropicalis* também foram detectadas de forma isolada (10% cada espécie). Na superfície interna da PTS deste grupo, *C. albicans*/*C. dubliniensis* também foi a espécie mais encontrada, sendo 50% de forma isolada, 10% associada com *C. krusei* e 20% associada com *C. krusei* e *C. tropicalis*; o total de amostras de PTS com crescimento de *C. albicans*/*C. dubliniensis* totalizou, portanto, 80% do grupo **Id/PT/EPC**. *C. tropicalis* também foi encontrada de forma isolada na superfície interna da PTS desse grupo (10%) (Tabelas 2 e 4).

Tabela 2 - Espécies de *Candida* obtidas, de forma isolada ou mista, do palato e da superfície interna da prótese total superior (PTS) dos indivíduos do grupo **Id/PT/EPC** (idosos usuários de PTS com estomatite protética associada a *Candida*), a partir do crescimento em meio de cultura CHROMAgar *Candida*, no qual *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam-se como colônias verdes, *C. tropicalis* como colônias azuis e *C. krusei* como colônias rosa

Indivíduos	Espécies de <i>Candida</i>	
	Palato	PTS
1	<i>krusei</i>	-
2	<i>albicans/dubliniensis</i>	<i>albicans/dubliniensis</i>
3	<i>albicans/dubliniensis</i>	<i>albicans/dubliniensis</i>
4	<i>albicans/dubliniensis + tropicalis + krusei</i>	<i>albicans/dubliniensis + tropicalis + krusei</i>
5	<i>albicans/dubliniensis + krusei</i>	<i>albicans/dubliniensis + krusei</i>
6	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>
7	<i>albicans/dubliniensis</i>	<i>albicans/dubliniensis</i>
8	<i>albicans/dubliniensis + tropicalis</i>	<i>albicans/dubliniensis + tropicalis + krusei</i>
9	-	<i>albicans/dubliniensis</i>
10	<i>albicans/dubliniensis</i>	<i>albicans/dubliniensis</i>

- Sem crescimento

No grupo **Id/PT**, houve crescimento de *Candida* no palato e na superfície interna da PTS em 76,47% dos indivíduos (13 em 17). Nos demais idosos do grupo (23,53%) não houve crescimento de *Candida* spp. no palato e nem na PTS. Na mucosa palatina, a espécie de *Candida* mais comumente isolada foi *C. albicans*/*C. dubliniensis*, encontrada apenas de forma isolada (58,82%); as espécies *krusei* e *tropicalis* também foram encontradas, tanto de forma isolada (5,88% cada espécie), quanto associadas entre si (5,88%). Ainda neste grupo, a espécie mais encontrada na PTS também foi *C. albicans*/*C. dubliniensis*, presente tanto de forma isolada (35,29%) quanto associada com *C. tropicalis* (17,65%) ou *C. krusei* (5,88%), totalizando, portanto, 58,82% das amostras de PTS deste grupo com crescimento de *C. albicans*/*C. dubliniensis*. As espécies *tropicalis* e *krusei* também foram detectadas na PTS de forma isolada (11,76% e 5,88%, respectivamente) (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Espécies de *Candida* obtidas, de forma isolada ou mista, do palato e da superfície interna da prótese total superior (PTS) dos indivíduos do grupo **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem estomatite protética associada a *Candida*), a partir do crescimento em meio de cultura CHROMAgar *Candida*, no qual *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam-se como colônias verdes, *C. tropicalis* como colônias azuis e *C. krusei* como colônias rosa

Indivíduos Grupo Id/PT	Espécies de <i>Candida</i>	
	Palato	PTS
1	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i> + <i>tropicalis</i>
2	<i>tropicalis</i>	<i>tropicalis</i>
3	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i> + <i>tropicalis</i>
4	<i>tropicalis</i> + <i>krusei</i>	<i>tropicalis</i>
5	<i>krusei</i>	<i>krusei</i>
6	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i> + <i>krusei</i>
7	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>
8	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>
9	-	-
10	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i> + <i>tropicalis</i>
11	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>
12	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>
13	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>
14	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>	<i>albicans</i> / <i>dubliniensis</i>
15	-	-
16	-	-
17	-	-

- Sem crescimento

Tabela 4 - Número e porcentagem de idosos usuários de prótese total superior (PTS), com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**; n=10) e sem EPC (grupo **Id/PT**; n=17), exibindo diferentes espécies de *Candida*, de forma isolada ou mista, ou não apresentando crescimento fúngico, no palato e na superfície interna da PTS. A identificação presuntiva foi realizada pelo meio de cultura CHROMAgar Candida, no qual *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam-se como colônias verdes, *C. tropicalis* como colônias azuis e *C. krusei* como colônias rosa

<i>Espécies de Candida</i>	Palato		PTS	
	Grupo Id/PT/EPC n (%)	Grupo Id/PT n (%)	Grupo Id/PT/EPC n (%)	Grupo Id/PT n (%)
<i>albicans/dubliniensis</i>	4 (40)	10 (58,82)	5 (50)	6 (35,29)
<i>tropicalis</i>	1 (10)	1 (5,88)	1 (10)	2 (11,76)
<i>krusei</i>	1 (10)	1 (5,88)	0	1 (5,88)
<i>albicans/dubliniensis</i> + <i>tropicalis</i>	1 (10)	0	0	3 (17,65)
<i>albicans/dubliniensis</i> + <i>krusei</i>	1 (10)	0	1 (10)	1 (5,88)
<i>tropicalis</i> + <i>krusei</i>	0	1 (5,88)	0	0
<i>albicans/dubliniensis</i> + <i>tropicalis</i> + <i>krusei</i>	1 (10)	0	2 (20)	0
Sem crescimento	1 (10)	4 (23,53)	1 (10)	4 (23,53)
Total	10 (100)	17 (100)	10 (100)	17 (100)

Por meio do teste estatístico de Fisher, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos **Id/PT/EPC** e **Id/PT** quanto à detecção de *Candida* spp. ou de *C. albicans*, tanto na mucosa palatina, quanto na superfície interna da PTS. Esses dados corroboram o fato de o fungo *Candida* representar um comensal na cavidade bucal (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; PIRES et al., 2002; LYON et al., 2006).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS MONÓCITOS CIRCULANTES

Por meio do hemograma foi possível obter os valores absolutos dos monócitos/mm³ de sangue de todos os indivíduos, que foram representados como média ± desvio padrão dos monócitos/mm³ de sangue de cada grupo.

O grupo **Id/PT/EPC** (idosos usuários de PTS com EPC) apresentou em média 489,44 ± 362,02 monócitos/mm³ de sangue, com valores variando de 64 a 1.100 monócitos/mm³. O grupo **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC) apresentou

valores entre 66 e 860 monócitos/mm³ (431,50 ± 220,93) e o grupo **Id** (idosos não usuários de PTS) exibiu em média 509,81 ± 202,44 monócitos/mm³, com valores mínimo e máximo de 55 e 800 monócitos/mm³. No grupo **Jov** (jovens não usuários de PTS), a média de monócitos/mm³ de sangue foi 243,82 ± 160,79, com valores variando de 45 a 650 monócitos/mm³. Observou-se diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos **Id** e **Jov** (p=0,006) (Tabela 5 e Gráfico 1).

Tabela 5 - Valor absoluto dos monócitos/mm³ de sangue, considerando-se a média ± desvio padrão (SD) e os valores mínimo e máximo de monócitos/mm³ dos grupos **Id/PT/EPC** (idosos usuários de prótese total superior [PTS] com estomatite protética associada a *Candida* [EPC]; n=10), **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC; n=17), **Id** (idosos não usuários de PTS; n=17) e **Jov** (jovens não usuários de PTS; n=18)

Grupos	Valor absoluto de monócitos/mm ³ (média ± SD)	Valores absolutos mínimo e máximo de monócitos/mm ³
Id/PT/EPC	489,44 ± 362,02	64 - 1.100
Id/PT	431,50 ± 220,93	66 - 860
Id	509,81 ± 202,44 ^a	55 - 800
Jov	243,82 ± 160,79 ^a	45 - 650

letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05)

Gráfico 1 - Valor absoluto dos monócitos/mm³ de sangue (média ± desvio padrão) dos grupos **Id/PT/EPC** (idosos usuários de prótese total superior [PTS] com estomatite protética associada a *Candida* [EPC]; n=10), **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC; n=17), **Id** (idosos não usuários de PTS; n=17) e **Jov** (jovens não usuários de PTS; n=18); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05)

4.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO PELOS MONÓCITOS

Após análise por meio de imunofluorescência, foi possível confirmar que todas as células aderidas, em nossos experimentos in vitro, eram monócitos, já que todas expressavam a molécula CD14 (Figura 1 e item 4.5).

4.4.1 Comparação dentro de cada grupo

4.4.1.1 Grupo **Id/PT/EPC** (idosos usuários de PTS com EPC)

As médias $\pm$ desvio padrão (SD) e as concentrações mínima e máxima das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) produzidas pelos monócitos, estimulados ou não, obtidos dos idosos deste grupo estão listadas na Tabela 6. Considerando-se as citocinas pró-inflamatórias, o controle positivo (LPS) resultou em maior produção estatisticamente significativa, quando comparado às células não estimuladas, de TNF- α ($p=0,0011$), de IL-6 ($p<0,0001$) e de CXCL8 ($p=0,0046$). Tal estímulo resultou em produção estatisticamente maior, quando comparado ao estímulo fúngico, apenas de IL-6 ($p<0,0001$). O estímulo com *C. albicans* resultou em níveis estatisticamente maiores de MCP-1, em comparação com células não estimuladas, bem como estimuladas com LPS ($p=0,0120$). Não foi observada diferença estatística entre as três condições de cultivo na produção de IL-1 β , de IL-10 e de TGF- β (Tabela 6 e Gráfico 2).

Tabela 6 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín - Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com *C. albicans* (Ca), obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo Id/PT/EPC; n=10)

Citocinas	Estímulo	Média $\pm$ SD (pg/mL)	Mín - Máx (pg/mL)
TNF- α	Meio	0,78 $\pm$ 2,20 ^a	0 - 6,23
	LPS	52,08 $\pm$ 59,29 ^a	0 - 158,61
	Ca	0	0
IL-6	Meio	0,78 $\pm$ 2,20 ^a	0 - 6,23
	LPS	60,51 $\pm$ 51,12 ^{ab}	14,23 - 150,85
	Ca	8,89 $\pm$ 25,15 ^b	0 - 71,14
IL-1 β	Meio	0	0
	LPS	2,10 $\pm$ 4,70	0 - 10,52
	Ca	0	0
CXCL8	Meio	27,11 $\pm$ 34,60 ^a	0 - 77,87
	LPS	154,16 $\pm$ 88,24 ^a	72,39 - 268,15
	Ca	112,71 $\pm$ 97,88	0 - 245,72
MCP-1	Meio	0 ^a	0
	LPS	0 ^b	0
	Ca	404,36 $\pm$ 616,58 ^{ab}	0 - 1208,11
IL-10	Meio	3,89 $\pm$ 10,99	0 - 31,09
	LPS	3,78 $\pm$ 8,72	0 - 24,86
	Ca	7,00 $\pm$ 14,46	0 - 40,01
TGF- β	Meio	130,71 $\pm$ 148,51	0 - 319,79
	LPS	369,58 $\pm$ 637,93	0 - 1599,46
	Ca	216,40 $\pm$ 249,91	0 - 620,49

letras iguais representam diferença estatisticamente significativa (p<0,05), considerando-se cada citocina individualmente

Grupo Id/PT/EPC

Gráfico 2 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com *C. albicans*, obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**; n=10); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)

4.4.1.2 Grupo **Id/PT** (idosos usuários de PTS sem EPC)

As médias $\pm$ desvio padrão (SD) e as concentrações mínima e máxima das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) produzidas pelos monócitos, estimulados ou não, obtidos dos idosos deste grupo estão listadas na Tabela 7. Os monócitos estimulados in vitro com LPS apresentaram produção estatisticamente maior das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($p < 0,0001$), IL-6 ($p < 0,0001$), IL-1 β ($p = 0,0003$) e CXCL8 ($p < 0,0001$), e da anti-inflamatória IL-10 ($p = 0,0002$), em comparação com as células não estimuladas. O estímulo com *C. albicans* resultou em maior produção estatisticamente significativa das quimiocinas CXCL8 ($p < 0,0001$) e MCP-1 ($p = 0,0003$), em comparação com monócitos não estimulados. Comparando-se com LPS, células estimuladas com *C. albicans* apresentaram produção estatisticamente menor de IL-6 ($p < 0,0001$) e maior de MCP-1 ($p = 0,0003$). Não houve diferença na produção de TGF- β comparando-se os monócitos não estimulados e estimulados (com LPS ou com *C. albicans*) (Tabela 7 e Gráfico 3).

Tabela 7 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín - Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com *C. albicans* (Ca), obtidos de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo Id/PT; n=17)

Citocinas	Estímulo	Média $\pm$ SD (pg/mL)	Mín - Máx (pg/mL)
TNF- α	Meio	5,43 $\pm$ 7,23 ^a	0 - 18,96
	LPS	345,53 $\pm$ 275,63 ^a	0 - 759,65
	Ca	76,32 $\pm$ 86,11	0 - 272,82
IL-6	Meio	13,16 $\pm$ 18,35 ^a	0 - 57,37
	LPS	141,29 $\pm$ 87,73 ^{ab}	0 - 223,57
	Ca	63,04 $\pm$ 52,13 ^b	0 - 124,07
IL-1 β	Meio	0 ^a	0
	LPS	57,63 $\pm$ 70,50 ^a	0 - 230,85
	Ca	2,96 $\pm$ 8,88	0 - 26,65
CXCL8	Meio	101,84 $\pm$ 62,54 ^{ab}	17,29 - 198,84
	LPS	230,56 $\pm$ 41,87 ^a	129,54 - 279,23
	Ca	198,30 $\pm$ 67,84 ^b	82,82 - 271,80
MCP-1	Meio	113,59 $\pm$ 128,07 ^a	0 - 359,36
	LPS	130,23 $\pm$ 124,71 ^b	0 - 410,28
	Ca	307,01 $\pm$ 292,71 ^{ab}	15,46 - 830,05
IL-10	Meio	1,26 $\pm$ 3,42 ^a	0 - 11,80
	LPS	105,86 $\pm$ 94,03 ^a	0 - 274,07
	Ca	11,74 $\pm$ 13,88	0 - 37,02
TGF- β	Meio	295,57 $\pm$ 300,46	0 - 836,24
	LPS	285,52 $\pm$ 492,98	0 - 1394,49
	Ca	264,56 $\pm$ 198,48	0 - 519,36

letras iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), considerando-se cada citocina individualmente

Grupo Id/PT

Gráfico 3 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com *C. albicans*, obtidos de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo Id/PT; n=17); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)

4.4.1.3 Grupo **Id** (idosos não usuários de PTS)

As médias $\pm$ desvio padrão (SD) e as concentrações mínima e máxima das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) produzidas pelos monócitos, estimulados ou não, obtidos dos idosos deste grupo estão listadas na Tabela 8. O estímulo com LPS resultou em níveis estatisticamente maiores das citocinas pró-inflamatórias TNF- α ($p < 0,0001$), IL-6 ($p < 0,0001$), IL-1 β ($p = 0,0394$) e CXCL8 ($p = 0,0008$) e da anti-inflamatória IL-10 ($p = 0,0010$), em comparação com as células não estimuladas. A produção de IL-6 foi estatisticamente maior após estímulo com LPS, em comparação com o estímulo fúngico ($p < 0,0001$). Após estímulo com *C. albicans*, apenas a produção de MCP-1 foi estatisticamente maior tanto em comparação com monócitos não estimulados quanto estimulados com LPS ($p < 0,0001$). Os monócitos dos indivíduos deste grupo não produziram concentrações estatisticamente diferentes de TGF- β comparando-se as três condições de cultivo (Tabela 8 e Gráfico 4).

Tabela 8 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín - Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com *C. albicans* (Ca), obtidos de idosos não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo Id; n=17)

Citocinas	Estímulo	Média $\pm$ SD (pg/mL)	Mín - Máx (pg/mL)
TNF- α	Meio	4,60 $\pm$ 12,85 ^a	0 - 48,04
	LPS	465,46 $\pm$ 584,34 ^a	0 - 1741,05
	Ca	85,48 $\pm$ 126,01	0 - 420,28
IL-6	Meio	16,47 $\pm$ 35,48 ^a	0 - 123,17
	LPS	147,84 $\pm$ 81,96 ^{ab}	0 - 266,61
	Ca	39,15 $\pm$ 55,10 ^b	0 - 166,88
IL-1 β	Meio	0 ^a	0
	LPS	32,65 $\pm$ 47,26 ^a	0 - 113,79
	Ca	0	0
CXCL8	Meio	145,56 $\pm$ 58,73 ^a	64,02 - 215,10
	LPS	255,32 $\pm$ 44,89 ^a	218,43 - 305,44
	Ca	216,41 $\pm$ 76,60	147,47 - 301,54
MCP-1	Meio	85,65 $\pm$ 119,83 ^a	5,93 - 412,40
	LPS	108,24 $\pm$ 113,71 ^b	0 - 415,25
	Ca	282,99 $\pm$ 308,11 ^{ab}	9,55 - 872,32
IL-10	Meio	2,52 $\pm$ 9,44 ^a	0 - 35,32
	LPS	114,60 $\pm$ 200,28 ^a	0 - 753,84
	Ca	19,98 $\pm$ 29,28	0 - 79,58
TGF- β	Meio	108,53 $\pm$ 151,27	0 - 430,36
	LPS	340,04 $\pm$ 286,40	0 - 690,50
	Ca	213,60 $\pm$ 205,25	0 - 473,69

letras iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), considerando-se cada citocina individualmente

Grupo Id

Gráfico 4 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com *C. albicans*, obtidos de idosos não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo Id; n=17); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente ($p < 0,05$)

4.4.1.4 Grupo **Jov** (jovens não usuários de PTS)

As médias $\pm$ desvio padrão (SD) e as concentrações mínima e máxima das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) produzidas pelos monócitos, estimulados ou não, obtidos dos jovens deste grupo estão listadas na Tabela 9. As concentrações de TNF- α ($p < 0,0001$), de IL-6 ($p < 0,0001$), de IL-1 β ($p < 0,0001$), de CXCL8 ($p = 0,0002$) e de IL-10 ($p < 0,0001$) obtidas após cultivo dos monócitos com LPS foram estatisticamente maiores em comparação com a produção espontânea. O estímulo com LPS também resultou em níveis significativamente maiores de TNF- α ($p < 0,0001$), de IL-6 ($p < 0,0001$) e de IL-1 β ($p < 0,0001$) em comparação com o estímulo fúngico. A produção de TNF- α ($p < 0,0001$) e de CXCL8 ($p = 0,0002$) foi estatisticamente maior após estímulo com *C. albicans*, em comparação com monócitos não estimulados. Os resultados não demonstraram diferenças significativas entre as três condições de cultivo na produção de MCP-1 e de TGF- β (Tabela 9 e Gráfico 5).

Tabela 9 - Média $\pm$ desvio padrão (SD) e concentrações mínima e máxima (Mín - Máx) das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8 e MCP-1) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), em pg/mL, produzidas pelos monócitos não estimulados (Meio), estimulados com LPS (LPS) ou estimulados com *C. albicans* (Ca), obtidos de jovens não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo **Jov**; n=18)

Citocinas	Estímulo	Média $\pm$ SD (pg/mL)	Mín - Máx (pg/mL)
TNF-α	Meio	1,89 $\pm$ 6,06 ^{ab}	0 - 24,43
	LPS	504,85 $\pm$ 489,08 ^{ac}	34,48 - 1486,55
	Ca	95,87 $\pm$ 100,34 ^{bc}	0 - 305,59
IL-6	Meio	10,76 $\pm$ 19,41 ^a	0 - 68,07
	LPS	171,18 $\pm$ 58,95 ^{ab}	50,51 - 282,08
	Ca	36,29 $\pm$ 46,05 ^b	0 - 145,75
IL-1β	Meio	0 ^a	0
	LPS	91,66 $\pm$ 62,64 ^{ab}	15,32 - 173,66
	Ca	2,97 $\pm$ 7,87 ^b	0 - 20,82
CXCL8	Meio	176,90 $\pm$ 77,46 ^{ab}	48,71 - 288,83
	LPS	264,73 $\pm$ 35,32 ^a	177,33 - 297,72
	Ca	226,18 $\pm$ 72,91 ^b	66,30 - 289,02
MCP-1	Meio	43,16 $\pm$ 71,32	0 - 190,51
	LPS	75,87 $\pm$ 87,54	0 - 241,23
	Ca	85,53 $\pm$ 123,82	0 - 419,78
IL-10	Meio	0,62 $\pm$ 1,81 ^a	0 - 5,91
	LPS	148,75 $\pm$ 193,42 ^a	0 - 654,81
	Ca	12,50 $\pm$ 18,15	0 - 60,90
TGF- β	Meio	621,21 $\pm$ 0,11	621,07 - 621,43
	LPS	621,20 $\pm$ 0,17	621,00 - 621,60
	Ca	621,15 $\pm$ 0,13	620,98 - 621,45

letras iguais representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), considerando-se cada citocina individualmente

Grupo Jov

Gráfico 5 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados (Meio), ou estimulados com LPS, ou estimulados com *C. albicans*, obtidos de jovens não usuários de prótese total superior (PTS) (grupo **Jov**; n=18); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa, considerando-se cada citocina individualmente (p<0,05)

4.4.2 Comparação entre os grupos

Monócitos não estimulados oriundos dos idosos com EPC produziram menores níveis das quimiocinas CXCL8 e MCP-1 e da citocina anti-inflamatória TGF- β , em comparação com grupos sem EPC (saudáveis):

A produção de CXCL8 pelos monócitos não estimulados dos idosos com EPC (grupo **Id/PT/EPC**) foi estatisticamente menor do que pelas células dos jovens não usuários de PTS (grupo **Jov**) ($p=0,0104$) (Gráfico 6).

Com relação à MCP-1, a sua produção espontânea pelos monócitos do grupo **Id/PT/EPC** (idosos com EPC) foi estatisticamente menor em comparação com os demais grupos idosos (grupos **Id/PT** e **Id**) ($p=0,0017$) (Gráfico 6).

Os monócitos não estimulados de todos os grupos idosos (grupos **Id/PT/EPC**, **Id/PT** e **Id**) produziram concentrações estatisticamente menores de TGF- β em comparação com os monócitos não estimulados do grupo jovem (grupo **Jov**) ($p<0,0001$) (Gráfico 6).

Na análise da produção espontânea das demais citocinas (TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10) não foi observada diferença estatística entre os grupos (Gráfico 6).

Monócitos não estimulados

Gráfico 6 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos não estimulados obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**, n=10; colunas brancas), de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem EPC (grupo **Id/PT**, n=17; colunas cinza-claras), de idosos não usuários de PTS (grupo **Id**, n=17; colunas cinza-escuras), e de jovens não usuários de PTS (grupo **Jov**, n=18; colunas pretas); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se cada citocina individualmente ($p < 0,05$)

Após estímulo com LPS, a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelos monócitos dos idosos com EPC foi menor em comparação com grupos saudáveis:

Considerando os monócitos estimulados com LPS do grupo **Id/PT/EPC** (idosos com EPC), a produção de TNF- α ($p=0,0126$), IL-6 ($p=0,0269$), IL-1 β ($p=0,0149$), CXCL8 ($p=0,0246$), IL-10 ($p=0,0149$) e TGF- β ($p=0,0043$) foi estatisticamente menor em comparação com o grupo **Jov** (jovens não usuários de PTS) (Gráfico 7).

Após estímulo com LPS, o grupo dos idosos com EPC (grupo **Id/PT/EPC**) também produziu concentrações estatisticamente menores de MCP-1 ($p=0,0054$), em comparação com os demais grupos idosos (grupos **Id/PT** e **Id**), e de IL-10 ($p=0,0149$), em comparação com os idosos usuários de PTS sem EPC (grupo **Id/PT**) (Gráfico 7).

Assim como os idosos com EPC, os usuários de PTS saudáveis (grupo **Id/PT**) também produziram níveis estatisticamente menores de TGF- β em comparação com os jovens, após estímulo com LPS ($p=0,0043$) (Gráfico 7).

Monócitos estimulados com LPS

Gráfico 7 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos estimulados com LPS obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**, n=10; colunas brancas), de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem EPC (grupo **Id/PT**, n=17; colunas cinza-claras), de idosos não usuários de PTS (grupo **Id**, n=17; colunas cinza-escuras), e de jovens não usuários de PTS (grupo **Jov**, n=18; colunas pretas); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se cada citocina individualmente ($p < 0,05$)

Após estímulo com *C. albicans*, os monócitos dos idosos com EPC produziram níveis diminuídos de TNF- α , de IL-6 e de TGF- β em comparação com grupos saudáveis:

Os monócitos do grupo **Id/PT/EPC** (idosos com EPC) estimulados com *C. albicans* produziram concentrações estatisticamente menores de TNF- α , em comparação com os grupos **Id/PT** e **Jov** ($p=0,0047$), de IL-6, em comparação com o grupo **Id/PT** ($p=0,0455$), e de TGF- β , em comparação com o grupo **Jov** ($p<0,0001$) (Gráfico 8).

Após estímulo fúngico, os monócitos dos idosos saudáveis (grupos **Id/PT** e **Id**) também produziram níveis estatisticamente menores de TGF- β em comparação com o grupo jovem (grupo **Jov**) ($p<0,0001$) (Gráfico 8).

Para as demais citocinas (IL-1 β , CXCL8, MCP-1 e IL-10), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos após estímulo com *C. albicans* (Gráfico 8).

Monócitos estimulados com *C. albicans*

Gráfico 8 - Dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias (média $\pm$ desvio padrão), em pg/mL, produzidas in vitro pelos monócitos estimulados com *C. albicans* obtidos de idosos com estomatite protética associada a *Candida* (EPC) (grupo **Id/PT/EPC**, n=10; colunas brancas), de idosos usuários de prótese total superior (PTS) sem EPC (grupo **Id/PT**, n=17; colunas cinza-claras), de idosos não usuários de PTS (grupo **Id**, n=17; colunas cinza-escuras), e de jovens não usuários de PTS (grupo **Jov**, n=18; colunas pretas); letras iguais representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, considerando-se cada citocina individualmente ($p < 0,05$)

Monócitos, estimulados ou não com *C. albicans*, de indivíduos idosos, independente do uso ou não de PTS, produziram menores níveis de TGF- β , em comparação aos jovens (Gráficos 6 e 8).

4.5 EXPRESSÃO DE CD14 POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

A análise da expressão da molécula CD14 por imunofluorescência demonstrou que, em todos os grupos, 100% das células aderidas (DAPI⁺) nas lamínulas eram CD14⁺, independente da presença ou não de estímulo (Figura 1).

Após análise da intensidade de fluorescência nas células CD14⁺ não foi observada diferença estatística entre os grupos (considerando-se cada estímulo), bem como entre as três diferentes condições de cultivo dos monócitos (sem estímulo, ou estímulo com LPS, ou estímulo com *C. albicans*), considerando-se cada grupo individualmente.

Figura 1 - Monócitos isolados do sangue periférico de jovem não usuário de prótese total superior (grupo **Jov**) e incubados in vitro com lipopolissacarídeo (LPS) por 18 horas expressando CD14-FITC e apresentando o núcleo corado com DAPI

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Atualmente, dados numéricos revelam que a expectativa de vida da população brasileira está cada vez maior, podendo alcançar, em 2050, o patamar de aproximadamente 81 anos (IBGE, 2010). Assim, torna-se necessário refletir se profissionais da área de saúde estão preparados para essa nova situação desafiadora, já que infecções e doenças crônicas, comumente observadas nos idosos, podem ser exacerbadas em razão de alterações no sistema imune (PETERSEN, 2003; PETERSEN; YAMAMOTO, 2005; PAWELEC, 2006).

Infelizmente, a população idosa brasileira apresenta um elevado grau de edentulismo (ROSA et al., 1992; FERNANDES et al., 1997), o que resulta em um grande número de idosos usuários de próteses totais (BRASIL, 2004). Aproximadamente 60% da população brasileira entre 65 e 74 anos de idade usam PTS e 35% usam prótese total inferior (BRASIL, 2004). O uso de próteses totais, principalmente superiores, frequentemente resulta em EPC, uma doença inflamatória crônica bucal que compromete a saúde bucal dos idosos (PETERSEN; YAMAMOTO, 2005). Além da importante associação do fungo *Candida* com o biofilme sobre a superfície interna resinosa das próteses totais (RADFORD; CHALLACOMBE; WALTER, 1999; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; RAMAGE et al., 2004), a idade avançada constitui um fator predisponente para o desenvolvimento da EPC devido a aspectos relacionados à imunossenescência, bem como à diminuição do fluxo salivar (LOCKHART et al., 1999; TANIDA et al., 2001). A partir de trabalhos prévios realizados no Departamento de Estomatologia (Disciplina de Patologia, FOB/USP), Gasparoto et al. (2009b) demonstraram que, com a idade avançada, ocorrem alterações nas funções in vitro dos neutrófilos sanguíneos e salivares, como a fagocitose de *Candida* e a atividade candidacida, o que pode favorecer o estabelecimento da EPC (GASPAROTO et al., 2009b).

Assim, no presente trabalho, objetivamos avaliar a produção de citocinas pelos monócitos oriundos de idosos usuários de PTS, com ou sem EPC, a fim de esclarecer se possíveis alterações imunomodulatórias em células circulantes inflamatórias poderiam predispor indivíduos a essa doença, e se tais alterações estariam evidentes apenas em idosos.

Inicialmente, obtivemos um perfil clínico e microbiológico da nossa casuística de idosos com EPC. De acordo com a classificação de Newton (NEWTON, 1962), a maioria desses pacientes apresentou EPC do Tipo I, semelhante aos achados da literatura (JORGE et al., 1991; PIRES et al., 2002; FIGUEIRAL et al., 2007; GASPAROTO, 2009), bem como uma forte associação com *Candida* spp., presente na mucosa palatina e/ou na PTS de todos os indivíduos, sendo que a espécie mais comumente isolada foi *C. albicans*/*C. dubliniensis*, de forma isolada ou mista. Essa intensa associação entre EPC e a presença de *Candida* spp., especialmente *C. albicans*, tem sido evidenciada em inúmeros trabalhos (PIRES et al., 2002; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; FIGUEIRAL et al., 2007; GASPAROTO, 2009; OLIVEIRA, 2009). Ainda, foram detectadas *C. krusei* e *C. tropicalis* na mucosa palatina e PTS de alguns idosos com EPC, de forma isolada ou mista, assim como também observado por outros trabalhos (BARBEAU et al., 2003; DAR-ODEH; SHEHABI, 2003; FIGUEIRAL et al., 2007; GASPAROTO, 2009; OLIVEIRA, 2009), podendo indicar a participação de diferentes espécies de *Candida* na patogênese da EPC.

Entretanto, somente a presença do fungo na cavidade bucal e na PTS não é suficiente para o estabelecimento dessa doença, já que tal fungo existe em estado comensal na cavidade bucal (BUDTZ-JORGENSEN; STENDERUP; GRABOWSKI, 1975; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; PIRES et al., 2002; LYON et al., 2006). Em acordo, nossos pacientes idosos usuários de PTS, mas saudáveis, em sua maioria também apresentaram crescimento de *Candida* spp., principalmente *C. albicans*/*C. dubliniensis*, tanto no palato quanto na superfície interna da PTS. Portanto, a presença do fungo na mucosa palatina desses indivíduos demonstra seu estado não patogênico, muito evidenciado em usuários de prótese removível, especialmente idosos (LYON et al., 2006).

A transição do fungo de um estado comensal para patogênico, provocando a doença, como a EPC, é um processo complexo e depende principalmente de fatores de risco locais e sistêmicos do hospedeiro, dentre os quais se destaca a deficiência da resposta de defesa (DAVENPORT; WILTON, 1971; BUDTZ-JORGENSEN, 1973; IACOPINO; WATHEN, 1992; ROMANI, 2000). Um equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias, Th-1 e Th-2 é necessário para o desenvolvimento de uma resposta protetora à infecção por *Candida* (SPACCAPELO et al., 1995; ROMANI, 2000). As citocinas pró-inflamatórias apresentam uma função protetora,

iniciando e perpetuando a inflamação da mucosa, regulando a migração, a proliferação e a ativação de leucócitos e estimulando os mecanismos antifúngicos nas células do sistema imune, favorecendo a eliminação do fungo. Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias inibem a secreção das pró-inflamatórias e prejudicam as funções efetoras antifúngicas dos fagócitos (ROILIDES et al., 1998; BALTCH et al., 2001; LILIC et al., 2003; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005). Assim, o estudo da produção dessas citocinas torna-se necessário para o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos da EPC.

No presente trabalho, foi detectada uma variável responsividade dos monócitos, após os diferentes estímulos, quanto a sua produção de citocinas. Além disso, foi possível verificar uma disfunção na produção (espontânea ou estimulada) de citocinas pelos monócitos dos idosos com EPC, em comparação com os indivíduos saudáveis, o que pode ter contribuído para a transição de *C. albicans* da forma comensal para a patogênica, e assim favorecido a instalação e a persistência da doença nessa população idosa. É importante salientar que todas as células consideradas nesse estudo expressavam, conforme evidenciado por meio de imunofluorescência, a molécula CD14, considerada um marcador de monócito (XIONG et al., 2000, MIRLASHARI; LYBERG, 2003; NETEA et al., 2004, TOROSANTUCCI et al., 2004).

5.1 INFLUÊNCIA DOS DIFERENTES ESTÍMULOS SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO PELOS MONÓCITOS EM COMPARAÇÃO COM A PRODUÇÃO ESPONTÂNEA (GRÁFICOS 2 a 5)

Os monócitos dos idosos com EPC foram menos responsivos ao LPS do que os monócitos dos demais indivíduos, jovens e idosos, já que não houve aumento na produção de IL-1 β e IL-10, por essas células dos pacientes com EPC, após estímulo com esse produto bacteriano, em comparação com a produção espontânea; o que não foi observado nos indivíduos sem EPC, jovens e idosos. Em relação às citocinas TNF- α , IL-6 e CXCL8, células estimuladas com LPS apresentaram maior produção do que células não estimuladas, em todos os grupos avaliados.

Apenas a produção de MCP-1 e de TGF- β não foi significativamente induzida pelo LPS em nenhum dos grupos analisados, no presente trabalho, em comparação com a produção espontânea. De fato, experimentos *in vitro* têm demonstrado que o LPS não induz eficientemente a produção de MCP-1 pelos monócitos (JIANG et al., 1996) e pelas PBMCs (PASQUI et al., 2007), apesar de outros autores afirmarem o contrário (WEHRWEIN et al., 2006). Quanto ao TGF- β , em outros estudos, a sua produção por monócitos em 18 horas de cultivo foi induzida por LPS, sob concentrações maiores do que a empregada na presente tese (PERAÇOLI et al., 2003; PARISE-FORTES et al., 2006). Apesar de exercer efeitos inibidores em diversos tipos de leucócitos, o TGF- β exerce um maior impacto nos linfócitos T, regulando a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência dessas células, participando principalmente nas fases mais tardias da resposta imune (LI et al., 2006). Assim, é possível que tempos maiores de cultivo dos monócitos com a mesma concentração de LPS utilizada pudessem resultar em maior produção dessa citocina anti-inflamatória.

O LPS, utilizado como controle positivo no presente trabalho, é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, e se liga ao monócito via TLR-4 e moléculas acessórias, como o CD14, disparando uma cascata de sinalização intracelular, que leva à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear- κ B (NF- κ B), e subsequente expressão de genes que codificam proteínas importantes para as respostas imune e inflamatória (GUHA; MACKMAN, 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), tais como as citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8, IL-10 e TGF- β (JIANG et al., 1996; TADA et al., 2002; PERAÇOLI et al., 2003; OLAS et al., 2005; PARISE-FORTES et al., 2006). A ligação do LPS ao CD14 é facilitada pela formação prévia de um complexo com a proteína de ligação ao LPS solúvel (LBP), presente no sangue e no fluido extracelular, que se dissocia após a ligação do LPS ao CD14. Além disso, para uma sinalização eficiente, proteínas acessórias extracelulares, como a MD2, se ligam ao complexo CD14/TLR-4/LPS (GUHA; MACKMAN, 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Nossos resultados revelaram ainda que *C. albicans* também foi capaz de induzir a produção de citocinas pelos monócitos, em comparação com a produção espontânea, porém, de forma menos expressiva do que o estímulo com LPS. Comparando-se com a produção espontânea, o estímulo fúngico resultou em níveis

estatisticamente maiores de TNF- α , CXCL8 e MCP-1 em alguns dos grupos avaliados. *C. albicans* não foi capaz de estimular significativamente a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-1 β e das anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , pelos monócitos, em nenhum dos grupos estudados. Variações na cepa de *Candida* (que refletem na capacidade de estimular os fagócitos), na concentração fúngica e no tempo de cultura empregados (JIANG et al., 1996; TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000; BARKER; LIU; ROGERS, 2005; VAN DER GRAAF et al., 2005; GOW et al., 2007) podem resultar em divergências entre os trabalhos quanto à produção de citocinas por células desafiadas com o fungo.

Após o reconhecimento de *C. albicans* pelo monócito, que ocorre pela interação dos seus receptores, tais como TLR-2, TLR-4 (NETEA et al., 2006), CD14 (TADA et al., 2002), receptor de manose e dectina-1 (NETEA et al., 2006; GOW et al., 2007; LI et al., 2009), com os componentes da parede celular do fungo, como β -glucana (GOW et al., 2007; LI et al., 2009), nas camadas internas, e manana, nas camadas externas (TADA et al., 2002; NETEA et al., 2006), os fagócitos se ativam e têm a capacidade de produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8, MIP-1 α , MIP-1 β e MCP-1 (JIANG et al., 1996; XIONG et al., 2000; TADA et al., 2002; NETEA et al., 2004; BARKER; LIU; ROGERS, 2005; KIM et al., 2005), e anti-inflamatórias, tais como IL-10 e TGF- β (XIONG et al., 2000; LETTERIO et al., 2001).

A ausência de aumento na produção, por monócitos, das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β após desafio fúngico, comparando-se com as células não estimuladas, corrobora os achados de Kim et al. (2005), os quais revelaram ausência de expressão gênica do TGF- β em monócitos estimulados in vitro com *C. albicans* após 18 horas de cultivo, sugerindo que tais citocinas sejam produzidas pelos monócitos numa fase mais tardia após o estímulo fúngico (KIM et al., 2005). No entanto, outros autores verificaram alta produção de TGF- β pelos monócitos cultivados com *C. albicans* já nas primeiras 12 horas de incubação, e demonstraram que quanto maior a proporção levedura:monócito, maior era a produção (LETTERIO et al., 2001). Em concordância com nossos achados referentes à produção de IL-10 após estímulo dos monócitos com *C. albicans*, já foi demonstrado que em culturas de até 12 horas não houve alteração na expressão gênica dessa citocina, comparando-se células da linhagem monocítica humana (THP-1) não estimuladas e

estimuladas com *C. albicans* (BARKER; LIU; ROGERS, 2005); entretanto, outros trabalhos verificaram produção significativa de IL-10 pelos monócitos após incubação com o fungo por períodos de 18 (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000) e 20 horas (XIONG et al., 2000). Essas divergências de resultados na dosagem da IL-10 também podem ser explicadas por diferenças na metodologia adotada, incluindo tanto a concentração do inóculo fúngico, já que quanto maior a concentração do fungo, maior a produção de IL-10 (GOW et al., 2007; SARAZIN; POULAIN; JOUAULT, 2010), quanto a cepa de *C. albicans* utilizada, visto que cepas capazes de formar hifas induzem liberação de altas concentrações de IL-10 (VAN DER GRAAF et al., 2005), especialmente em comparação com a IL-12 (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000), o que funciona como mecanismo de escape de *Candida* frente às células de defesa do hospedeiro (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000; VAN DER GRAAF et al., 2005).

O presente trabalho estimulou os monócitos com leveduras mortas pelo calor, as quais são capazes de estimular eficientemente a produção de citocinas por essas células (CHIANI; BROMURO; TOROSANTUCCI, 2000; TOROSANTUCCI; CHIANI; CASSONE, 2000; XIONG et al., 2000; NETEA et al., 2004) e pelas PBMCs humanas (JIANG et al., 1996; VAN DER GRAAF et al., 2005; GOW et al., 2007), inclusive em níveis maiores do que aqueles observados após desafio com leveduras viáveis (GOW et al., 2007). A morte do fungo pelo calor resulta na exposição da β -glucana (componente da camada interna da parede celular) na superfície da parede celular fúngica e subsequente reconhecimento principalmente pelo receptor dectina-1 nos monócitos, estimulando a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. A utilização de leveduras mortas nos experimentos simula um fenômeno que ocorre in vivo no hospedeiro infectado; ou seja, a contínua destruição da parede celular do fungo pelos fagócitos expõe a glucana, que, por sua vez, estimula uma resposta inflamatória (GOW et al., 2007).

Nossos resultados revelaram que o LPS, em comparação com *C. albicans*, induziu maior produção de citocinas, em especial IL-6 (em todos os grupos). Por outro lado, o estímulo fúngico induziu maior produção de MCP-1, em comparação com o estímulo bacteriano, nos indivíduos idosos, corroborando os achados da literatura que demonstram que o LPS, diferente de *C. albicans*, é um fraco indutor da produção de MCP-1 (JIANG et al., 1996; XIONG et al., 2000; PASQUI et al., 2007).

5.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS IN VITRO PELOS MONÓCITOS NOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDO (GRÁFICOS 6 a 8)

Por meio da análise comparativa entre os diferentes grupos quanto à produção de citocinas pelos monócitos, os idosos com EPC demonstraram disfunção, na presença ou não dos estímulos. A produção das citocinas TNF- α e IL-6, pelos idosos com EPC, apresentou-se diminuída após estímulo com *C. albicans* em relação aos idosos usuários de PTS sem a doença.

A citocina pró-inflamatória TNF- α tem como principal fonte os fagócitos mononucleares ativados, sendo o principal estímulo para sua produção a ligação de produtos microbianos - como o LPS - ao seu receptor, embora o estímulo também possa advir, de forma complementar, de outras citocinas, como o IFN- γ . A principal função do TNF- α , quando não produzido em excesso, é ativar a capacidade microbicida dos fagócitos e estimular o recrutamento, principalmente por meio da indução da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, de neutrófilos, monócitos e linfócitos, permitindo o desenvolvimento de uma resposta inflamatória local (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). TNF- α também regula a produção de citocinas por outras células, incluindo células endoteliais, monócitos e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). Já foi demonstrada a importância do TNF- α na resposta imune efetiva contra diversos patógenos (AGUIRRE et al., 1995; MEHRAD; STRIETER; STANDIFORD, 1999; AVILES et al., 2008), incluindo *C. albicans*, visto que esse mediador estimula o desenvolvimento de uma resposta Th-1 protetora contra *Candida* (NETEA et al., 1999). Na ausência dessa citocina, há uma maior suscetibilidade à infecção fúngica bucal e sabe-se que seu efeito protetor ocorre especialmente nos estágios iniciais da candidose bucal (FARAH et al., 2006). TNF- α também é importante na proteção contra a infecção sistêmica por *C. albicans*, conforme demonstrado em modelos murinos (LOUIE et al., 1994).

IL-6 é sintetizada por fagócitos mononucleares, células endoteliais, linfócitos T ativados e outras células, em resposta a microrganismos e citocinas, como IL-1 e TNF- α . Na imunidade inata, IL-6 estimula a síntese de proteínas da fase aguda pelos hepatócitos e a proliferação de neutrófilos, a partir dos progenitores da medula óssea, geralmente atuando em associação com os fatores estimuladores de colônias

(CSF). Na imunidade adaptativa, estimula a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17, e inibe a geração e a ação de células T reguladoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Assim como o TNF- α , a IL-6 também é importante na defesa contra muitas infecções, incluindo infecção por *C. albicans* (BASU et al., 2008), visto que, na ausência dessa interleucina, animais são mais suscetíveis à candidose (ROMANI et al., 1996; VAN ENCKEVORT et al., 1999), e essa maior suscetibilidade mostrou-se associada à ativação de células Th-2 e à produção acentuada de IL-10 (ROMANI et al., 1996), ou ainda, a uma resposta prejudicada de neutrófilos contra *Candida* (VAN ENCKEVORT et al., 1999).

Analisada a importância do TNF- α e da IL-6 na defesa contra *Candida*, pode-se sugerir que o prejuízo na produção dessas citocinas, detectado nos nossos idosos com EPC, frente ao estímulo in vitro com *C. albicans*, pode refletir uma maior suscetibilidade desses indivíduos a infecções e doenças associadas com esse fungo, favorecendo o estabelecimento e a persistência da EPC, uma vez que os monócitos que saem da circulação e se dirigem à mucosa bucal para participar da defesa contra o fungo já podem estar funcionalmente alterados. Esse prejuízo pode ser consequência de uma interação ineficiente entre os receptores de superfície dos monócitos e o fungo e/ou de falhas na sinalização intracelular e na capacidade de ativação dos monócitos. Vale ressaltar que não detectamos, por meio de imunofluorescência, diferenças na intensidade de fluorescência do CD14, comparando-se todos os grupos, na presença ou não dos estímulos, sugerindo que a alteração na ativação dos monócitos dos idosos com EPC não esteja relacionada com a expressão de tal molécula.

Não podemos descartar a possibilidade da ocorrência de polimorfismos nos genes relacionados à resposta inflamatória (tais como genes de citocinas e de seus receptores e genes de receptores de reconhecimento de padrão), que tornariam os indivíduos geneticamente mais suscetíveis à EPC, já que a produção comprometida de citocinas por células circulantes foi mais evidente nos idosos com EPC, e não nos idosos usuários de PTS livres da doença. Polimorfismos em genes da resposta inflamatória têm contribuído para determinar suscetibilidade genética a infecções por diversos microrganismos (BOCHUD et al., 2008; MEZGER; EINSELE; LOEFFLER, 2010), incluindo *C. albicans* (VAN DER GRAAF et al., 2006; FERWERDA et al.,

2009; GLOCKER et al., 2009). Já foi demonstrada, em pacientes com candidose vulvovaginal recorrente, a presença de polimorfismo no gene do receptor dectina-1, associado a uma menor expressão desse receptor na superfície celular, resultando em defeito no reconhecimento de β -glucana de *C. albicans* por monócitos e tornando essas células menos responsivas ao fungo, com menor produção de TNF- α , IL-6 e IL-17 (FERWERDA et al., 2009). Estudos complementares são necessários para relacionar polimorfismos gênicos com suscetibilidade à EPC.

A partir dos nossos achados, não foi possível relacionar o fator idade com a hiporresponsividade dos monócitos, quanto à produção de TNF- α e de IL-6 na população com EPC, após estímulo in vitro com *C. albicans*, visto que essa alteração não ocorreu nos grupos dos idosos saudáveis em comparação com o grupo jovem.

Embora o presente trabalho tenha verificado uma disfunção na produção de IL-6 e TNF- α pelos monócitos estimulados com *C. albicans* de idosos com EPC, outros trabalhos detectaram um aumento dos níveis de TNF- α e IL-6 na saliva de idosos com a doença, em comparação com idosos saudáveis (GASPAROTO, 2009). Isso sugere que, embora os monócitos apresentem-se funcionalmente alterados quanto à produção in vitro dessas citocinas na população com a doença, outras células podem estar contribuindo para a presença desses mediadores localmente, como neutrófilos, linfócitos e células epiteliais, que são estimuladas não somente por *C. albicans*, mas também por diversos microrganismos presentes na cavidade bucal e associados com a EPC (KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; CAMPOS et al., 2008).

As células dos idosos com EPC também revelaram prejuízos na produção de citocinas após estímulo com LPS, considerando todas as citocinas avaliadas. Essa alteração da função imunomodulatória dos monócitos desses idosos frente a outros fatores microbianos, que não *C. albicans*, pode favorecer o desenvolvimento de infecções nessa população, bem como pode ser um fator adicional nos mecanismos patogênicos da EPC, já que inúmeras espécies bacterianas, incluindo Gram-negativas, presentes na cavidade bucal, estão associadas com *Candida* spp., fazendo parte dos biofilmes microbianos aderidos nas superfícies resinosas das próteses totais (KULAK; ARIKAN; KAZAZOGLU, 1997; CAMPOS et al., 2008). Monócitos pouco responsivos ao LPS também foram observados em pacientes com

paracoccidioidomicose, que produziram menores níveis de TNF- α e IL-6 após estímulo in vitro de suas células com a endotoxina bacteriana em comparação com indivíduos saudáveis (PERAÇOLI et al., 2003).

A disfunção, observada por nós, na produção de TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8, MCP-1 e IL-10 pelos monócitos de idosos com EPC frente ao estímulo com a endotoxina bacteriana parece não estar relacionada com a imunossenescência, uma vez que os idosos saudáveis responderam de forma semelhante aos jovens. Visto que o LPS é um ligante do TLR-4 e a ativação desse receptor requer interação da LBP, do CD14 e de outras moléculas acessórias, alterações em uma dessas moléculas (RENSHAW et al., 2002) ou ainda, defeitos nas vias de sinalização que levam a produção e/ou secreção dessas citocinas poderiam contribuir para a fraca resposta imunomodulatória observada pelos monócitos dos idosos com EPC estimulados com LPS. Entretanto, nossos resultados não demonstraram diferenças entre os grupos na expressão (intensidade de fluorescência) de CD14, após estímulo ou não com LPS, sugerindo que essa hiporresponsividade não esteja relacionada com tal molécula. Visto que, na complexa rede de citocinas, a presença de uma delas influencia a produção de outras, podemos sugerir ainda que a baixa produção de alguma(s) pode ter contribuído para a baixa produção de outra(s). IL-1 β , por exemplo, estimula a produção de TNF- α e IL-6 (DINARELLO, 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008), e, junto com TNF- α , aumenta a produção de CXCL8 e de MCP-1 (REMICK, 2005; YADAV; SAINI; ARORA, 2010).

O prejuízo na produção de IL-10, como observado em nossos idosos com EPC após estímulo com LPS, poderia comprometer o equilíbrio entre a resistência do hospedeiro e o processo inflamatório frente aos microrganismos, visto que essa citocina anti-inflamatória, produzida especialmente por macrófagos ativados e linfócitos T, está envolvida no controle da resposta imune, sendo importante para evitar a inflamação excessiva e o desenvolvimento de imunopatologias, com consequente destruição tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; LI; FLAVELL, 2008). Essa menor produção pelos monócitos, entretanto, parece ser característica do desafio celular com LPS, já que, após desafio com *C. albicans*, níveis semelhantes desse mediador foram observados em todos os grupos do estudo.

Com relação à produção espontânea de MCP-1, verificaram-se menores níveis nos idosos com EPC em comparação com os idosos saudáveis, usuários ou

não de PTS. A MCP-1, apesar de ser produzida principalmente em resposta a estímulos inflamatórios, também é importante sob condições não inflamatórias para manter níveis homeostáticos de monócitos circulantes, promovendo a emigração desses leucócitos da medula óssea para a circulação sanguínea (TSOU et al., 2007; JIA et al., 2008; YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Assim, uma disfunção na produção espontânea de MCP-1, conforme observado no presente estudo, poderia representar a existência de uma alteração sistêmica in vivo no recrutamento dos monócitos ou de seus precursores da medula óssea para a circulação, e esse menor influxo poderia prejudicar a posterior migração dos monócitos em direção à mucosa bucal para a defesa contra *C. albicans*. Entretanto, o número absoluto de monócitos na circulação sanguínea, analisado por meio do hemograma, não diferiu entre os três grupos idosos avaliados neste presente trabalho. Assim, diferente do sistema in vitro, é possível que in vivo essa quimiocina não apresente sua produção diminuída pelos monócitos dos idosos com EPC, em comparação com os idosos saudáveis, ou que sua produção seja compensada por outros tipos celulares, como as células endoteliais e as células do músculo liso, também fontes de MCP-1 (YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Outra hipótese é que in vivo outros mediadores possam estar contribuindo para a chegada dos monócitos da medula óssea para a circulação, como a MCP-3 (TSOU et al., 2007). A dosagem comparativa de MCP-1 no plasma de idosos com e sem EPC poderia auxiliar na elucidação dessa questão. Nossos achados também demonstraram menor produção espontânea de CXCL8 nos idosos com EPC, em comparação com os jovens. Essa quimiocina, produzida principalmente por monócitos/macrófagos estimulados por microrganismos e citocinas, desempenha como principais funções a ativação e o recrutamento de neutrófilos ao local de inflamação e infecção (REMICK, 2005). Assim, um prejuízo na sua produção pode contribuir para uma deficiência na resposta inflamatória e favorecer a instalação de infecções nessa população idosa com EPC.

De forma interessante, a produção de TGF- β pelos monócitos oriundos de indivíduos idosos, independente de serem usuários ou não de PTS, com ou sem EPC, foi menor do que aquela verificada nos jovens, sob estímulo ou não. Essa baixa produção sugere uma alteração funcional nessas células com o envelhecimento. Apesar de TGF- β desempenhar uma função inibitória sobre os linfócitos e macrófagos (LI et al., 2006), estudos demonstraram que esse mediador

desempenha uma função pró-inflamatória sobre os monócitos, recrutando-os ao local da injúria e da infecção, bem como induzindo a expressão de moléculas de adesão e a produção de IL-1 e IL-6 por essas células (WAHL et al., 1987; TURNER; CHANTRY; FELDMANN, 1990; WAHL et al., 1993; LI et al., 2006). Assim, a baixa produção de TGF- β observada nos monócitos da população idosa em nosso estudo pode estar associada com uma predisposição a doenças infecciosas, refletindo aspectos da imunossenescência. Em outros tipos celulares, entretanto, incluindo leucócitos, células dendríticas e mastócitos, o TGF- β desempenha uma função anti-inflamatória, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (ROILIDES et al., 1998; BALTCH et al., 2001; LILIC et al., 2003; DONGARI-BAGTZOGLOU; FIDEL, 2005) e controlando a quimiotaxia, a ativação e a sobrevivência dessas células (LI et al., 2006), evitando assim uma resposta imune excessiva contra os patógenos, bem como mantendo a tolerância do sistema imune aos tecidos próprios e à microbiota normal (LI et al., 2006; LI; FLAVELL, 2008). Logo, um prejuízo na produção de TGF- β , como detectado em nossos idosos, pode também contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes nessa população.

Trabalhos *in vitro* analisando a produção de TGF- β em idosos, em comparação com jovens, têm focado a produção pelos linfócitos, e demonstraram um aumento da secreção sob estímulo (GORCZYNSKI et al., 1997) ou ainda menor expressão do RNAm do TGF- β em linfócitos estimulados com mitógeno (CRISI et al., 1998). Dada a complexidade e a atividade pleiotrópica dessa citocina, estudos adicionais são necessários para melhor estabelecer a relevância da diminuição do TGF- β observada neste trabalho para a população idosa.

Com relação às outras citocinas avaliadas no presente estudo (TNF- α , IL-6, IL-1 β , CXCL8, MCP-1 e IL-10), os monócitos oriundos dos idosos sem EPC, usuários ou não de PTS, apresentaram produção semelhante em comparação aos jovens, sob estímulo ou não. Menores níveis das citocinas pró-inflamatórias CXCL8 e IL-1 β em sobrenadante de cultura de monócitos de idosos estimulados com LPS, em comparação com células obtidas de população jovem, foram observados na literatura (MCLACHLAN et al., 1995; GON et al., 1996; SADEGUI et al., 1999). Em contrapartida, outros autores demonstraram maior produção de IL-1 β pelas PBMCs dos idosos, estimuladas ou não com LPS, em relação às células oriundas de jovens (RIANCHO et al., 1994). Por fim, há trabalhos que corroboram os nossos achados e

demonstram produção semelhante de IL-10 por monócitos de idosos e jovens saudáveis estimulados ou não com LPS (DELLA BELLA et al., 2007), bem como de TNF- α , CXCL8, IL-1 β , IL-6 e IL-10 pelas células do sangue total estimuladas in vitro com *C. albicans*, comparando-se indivíduos jovens e idosos (MURCIANO et al., 2007). Similarmente, outros autores não encontraram diferenças relacionadas com a idade na secreção de TNF- α por PBMCs, estimuladas ou não com LPS (RIANCHO et al., 1994), bem como na secreção de IL-6 pelas células do sangue total estimuladas com LPS (BRUUNSGAARD, et al., 1999b). As diferenças entre os trabalhos podem ser em decorrência de inúmeros fatores, como diferenças nos protocolos experimentais, bem como na idade média, sexo e estado de saúde dos voluntários do estudo (KRABBE; PEDERSEN; BRUUNSGAARD, 2004; PANDA et al., 2009). Em nosso trabalho, de acordo com os critérios de exclusão adotados e descritos no capítulo de Casuística e Métodos, selecionamos, para todos os grupos, apenas indivíduos que não apresentassem história médica ou evidências de condições ou doenças sistêmicas relacionadas com o sistema imune ou com influência sobre ele, bem como que não fizessem uso de medicamentos que atuassem no sistema imune ou em microrganismos, minimizando interferências em nossos resultados.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que os idosos com EPC apresentam alteração da função imunomodulatória dos monócitos, com prejuízo na produção espontânea e estimulada de citocinas em relação aos idosos e jovens saudáveis. Esse desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias pode favorecer o desenvolvimento e a progressão de doenças nessa população, como a EPC. O entendimento dos mecanismos patogênicos da EPC contribui de forma relevante para os estudos que avaliam o melhor tratamento da doença. Especificamente quanto ao TGF- β , prejuízo na sua produção pelos monócitos foi evidente nos grupos representados por indivíduos idosos, permitindo uma associação da idade com a alteração funcional dos monócitos, o que representa disfunção nos mecanismos de defesa com o envelhecimento.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados apresentados foi possível concluir que:

- Os monócitos dos idosos com EPC exibiram alteração na produção in vitro (espontânea ou estimulada) de citocinas pró e anti-inflamatórias em relação aos grupos sem a doença.
- Os monócitos, estimulados ou não com *C. albicans*, oriundos dos idosos, independente do uso de PTS e da presença de EPC, exibiram alteração na produção in vitro de TGF- β em comparação com os jovens.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Agius E, Lacy KE, Vukmanovic-Stejić M, Jagger AL, Papageorgiou AP, Hall S, et al. Decreased TNF- α synthesis by macrophages restricts cutaneous immunosurveillance by memory CD4⁺ T cells during aging. *J Exp Med*. 2009;206:1929-40.

Aguirre K, Havell EA, Gibson GW, Johnson LL. Role of tumor necrosis factor and gamma interferon in acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of mice. *Infect Immun*. 1995. 63:1725-31.

Al-Dwairi ZN. Prevalence and risk factors associated with denture-related stomatitis in healthy subjects attending a dental teaching hospital in North Jordan. *J Ir Dent Assoc*. 2008;54:80-3.

Ashman RB, Farah CS, Wanasaengsakul S, Hu Y, Pang G, Clancy RL. Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection. *Immunol Cell Biol*. 2004;82:196-204.

Ashman RB, Papadimitriou JM, Fulurija A. Acute susceptibility of aged mice to infection with *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 1999;48:1095-102.

Ashman RB, Vijayan D, Wells CA. IL-12 and related cytokines: function and regulatory implications in *Candida albicans* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:686597. Epub 2010 Nov 1.

Ashman RB. Genetic determination of susceptibility and resistance in the pathogenesis of *Candida albicans* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;19:183-9.

Ashman RB. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. *Front Biosci*. 2008;13:3334-51.

Aviles H, Stiles J, O'Donnell P, Orshal J, Leid J, Sonnenfeld G, et al. Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine toxoplasma infection. *J Parasitol*. 2008;94:1282-8.

- Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martínez F, Aldape-Barrios B, Quindós G, Sánchez-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.
- Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Michelsen PB, Bopp LH. Effects of cytokines and fluconazole on the activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:96-104.
- Barbeau J, Séguin J, Goulet JP, 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;95:51-9.
- Barker KS, Liu T, Rogers PD. Coculture of THP-1 human mononuclear cells with *Candida albicans* results in pronounced changes in host gene expression. *J Infect Dis*. 2005;192:901-12.
- Bars PL, Piloquet P, Daniel A, Giumelli B. Immunohistochemical localization of type IV collagen and laminin- α 1 in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2001;30:98-103.
- Basu S, Quilici C, Zhang HH, Grail D, Dunn AR. Mice lacking both G-CSF and IL-6 are more susceptible to *Candida albicans* infection: critical role of neutrophils in defense against *Candida albicans*. *Growth Factors*. 2008;26:23-34.
- Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis*. 2008;197:253-61.
- Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002 – 2003: resultados principais [texto na Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2004 [acesso em 2011 jul 20]. Disponível em http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/04_0347_M.pdf.
- Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, Pedersen AN, Skinhøj P, Pedersen BK. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1999a;54:357-64.
- Bruunsgaard H, Pedersen AN, Schroll M, Skinhoj P, Pedersen BK. Impaired production of proinflammatory cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation in elderly humans. *Clin Exp Immunol*. 1999b;118:235-41.

Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor- α (TNF- α) and atherosclerosis. Clin Exp Immunol. 2000;121:255-60.

Budtz-Jorgensen E, Bertram T. Denture stomatitis 1. The etiology in relation to trauma and infection. Acta Odont Scand. 1970;28:71-92.

Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Commu Dent Oral Epidem. 1975;3:115-19.

Budtz-Jorgensen E. Cellular immunity in acquired candidiasis of the palate. Scan J Dent Res. 1973;81:372-82.

Butcher S, Chahel H, Lord JM. Review article: ageing and the neutrophil: no appetite for killing? Immunology. 2000;100:411-6.

Cakman I, Rohwer J, Schütz RM, Kirchner H, Rink L. Dysregulation between TH1 and TH2 T cell subpopulations in the elderly. Mech Ageing Dev. 1996;87:197-209.

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

Challacombe SJ. Immunologic aspects of oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78:202-10.

Chiani P, Bromuro C, Torosantucci A. Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*. Infect Immun. 2000;68:5628-34.

Ciaramella A, Spalletta G, Bizzoni F, Salani F, Caltagirone C, Bossù P. Effect of age on surface molecules and cytokine expression in human dendritic cells. Cell Immunol. 2011;269:82-9.

Cohen HJ, Pieper CF, Harris T, Rao KM, Currie MS. The association of plasma IL-6 levels with functional disability in community-dwelling elderly. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1997;52:M201-8.

Crisi GM, Chen LZ, Huang C, Thorbecke GJ. Age-related loss of immunoregulatory function in peripheral blood CD8 T cells. Mech Ageing Dev. 1998;103:235-54.

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

- Davenport IC, Wilton JMA. Incidence of immediate and delayed hypersensitivity to *Candida albicans* in denture stomatitis. J Dent Res. 1971;50:892-6.
- De Martinis M, Modesti M, Ginaldi L. Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons. Immunol Cell Biol. 2004;82:415-20.
- Della Bella S, Bierti L, Presicce P, Arienti R, Valenti M, Saresella M, et al. Peripheral blood dendritic cells and monocytes are differently regulated in the elderly. Clin Immunol. 2007;122:220-8.
- Dinarello CA. The many worlds of reducing interleukin-1. Arthritis Rheum. 2005;52:1960-7.
- Dongari-Bagtzoglou A, Fidel Jr PL. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. J Dent Res. 2005;84:966-77.
- Dongari-Bagtzoglou A, Wen K, Lamster IB. *Candida albicans* triggers interleukin-6 and interleukin-8 responses by oral fibroblasts in vitro. Oral Microbiol Immunol. 1999;14:364-70.
- 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;25:411-5.
- Dos Santos CM, Hilgert JB, Padilha DM, Hugo FN. Denture stomatitis and its risk indicators in south Brazilian older adults. Gerodontology. 2010;27:134-40.
- Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, et al. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. Lymphokine Cytokine Res. 1993;12:225-30.
- Espinoza I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. J Oral Pathol Med. 2003;32:571-5.
- Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. Clin Dermatol. 2000;18:553-62.
- Farah CS, Elahi S, Pang G, Gotjamanos T, Seymour GJ, Clancy R, et al. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. Infect Immun. 2001;69:6110-8.

Farah CS, Hu Y, Riminton S, Ashman RB. Distinct roles for interleukin-12p40 and tumour necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:252-5.

Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J* 2010; 55 Suppl 1: 48-54.

Fernandes RAC, Silva SRC, Watanabe MGC, Pereira AC, Martildes MLR. Uso e necessidade de prótese dentária em idosos que demandam um Centro de Saúde. *Rev Bras Odontol.* 1997;54:107-10.

Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriel AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med.* 2009;361:1760-7.

Fidan I, Yuksel S, Imir T, Kalkanci A, Kustimur S, Ilhan MN. The effects of fluconazole and cytokines on human mononuclear cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007;102:127-31.

Fidel Jr PL. Immunity to *Candida*. *Oral Diseases.* 2002;8 Suppl 2:69-75.

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;34:448-55.

Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J, Hurst TL, Strindhall J, Johansson B, et al. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev.* 2003;124:487-93.

Fouché MH, Slabbert JC, Coogan MM. Candidal antibodies in patients undergoing treatment for denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1987;57:587-91.

Gasparoto TH, Dionísio TJ, de Oliveira CE, Porto VC, Gelani V, Santos CF, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. *J Med Microbiol.* 2009a;58:959-62.

Gasparoto TH, Sipert CR, de Oliveira CE, Porto VC, Santos CF, Campanelli AP, et al. Salivary immunity in elderly individuals presented with *Candida*-related denture stomatitis. *Gerodontology.* 2011 Apr 1. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00476.x.

Gasparoto TH, Vieira NA, Porto VC, Campanelli AP, Lara VS. Ageing exacerbates damage of systemic and salivary neutrophils from patients presenting *Candida*-related denture stomatitis. *Immun Ageing.* 2009b;6:3.

Gasparoto TH. Estudo da função dos neutrófilos nos mecanismos de defesa contra a estomatite por dentadura em indivíduos idosos [tese na internet]. Bauru (SP); Universidade de São Paulo; 2009 [acesso em 2011 fev 10]. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25142/tde-25032010-090117/pt-br.php>.

Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont. 2011;20:251-60.

Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schäffer AA, Woellner C, Salzer U, et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. N Engl J Med. 2009;361:1727-35.

Gomes NE, Brunialti MK, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. Braz J Med Biol Res. 2010;43:853-8.

Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ. The aging innate immune system. Curr Opin Immunol. 2005;17:457-62.

Gomez CR, Nomellini V, Faunce DE, Kovacs EJ. Innate immunity and aging. Exp Gerontol. 2008;43:718-28.

Gon Y, Hashimoto S, Hayashi S, Koura T, Matsumoto K, Horie T. Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly. Clin Exp Immunol. 1996;106:120-6.

Gorczynski RM, Cinader B, Ramakrishna V, Terzioglu E, Waelli T, Westphal O. An antibody specific for interleukin-6 reverses age-associated changes in spontaneous and induced cytokine production in mice. Immunology. 1997;92:20-5.

Goulart MCV. Hiperplasia papilar: análise quantitativa de *Candida albicans* no revestimento epitelial e sua correlação com as características microscópicas [dissertação na internet]. Bauru (SP); Universidade de São Paulo; 2009 [acesso em 2010 abr 12]. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25136/tde-26052009-104802/pt-br.php>.

Gow NAR, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. J Infect Dis. 2007;196:1565-71.

Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. J Pathol. 2007;211:144-56.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cell Signal. 2001;13:85-94.

Hadjieva H, Dimova M, Todorov S. Stomatitis prosthetica - a polyetiologic disorder. J IMAB. 2006;12(book 2):37-40.

Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. Nat Rev Immunol. 2008;8:533-44.

Høgåsen AK, Abrahamsen TG. Increased C3 production in human monocytes after stimulation with *Candida albicans* is suppressed by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Infect Immun. 1993;61:1779-85.

Iacopino AM, Wathen WF. Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. JADA. 1992;123:46-51.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Observações sobre a evolução da mortalidade no Brasil: o passado, o presente e perspectivas [texto na Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2010 [acesso em 2011 jul 4]. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/tabuadevida/2009/notastecnicas.pdf>.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sinopse do Censo Demográfico 2010 [texto na Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2011 [acesso em 2011 abr 30]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/sinopse.pdf>.

Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis - a review of the aetiology, diagnosis and management. Aust Dent J. 1992;37:107-14.

Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. J Immunol. 2008;180:6846-53.

Jiang Y, Russell TR, Graves DT, Cheng H, Nong SH, Levitz SM. Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 production in mononuclear cells stimulated by oral microorganisms. Infect Immun. 1996;64:4450-5.

Johannessen AC, Isacsson G, Nilsen R, Bergendal T. In situ characterization of the inflammatory cell infiltrates of hyperplastic denture stomatitis. *Acta Odontol Scand.* 1986;44:185-92.

Jorge J Jr, Almeida OP, Bozzo L, Scully C, Graner E. Oral mucosal health and disease in institutionalized elderly in Brazil. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991;19:173-5.

Kim HO, Kim HS, Youn JC, Shin EC, Park S. Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *J Transl Med.* 2011;9:113.

Kim HS, Choi EH, Khan J, Roilides E, Francesconi A, Kasai M, et al. Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun.* 2005;73:3714-24.

Koutis D, Freeman S. Allergic contact stomatitis caused by acrylic monomer in a denture. *Australas J Dermatol.* 2001;42:203-6.

Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol.* 2004;39:687-99.

Kreher JM, Graser GN, Handelman SL, Eisenberg AD. Oral yeasts, mucosal health, and drug use in an elderly denture-wearing population. *Spec Care Dentist.* 1991;11:222-6.

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

Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. *J Oral Rehabil.* 2002;29:300-4.

Larsson S, Linden M. Effects of a corticosteroid, budesonide, on production of bioactive IL-12 by human monocytes. *Cytokine.* 1998;10:786-9.

Lee YS, Park KH, Kim TS, Kim JM, Sohn IS, Park JK, et al. Interaction of glycopolymers with human hematopoietic cells from cord blood and peripheral blood. *J Biomed Mater Res A.* 2008;86:1069-76.

Leigh JE, Steele C, Wormley F, Fidel Jr PL. Salivary cytokine profiles in the immunocompetent individual with *Candida*-associated denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17:311-4.

- Letterio JJ, Lehrnbecher T, Pollack G, Walsh TJ, Chanock SJ. Invasive candidiasis stimulates hepatocyte and monocyte production of active transforming growth factor beta. *Infect Immun*. 2001;69:5115-20.
- Li M, Liu ZH, Chen Q, Zhou WQ, Yu MW, Lü GX, et al. Insoluble beta-glucan from the cell wall of *Candida albicans* induces immune responses of human THP-1 monocytes through Dectin-1. *Chin Med J*. 2009;122:496-501.
- Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*. 2008;28:468-76.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:99-146.
- Lilic D, Gravenor I, Robson N, Lammas DA, Drysdale P, Calvert JE, et al. Deregulated production of protective cytokines in response to *Candida albicans* infection in patients with chronic mucocutaneous candidiasis. *Infect Immun*. 2003;71:5690-9.
- Liu L, Kang K, Takahara M, Cooper KD, Ghannoum MA. Hyphae and yeasts of *Candida albicans* differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of *C. albicans* germination. *Infect Immun*. 2001;69:4695-7.
- Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. *J Dent Res*. 1999;78:857-68.
- Louie A, Baltch AL, Smith RP, Franke MA, Ritz WJ, Singh JK, et al. Tumor necrosis factor alpha has a protective role in a murine model of systemic candidiasis. *Infect Immun*. 1994;62:2761-72.
- Lyon JP, Costa SC, Totti VMG, Munhoz MFV, Resende MA. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol*. 2006;52:462-7.
- Maródi L, Forehand JR, Johnston RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species. 2. Biochemical basis for the killing of *Candida* by mononuclear phagocytes. *J Immunol*. 1991;146:2790-4.
- Maródi L, Korchak HM, Johnston RB. Mechanisms of host defense against *Candida* species. 1. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 1991;146:2783-9.

- McLachlan JA, Serkin CD, Morrey KM, Bakouche O. Antitumoral properties of aged human monocytes. *J Immunol.* 1995;154:832-43.
- McMullan-Vogel CG, Jüde HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1999;14:183-9.
- Mehrad B, Strieter RM, Standiford TJ. Role of TNF- α in pulmonary host defense in murine invasive aspergillosis. *J Immunol.* 1999;162:1633-40.
- Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J. Senescent CD14+CD16+ monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity. *J Immunol.* 2011;186:1809-15.
- Mezger M, Einsele H, Loeffler J. Genetic susceptibility to infections with *Aspergillus fumigatus*. *Crit Rev Microbiol.* 2010;36:168-77.
- Mirlashari MR, Lyberg T. Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF-alpha production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit.* 2003;9:BR316-24.
- Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. *Eukaryot Cell.* 2011;10:34-42.
- Morimoto K, Kihara A, Suetsugu T. Clinico-pathological study on denture stomatitis. *J Oral Rehabil.* 1987;14:513-22.
- Moskona D, Kaplan I. Oral lesions in elderly denture wearers. *Clin Prev Dent.* 1992;14:11-4.
- Murciano C, Villamón E, Yáñez A, Murciano J, Mir A, O'Connor JE, et al. In vitro response to *Candida albicans* in cultures of whole human blood from young and aged donors. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51:327-35.
- Murciano C, Villamón E, Yáñez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Impaired immune response to *Candida albicans* in aged mice. *J Med Microbiol.* 2006;55:1649-56.
- Murciano C, Yáñez A, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008;53:214-21.

Naito M. Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int*. 2008;58:143-55.

Nakagawa Y, Ohno N, Murai T. Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis*. 2003;187:710-3.

Netea MG, Gijzen K, Coolen N, Verschueren I, Figdor C, Van der Meer JWM, et al. Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. *Microbes Infect*. 2004;6:985-9.

Netea MG, Gow NA, Munro CA, Bates S, Collins C, Ferwerda G, et al. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006;116:1642-50.

Netea MG, van Tits LJ, Curfs JH, Amiot F, Meis JF, van der Meer JW, et al. Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol*. 1999;163:1498-505.

Newton AV. Denture sore mouth. *Brit Dent J*. 1962;1:357-60.

Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S. Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans. *J Clin Immunol*. 2010;30:806-13.

Olas K, Butterweck H, Teschner W, Schwarz HP, Reipert B. Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Clin Exp Immunol*. 2005;140:478-90.

Oliveira CE, Gasparoto TH, Dionísio TJ, Porto VC, Vieira NA, Santos CF, et al. *Candida albicans* and denture stomatitis: evaluation of its presence in the lesion, prosthesis, and blood. *Int J Prosthodont*. 2010;23:158-9.

Oliveira CE. *Candida albicans* e estomatite por dentadura: avaliação da presença do fungo na lesão, na prótese total superior e no sangue [dissertação na internet]. Bauru (SP); Universidade de São Paulo; 2009 [acesso em 2010 abr 12]. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25136/tde-26052009-111223/pt-br.php>.

Oliveira MA, Carvalho LP, Gomes MdeS, Bacellar O, Barros TF, Carvalho EM. Microbiological and immunological features of oral candidiasis. *Microbiol Immunol*. 2007;51:713-9.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Envelhecimento ativo: uma política de saúde [texto na Internet]. Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde; 2005 [acesso em 2011 jul 23]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/envelhecimento_ativo.pdf.

Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 2009;30:325-33.

Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, et al. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol.* 1998;275:E294-9.

Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20:87-103.

Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peracoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. *Br J Dermatol.* 2006;154:643-50.

Pasqui AL, Di Renzo M, Auteri A, Federico G, Puccetti L. Increased TNF- α production by peripheral blood mononuclear cells in patients with Krabbe's disease: effect of psychosine. *Eur J Clin Invest.* 2007;37:742-5.

Pawelec G. Immunity and ageing in man. *Exp Gerontol.* 2006;41:1239-42.

Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques SA, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 2003;5:413-8.

Pereira EM. Candidose associada ao uso de prótese total superior: avaliação demográfica, clínica e microscópica [dissertação na internet]. Bauru (SP); Universidade de São Paulo; 2007 [acesso em 2009 mar 10]. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25136/tde-14062007-155854/pt-br.php>.

Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008;16:86-94.

Petersen PE, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33:81-92.

Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31 Suppl 1:3-24.

Peterson PK, Chao CC, Carson P, Hu S, Nichol K, Janoff EN. Levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin 6, interleukin 10, and transforming growth factor beta are normal in the serum of the healthy elderly. *Clin Infect Dis.* 1994;19:1158-9.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996;34:58-61.

Pires FR, Santos EBD, Bonan PRF, Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil.* 2002;29:1115-9.

Pirofski L & Casadevall A. Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis. *J Exp Med* 2009;206:269-73.

Plowden J, Renshaw-Hoelscher M, Engleman C, Katz J, Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell.* 2004;3:161-7.

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;10:99-116.

Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for *Candida* biofilms. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98:53-9.

Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med.* 2005;33:S466-7.

Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, Gewirtz A, Katz J, Sambhara S. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol.* 2002;169:4697-701.

Riancho JA, Zarrabeitia MT, Amado JA, Olmos JM, González-Macías J. Age-related differences in cytokine secretion. *Gerontology.* 1994;40:8-12.

Rodriguez-Archilla A, Urquia M, Cutando A, Asencio R. Denture stomatitis: quantification of interleukin-2 production by mononuclear blood cells cultured with *Candida albicans*. *J Prosthet Dent.* 1996;75:426-31.

- Roilides E, Anastasiou-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, Kadiltsoglou I, Tsaparidou S, Panteliadis C, et al. Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 1998;178:1734-42.
- Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, et al. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. J Exp Med. 1996;183:1345-55.
- Romani L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. J Leukoc Biol. 2000;68:175-9.
- Rosa AGF, Fernandez RAC, Pinto VG, Ramos LR. Condição de saúde bucal em pessoas de 60 anos ou mais no município de São Paulo (Brasil). Rev Saúde Pública. 1992;26:155-60.
- Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. Exp Gerontol. 1999;34:959-70.
- Sakata-Kaneko S, Wakatsuki Y, Matsunaga Y, Usui T, Kita T. Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing. Clin Exp Immunol. 2000;120:267-73.
- Sandmand M, Bruunsgaard H, Kemp K, Andersen-Ranberg K, Pedersen AN, Skinhøj P, et al. Is ageing associated with a shift in the balance between Type 1 and Type 2 cytokines in humans? Clin Exp Immunol. 2002;127:107-14.
- Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, de Oliveira Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111:726-33.
- Santarpia RP, Pollock JJ, Renner RP, Spiechowicz E. An in vivo replica method for the site-specific detection of *Candida albicans* on the denture surface in denture stomatitis patients: correlation with clinical disease. J Prosthet Dent. 1990;63:437-43.
- Sarazin A, Poulain D, Jouault T. In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line. Med Mycol. 2010;48:912-21.
- Scalercio M, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus candidíase: diagnóstico e tratamento. RGO. 2007;55:395-8.

Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol*. 2002;118:652-7.

Seidler S, Zimmermann HW, Bartneck M, Trautwein C, Tacke F. Age-dependent alterations of monocyte subsets and monocyte-related chemokine pathways in healthy adults. *BMC Immunol*. 2010;11:30.

Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*. 2005;129:569-82.

Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:340-6.

Spaccapelo R, Romani L, Tonnetti L, Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, et al. TGF-beta is important in determining the in vivo patterns of susceptibility or resistance in mice infected with *Candida albicans*. *J Immunol*. 1995;155:1349-60.

Steele C, Fidel Jr PL. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2002;70:577-83.

Stohlawetz P, Hahn P, Köller M, Hauer J, Resch H, Smolen J, et al. Immunophenotypic characteristics of monocytes in elderly subjects. *Scand J Immunol*. 1998;48:324-6.

Stout RD, Suttles J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol Rev*. 2005;205:60-71.

Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, et al. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol*. 2002;46:503-12.

Tanida T, Ueta E, Tobiume A, Hamada T, Rao F, Osaki T. Influence of aging on candidal growth and adhesion regulatory agents in saliva. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:328-35.

Tonte A, Stevens M. Specific age groups: pediatric and geriatric hematology. In: Rodak BF. *Diagnostic hematology*. Philadelphia: W. B. Saunders; 1995. p. 587-96.

Torosantucci A, Chiani P, Cassone A. Differential chemokine response of human monocytes to yeast and hyphal forms of *Candida albicans* and its relation to the beta-1,6 glucan of the fungal cell wall. *J Leukoc Biol.* 2000;68:923-32.

Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Stringaro A, Crateri P, Mariotti S, et al. *Candida albicans* Yeast and Germ Tube Forms Interfere Differently with Human Monocyte Differentiation into Dendritic Cells: a Novel Dimorphism-Dependent Mechanism To Escape the Host's Immune Response. *Infect Immun.* 2004;72:833-43.

Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117:902-9.

Turner M, Chantry D, Feldmann M. Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 1990;2:211-6.

van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16:453-9.

van der Graaf CA, Netea MG, Morré SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:29-34.

van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun.* 2005;73:7458-64.

van Enckevort FH, Netea MG, Hermus AR, Sweep CG, Meis JF, Van der Meer JW, et al. Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. *Med Mycol.* 1999;37:419-26.

Vásquez N, Walsh TJ, Friedman D, Chanock SJ, Lyman CA. Interleukin-15 augments superoxide production and microbicidal activity of human monocytes against *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1998;66:145-50.

Vázquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61:170-92.

Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE. Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4577-81.

Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, et al. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:5788-92.

Wang M, Friedman H, Djeu JY. Enhancement of human monocyte function against *Candida albicans* by the colony-stimulating factors (CSF): IL-3, granulocyte-macrophage-CSF, and macrophage-CSF. *J Immunol*. 1989;143:671-7.

Wehrwein G, Neumeier M, Schäffler A, Kopp A, Weigert J, Abke S, et al. Lipopolysaccharide regulated protein expression is only partly impaired in monocytes from patients with type I diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2006;5:5.

Xiong J, Kang K, Liu L, Yoshida Y, Cooper KD, Ghannoum MA. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun*. 2000;68:2464-9.

Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*. 2010;411:1570-9.

Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36:223-8.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Formulário para coleta de dados clínicos dos pacientes avaliados**I. Identificação do voluntário:**

Nome:

Data de nascimento:

Idade:

Sexo:

Naturalidade:

Estado:

Nacionalidade:

Ocupação:

Estado civil:

Endereço Residencial:

Bairro:

Cidade:

Estado:

Telefone:

Telefone recado:

Falar com:

Endereço Profissional:

Telefone:

Bairro:

Cidade:

Estado:

II. Anamnese:

1. Utiliza prótese total superior: € 1. Sim € 2. Não
2. Há quanto tempo utiliza:
3. Quais os cuidados de higienização com a prótese:
4. Uso noturno da prótese: € 1. Sim € 2. Não
5. Faz uso de alguma medicação: € 1. Sim € 2. Não Qual medicação?
6. Realizou algum tratamento recente: € 1. Sim € 2. Não Qual tratamento?
7. Frequência de visitas ao médico:
8. Há alteração endócrina (diabetes, gravidez, hipo e hipertireoidismo): € 1. Sim € 2. Não.
9. Realizou alguma cirurgia: € 1. Sim € 2. Não Qual cirurgia?
10. Apresentou sangramento excessivo: € 1. Sim € 2. Não
11. Apresenta algum problema na cicatrização: € 1. Sim € 2. Não
12. Apresenta dor no corpo: € 1. Sim € 2. Não
13. Sente cansaço mesmo sem exercício físico: € 1. Sim € 2. Não
14. Apresenta náuseas ou vômito com frequência: € 1. Sim € 2. Não
15. Apresenta perda ou redução de apetite: € 1. Sim € 2. Não

16. Houve perda de peso atualmente: € 1. Sim € 2. Não
17. Apresenta inchaço em alguma parte do corpo: € 1. Sim € 2. Não
18. Tabagismo: € 1. Sim € 2. Não
19. Etilismo: € 0. Não € 1. + dose € 2. ++ € 3. +++ € 4. ++++ € 5. ex-etilista
20. Apresentou distúrbio gastrointestinal recentemente: € 1. Sim € 2. Não

III. Exame físico intrabucal:

21. Condições de higienização da prótese:
22. Condição das arcadas superior e inferior:
23. Apresenta estomatite protética: € 1. Sim € 2. Não
24. Tipo (Newton): € 1. Tipo I € 2. Tipo II € 3. Tipo III
25. Apresenta sintomas:
26. Descrição clínica da lesão:

APÊNDICE B – Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU Comitê de Ética em Pesquisa

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

A nossa pesquisa tem o objetivo de analisar os mecanismos de defesa das células do sangue de idosos com estomatite protética associada a *Candida*. Assim, necessitaremos de amostras de sangue de voluntários usuários ou não de dentadura, sofrendo de estomatite ou não. A coleta de sangue será realizada uma única vez, por um biólogo qualificado. Os riscos e o desconforto da coleta de sangue são mínimos e de total responsabilidade da pesquisadora responsável pelo projeto. A coleta de sangue é a mesma que se realiza em laboratório de análise, sendo muito segura. Esta pesquisa pretende melhorar o entendimento da estomatite protética associada a *Candida*, podendo contribuir para o melhor tratamento da doença, proporcionando saúde bucal para todos.

Informamos ainda que a partir da amostra de sangue obtida será realizado o hemograma e os resultados serão disponibilizados para o seu conhecimento.

Qualquer dúvida é só procurar a aluna Patricia Freitas Faria, no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, ou pelo telefone (14) 3235-8251. Caso mude de ideia e não queira mais participar da pesquisa, esclareço que o tratamento odontológico oferecido pela faculdade ocorrerá da mesma maneira, sem qualquer prejuízo.

Caso queira apresentar reclamações em relação a sua participação na pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB-USP, pelo endereço da Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 (sala no prédio da biblioteca, FOB/USP) ou pelo telefone (14) 3235-8356.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador
Responsável

ANEXO

ANEXO A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – Brasil – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Proc. CEP nº 100/2008

Bauru, 16 de agosto de 2011.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria para alteração do título do projeto de pesquisa *“Imunossenescência e estomatite por dentadura: avaliação da ativação e da produção de citocinas pró e antiinflamatórias pelos monócitos”*, de autoria de Patrícia Freitas-Faria, sob sua orientação, para *“Produção de citocinas pelos monócitos de idosos com estomatite protética associada a Candida”*, informamos a autorização deste Colegiado, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Prof^a Dr^a Vanessa Soares Lara
Docente do Departamento de Estomatologia