UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANA REGINA CASAROTO

**Resposta imune inata na estomatite protética: interação in vitro
entre células epiteliais de palato humano e *Candida albicans***

BAURU
2013

ANA REGINA CASAROTO

**Resposta imune inata na estomatite protética: interação in vitro
entre células epiteliais de palato humano e *Candida albicans***

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: Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

Versão Corrigida

BAURU

2013

C263r

Casaroto, Ana Regina

Resposta imune inata na estomatite protética:
interação in vitro entre células epiteliais de palato
humano e *Candida albicans* / Ana Regina Casaroto.
– Bauru, 2013.

148 p. : il. ; 31cm.

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: 001/2012

Data: 09 de março de 2012

DEDICATÓRIA

*Aos meus queridos pais, **Valdecir e Regina**, pelo incentivo e esforço imensuráveis para que eu pudesse trilhar no caminho dos estudos; pelo apoio, correções e ensinamentos que formaram os alicerces de minha história; por toda dedicação, perseverança, carinho e amor com que conduziram minha educação.*

*Ao meu querido esposo, **Eduardo**, pelo amor, confiança e cumplicidade. Por me amar incondicionalmente, me incentivar e me ensinar a cada dia que ser paciente é uma virtude. A você que pacientemente e, às vezes, risonhamente, entendeu minha ausência. Obrigada por ser esse anjo que Deus colocou em minha vida, estando sempre ao meu lado. Esta conquista é nossa!*

*Carinhosamente ao meu irmão, **Hugo**, pela amizade e companheirismo. Por me ensinar a levar a vida de forma mais leve e divertida.*

*À minha querida sogra, **Lucilia**, por toda ajuda e compreensão ao longo destes anos. Obrigada por ter proporcionado que minhas viagens e minha estadia em Bauru fossem menos preocupantes e mais leves. A ajuda da senhora facilitou minha caminhada e me deu forças para chegar até aqui. Muito obrigada!*

*“Se vi mais longe foi por estar de pé
sobre ombros de gigantes.”*

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelo dom da vida, pela saúde, pelas oportunidades, pela família e pelos amigos que me deste. Agradeço por ter me concedido a sabedoria, o discernimento e a compreensão, imprescindíveis para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Vanessa Soares Lara**, que me aceitou e acreditou em meu potencial, e assim, me deu a oportunidade de realizar este trabalho e concretizar um sonho. Obrigada, não só pelos ensinamentos científicos, mas também pelos ensinamentos de vida. Ensinou-me que, por maior que seja o obstáculo, nada supera o esforço, a dedicação e a honestidade. Agradeço pela compreensão, apoio e palavras amigas que tornaram minha caminhada mais leve ao longo desse período. Por mais que expresse, minhas palavras não são capazes de traduzir o respeito e a admiração que tenho por sua pessoa. A convivência me fez admirá-la pela sabedoria em conciliar o ser mãe, esposa, professora e pesquisadora. Obrigada pela amizade, carinho, atenção, exemplo... Muito obrigada!

À Profa. Dra. **Mirian Marubayashi Hidalgo** que tanto me ensinou desde a minha iniciação científica. Seu exemplo como professora e pesquisadora despertou em mim o amor pela docência e pela pesquisa. Obrigada por todos os seus ensinamentos os quais me proporcionaram uma formação sólida e permitiram minha caminhada na Pós-Graduação. Hoje, a conclusão desta etapa e o meu estado como professora, é resultado de um ciclo que teve início e base no seu exemplo. Muito obrigada!

Aos professores da Disciplina de Patologia da FOB pelos ensinamentos e orientações. Obrigada ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, pelo exemplo de humildade e simplicidade; obrigada também pelos momentos divertidos que passamos em Michigan (USA). Obrigada à **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, com quem muito aprendi durante este período. Obrigada ao **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, pelas suas aulas contagiantes e sua didática a ser seguida.

À querida amiga e mestranda **Rafaela Alves da Silva Alavarce**, uma pessoa companheira, honesta, dedicada, disciplinada, uma guerreira! Todo o seu esforço em me ajudar foi fundamental para a realização e finalização deste trabalho. Sua amizade e seu companheirismo permitiram que eu concretizasse um sonho, e as palavras não serão suficientes para expressar minha gratidão. Obrigada por me apoiar, me ajudar, me aguentar preocupada e até de mau humor. Obrigada, também, por me acolher em sua casa nesta fase final.

À **Profa. Dra. Monica Beatriz Mathor** e à **Dra. Maria Fátima Guarizo Klingbeil**, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/USP) que abriram as portas dos seus laboratórios, sanando todas as dúvidas referentes à cultura de células epiteliais de mucosa bucal, além de nos conceder alíquotas das células para início dos experimentos.

À **Profa. Dra. Maria Lucia Rubo de Rezende** do Departamento de Prótese, Disciplina de Periodontia da FOB-USP, por permitir a coleta das amostras de tecido epitelial palatal na Clínica de Periodontia desta faculdade.

À amiga e doutoranda **Samira Salmeron** por toda disponibilidade e atenção na realização da coleta das amostras de tecido epitelial palatal para desenvolvimento da cultura primária de células epiteliais.

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

Ao **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** do Departamento de Ciências Biológicas, Disciplina de Farmacologia da FOB-USP, que gentilmente cedeu o laboratório, possibilitando a realização da técnica experimental RT-qPCR.

Ao funcionário da Disciplina de Farmacologia, **Ms. Thiago José Dionísio**, por toda atenção e ajuda para execução da técnica experimental RT-qPCR.

Ao **Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto** por todo apoio e incentivo, além de permitir a utilização dos equipamentos do Centro Integrado de Pesquisa (CIP).

Às funcionárias do Laboratório de Patologia e amigas, **Fátima Aparecida Silveira e Maria Cristina Carrara Felipe**, que muito contribuíram para a organização e bom andamento do serviço. Obrigada por sempre me acolherem e me proporcionarem momentos de descontração, facilitando minha permanência em Bauru. Obrigada pela amizade e ajuda!

Aos funcionários do CIP: **Ms Márcia Sirlene Zardin Graeff**, por ter contribuído com a captura e análise das imagens através da microscopia de varredura confocal; **Neusa Caetano Barbosa**; e em especial aos amigos **Marcelo Milanda e Renato Pereira Murbach**, que sempre me socorreram nos momentos de dificuldades experimentais e tornaram minhas horas de trabalho laboratorial mais agradáveis.

Aos funcionários da Disciplina de Bioquímica, **Ovídio dos Santos Sobrinho e Thelma Lopes Silva**, que sempre atenderam meus pedidos de ajuda.

Ao **Dr. Cleverson Teixeira Soares** pelos ensinamentos e proveitosas discussões de casos clínicos.

À minha grande amiga **Ivone Pires** que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis dessa caminhada. Agradeço por todos os conselhos, pelos desabafos, pelas orações, pela força nos instantes de desânimo. Agradeço, principalmente, a Deus por ter colocado você em meu caminho. Muito obrigada!

À amiga **Karen Henriette Pinke**, pela amizade e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Obrigada pela força que me concedeu na finalização desse trabalho e, em especial, por ter me ajudado com o relatório da FAPESP.

Ao amigo **Heliton Gustavo de Lima**, pessoa que esteve ao meu lado ao longo desses quatro anos. Juntos vivenciamos muitas histórias que ficarão na lembrança. Momentos de alegrias, de muitas risadas, de tristezas, de medos, de discussões, de muito estudo, aprendizado... Obrigada pela companhia divertida e prazerosa ao longo desse período!

Às amigas **Priscila Lie Tobouti, Fernanda Mombrini Pigatti, Maria Carolina Martins Mussi e Adriana dos Santos Caetano**. Iniciamos juntas a caminhada em Bauru e compartilhamos grandes momentos. A amizade e a companhia de vocês tornaram meus dias na Pós-graduação mais prazerosos e me deram forças nos momentos de desânimo e preocupação. Agradeço à “Carol Mussi” por ter me recebido em sua casa durante as minhas idas à São Paulo. Obrigada pela força.

Aos amigos **Pepe Burgos, Taiane Gardizani e Nara Ligia Martins Almeida** pelos momentos de descontração. Aprendi um pouco com cada um de vocês!

Ao amigo **Felipe Alavarce**, que juntamente com sua esposa, **Rafaela Alavarce**, gentilmente me recebeu em sua casa nesta fase de finalização do trabalho. A companhia de vocês me propiciou calma, serenidade e condição emocional. Não esquecerei o que fizeram por mim

Aos demais amigos da Patologia: **Patrícia Freitas Faria, Diego Mauricio Bravo Calderón, Bruna Vilardi, Taísa Vilardi, Bruno Aiello Barbosa, Carine Ervolino de Oliveira, Maria Carolina Vaz Goulart, Cristiane Alves Paz de Carvalho, Érika Orti-Raduan, Alexandre Garcia, Mariana Santos, Natália Garcia, Eloisa Soria, Simone Faustino, Sylvie Brener, Magda Paula Nascimento, Francisco Barros, Aroldo dos Santos Almeida** “in memoriam” e outros, com quem dividi momentos de estudo e descontração.

*Às minhas amigas, companheiras de viagem e, atualmente, colegas de trabalho **Elen Tolentino** e **Janaína Maniezo**. Agradeço por toda força e suporte para que eu pudesse concluir este trabalho. Obrigada!*

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!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

*À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa do excelentíssimo Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira.***

*À Comissão da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti.***

*Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na Área de Concentração em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa da **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira,** responsável por esta disciplina.*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pela concessão de minha bolsa de doutorado.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa (2011/17481-6), concedendo recursos financeiros para a viabilização deste trabalho.*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”*

Marthin Luther King

RESUMO

A presença de *Candida albicans* nos biofilmes microbianos da superfície interna das próteses totais superiores está relacionada com uma doença inflamatória no palato, a estomatite protética. Constituinte da defesa inata do hospedeiro, o epitélio bucal, por sua vez, tem a capacidade de reconhecer e reagir aos fatores fúngicos a fim de evitar a invasão pelo microrganismo. O objetivo deste trabalho foi avaliar in vitro o efeito direto e indireto de *C. albicans* viável sobre as células epiteliais de palato humano (CEPH) ao longo do tempo. Objetivamos correlacionar os eventos de agressão, apoptose e invasão das CEPH provocados pelo fungo, com as respostas de defesa epitelial mediante produção de óxido nítrico (NO) e expressão gênica do peptídeo antimicrobiano β -defensina 2 (hBD-2). **Material e Métodos:** As CEPH foram obtidas, parte pelo método explante e parte pelo método enzimático, e mantidas em co-cultivo sobre uma camada de sustentação *feeder-layer* (fibroblastos gengivais humanos mitoticamente inativados). Após desafios das CEPH com *C. albicans* ATCC 90028 por contato direto fungo-epitélio (D.D.) e indireto pelo sobrenadante da cultura do fungo hifal (D.I.), proporções de desafio de 0,01/1; 0,025/1 e 0,1/1 levedura/queratinócito (FUN/EPI) e tempos experimentais de 3, 6 e 10 h foram determinados; via ensaios de viabilidade celular por imunofluorescência (LIVE/DEAD), e análise qualitativa da invasão celular pelo fungo por meio do método colorimétrico com laranja de acridina. A apoptose epitelial foi determinada pela marcação nuclear fluorescente com Hoechst 33258. A produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de RNAm de hBD-2 foram avaliados por reação colorimétrica de Griess e RT-qPCR, respectivamente. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão e submetidos aos testes estatísticos ANOVA Fatorial, Teste de Contraste; ou Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Resultados:** Em 3 h, foi detectado aumento da apoptose das células epiteliais em relação ao Meio (epitélio não desafiado, $p < 0,05$), na proporção 0,1/1 FUN/EPI, a qual manteve-se ao longo do tempo, com o aumento da concentração fúngica e independente de D.D. e D.I. O início da invasão intraepitelial pelo fungo foi observado no tempo de 6 h, em especial na proporção 0,025/1 FUN/EPI, coincidindo com discreto aumento da concentração de NO e expressão máxima de hBD-2 pelas CEPH desafiadas

diretamente ($p < 0,05$). Entretanto, nos estágios tardios (10 h) foram observados redução de NO e retorno da expressão de hBD-2 ao basal, com intensificação da invasão epitelial. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que os fatores secretados por *C. albicans* foram suficientes para agressão das CEPH, com indução da apoptose, mesmo na ausência do contato direto fungo-epitélio. As CEPH, por sua vez, apresentaram respostas de defesa após 6 h de desafio fúngico, por meio da liberação de NO e expressão de hBD-2, porém com necessidade da interação direta fungo-epitélio. A ativação da via de apoptose das CEPH ocorreu previamente à ativação destes mecanismos de defesa epitelial.

Palavras-chave: Estomatite sob prótese. *Candida albicans*. Palato humano. Apoptose. β -defensina.

ABSTRACT

Innate immune response in denture stomatitis: in vitro interaction between human palatal epithelial cells and *Candida albicans*

The presence of the fungus *Candida albicans* in the microbial biofilm underlying maxillary prosthesis is related to an inflammatory reaction of the palatal mucosa, the denture stomatitis. As a component of the host innate defense, the oral epithelium has the ability to recognize and react to fungal factors in order to prevent the microorganism invasion. The aim of this study was to in vitro evaluate the direct and indirect effect of viable *C. albicans* on the human palatal epithelial cells (HPEC) over time. The aggressive events, such as apoptosis and HPEC invasion by the fungus, were correlated with epithelial defense responses through the nitric oxide (NO) production and antimicrobial peptides β -defensin (hBD-2) mRNA expression.

Methods: The HPEC were obtained by explant and enzymatic methods, and were maintained in co-culture on a *feeder-layer* support (mitotically inactivated human gingival fibroblasts). After the HPEC challenges with *C. albicans* ATCC 90028 by direct contact fungus-epithelium (D.D.) and indirect contact by supernatant from hyphal fungus (D.I.), defiance ratios of 0.01/1, 0.025/1 and 0.1/1 yeast/keratinocyte (FUN/EPI) and experimental times of 3, 6 and 10 h were determined. These conditions were standardized by cell viability immunofluorescence assay (LIVE/DEAD), and cell invasion qualitative analysis (colorimetric method with acridine orange). The apoptotic cells were determined by fluorescent nuclear staining with Hoechst 33258. The nitric oxide (NO) production and hBD-2 gene expression were evaluated by Griess colorimetric reaction and RT-qPCR, respectively. The results were expressed as mean $\pm$ standard deviation and were analyzed using the factorial ANOVA, Contrast Test; or Mann-Whitney Test ($p < 0,05$). **Results:** At 3 h, the apoptotic epithelial cells under 0.1/1 FUN/EPI increased compared to epithelium unchallenged ($p < 0,05$) that remained over time with increasing concentration and independent of D.D. and D.I. The onset of intraepithelial invasion by the fungus was observed at 6 h, especially in the ratio of 0.025/1 FUN/EPI under D.D., coinciding with a slight increase of NO concentration and maximum hBD-2 mRNA expression

by HPEC ($p < 0,05$). However, in later stages (10 h), the NO reduction and return of hBD-2 gene expression to basal, with epithelial invasion intensification, were observed. **Conclusion:** These results suggest that factors secreted by *C. albicans* were enough to HPEC injury, with apoptosis induction, even in the absence of direct contact fungus-epithelium. On the other hand, HPEC presented defense responses after 6 h of fungal challenge through NO release and hBD-2 expression, but with requirement of direct interaction fungus-epithelium. The HPEC apoptosis occurred prior to the activation of these mechanisms of epithelial defense.

Keywords: Denture stomatitis. *Candida albicans*. Human palate. Apoptosis. β -defensin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Obtenção das células epiteliais de palato humano (CEPH) pelo método explante. A) Halo de células em formação (seta preta) a partir da multiplicação celular ao redor do fragmento epitelial (*). B) Processo de tripsinização com rompimento das junções intercelulares (seta vermelha). Microscopia de campo claro (aumento de 100x)..... **55**
- Figura 2** - Cultura de fibroblastos gengivais humanos. Microscopia de campo claro (A, aumento de 100x; B, aumento de 400x)..... **58**
- Figura 3** - Co-cultivo das células epiteliais (*) de mucosa bucal de palato humano com fibroblastos gengivais humanos (seta) (*feeder-layer*). Microscopia de campo claro. A) Co-cultura de 4 dias (aumento de 40x). B) Co-cultura de 8 dias (aumento de 100x). C) Co-cultura de 15 dias (aumento de 40x). D) Co-cultura de 15 dias (aumento de 100x). E) Co-cultura confluenta de 30 dias (aumento de 40x). F) Co-cultura confluenta de 30 dias (aumento de 100x)..... **61**
- Figura 4** - CEPH, ora coradas em verde (células vivas), ora coradas em vermelho (células mortas), após D.D. com leveduras de *C. albicans* (fungo na forma filamentosa, seta amarela). A: epitélio não desafiado (Meio); B a F: D.D. com as diferentes proporções FUN/EPI, após diferentes períodos. Microscopia de fluorescência (A, B, C, D e F, aumento de 200x; E, aumento de 50x)..... **75**
-

Figura 5 - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.D. com <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). (α) $p < 0,03$ quando comparado com 3, 6 e 8 h. (β) $p < 0,05$ quando comparado com 10 h. (γ) $p < 0,03$ quando comparado com 12 h. (ϕ) $p < 0,016$ quando comparado com 3 e 6 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	78
Figura 6 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.D., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	79
Figura 7 - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I. com <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). (α) $p < 0,03$ quando comparado com 3, 6 e 8 h. (β) $p < 0,03$ quando comparado com 10 h. (γ) $p < 0,01$ quando comparado com 3, 6, 8, 10 e 12 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	81
Figura 8 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,02$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	82
Figura 9 - Comparação das CEPH viáveis após D.D. e D.I. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) durante um período de 24 h. (*) $p < 0,05$ quando comparado com D.I. durante o mesmo período experimental. Três experimentos independentes; Teste Mann-Whitney.....	84

Figura 10 - Estágios da invasão das CEPH (*) por <i>C. albicans</i> (seta), diretamente desafiadas nas suas diferentes proporções FUN/EPI. Forma filamentosa aderida à superfície das células epiteliais (A e B). Início da invasão intraepitelial pelo fungo (C). Invasão intraepitelial intensificada com o aumento da proporção de <i>C. albicans</i> e com o passar do tempo experimental (D, E e F). Desestruturação das CEPH (G e H). Biofilme fúngico na ausência da célula epitelial (I e J). Coloração com laranja de acridina (Microscopia de varredura confocal a laser em cortes transversais, aumento de 630x).....	87
Figura 11 - Núcleos das CEPH em apoptose (setas) após D.D. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). Microscopia de fluorescência (aumento de 400x).....	91
Figura 12 - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). (*) $p < 0,04$ quando comparado com 3 e 10 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	94
Figura 13 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) e entre estas e o meio, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,02$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	94
Figura 14 - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	96

Figura 15 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) e entre estas e o meio, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,02$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	96
Figura 16 - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). (α) $p < 0,009$ quando comparado com 3 e 6 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	98
Figura 17 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,05$ quando comparado com as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> e com o meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	98
Figura 18 - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com <i>C. albicans</i> (FUN/EPI). Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	100
Figura 19 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I., para o mesmo período de tempo. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.....	100

-
- Figura 20** - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com *C. albicans* (FUN/EPI). Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (α) $p < 0,024$ quando comparado com 1, 3 e 10 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste..... **102**
- Figura 21** - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. para o mesmo período de tempo. Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (*) $p < 0,007$ quando comparado com o meio. (#) $p < 0,047$ quando comparado com o LPS. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste..... **102**
- Figura 22** - Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com *C. albicans* (FUN/EPI). Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (α) $p < 0,017$ quando comparado com 1, 3 e 10 h. (β) $p < 0,001$ quando comparado com 1 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste..... **104**
-

Figura 23 - Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. para o mesmo período de tempo. Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (*) $p<0,0007$ quando comparado com o meio. (#) $p<0,013$ quando comparado com o LPS. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste..... **104**

Figura 24 - Comparação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH após D.D. e D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h. Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (*) $p<0,004$ quando comparado com D.I durante o mesmo período experimental. Três experimentos independentes; Teste Mann-Whitney. **105**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 24 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).....	77
Tabela 2 - Percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 24 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).....	80
Tabela 3 - Percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).....	93
Tabela 4 - Percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).....	95
Tabela 5 - Liberação de óxido nítrico (NO) in vitro pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).....	97

Tabela 6 - Liberação de óxido nítrico (NO) in vitro pelas CEPH, não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).....	99
Tabela 7 - Regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes). Os valores de RNAm foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência).....	101
Tabela 8 - Regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de <i>C. albicans</i> (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes). Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência).....	103

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μg/mL	Micrograma por mililitro
μM	Micromolar
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	DNA complementar
Cel	Célula
CEPH	Células epiteliais de palato humano
cm ²	Centímetro quadrado
CO ₂	Dióxido de carbono
D.D.	Desafio direto
D.I.	Desafio indireto
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Fator de crescimento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
FUN/EPI	Fungo/epitélio
h	Hora
hBD	β-defensina
hBD-2	β-defensina 2
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase indutiva
UI/mL	Unidade internacional por mililitro
LPS	Lipopolissacarídeo (<i>lipopolysaccharide</i>)
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mm ²	Milímetro quadrado
mM	Milimolar
mRNA	<i>Messenger RNA</i> - RNA mensageiro
NF-κB	Fator nuclear-kappa B (<i>nuclear factor-kappa B</i>)
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos (<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>)
PBS	Solução salina tamponada em fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PFA	Paraformaldeído
pM	Picomolar
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PMNs	Polimorfonucleares
RHOE	Epitélio bucal humano reconstituído (<i>reconstituted human oral epithelia</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNOS	Espécies reativas de óxido nítrico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa (<i>Reverse Transcription</i>)
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription – quantitative Polymerase chain reaction</i> – Transcrição reversa seguida de reação quantitativa em cadeia da polimerase
s	Segundo
SAP	Proteinase aspartil secretada
SBF	Soro bovino fetal
SD	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
Th	Linfócito T auxiliar (<i>T helper</i>)
TLR	Receptor do tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa (tumor <i>necrosis factor-alpha</i>)
TSB	Caldo triptona de soja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	ESTOMATITE PROTÉTICA	31
2.2	FUNGO <i>Candida albicans</i>	33
2.3	MECANISMO DE INVASÃO PELO FUNGO <i>Candida albicans</i>	34
2.4	MORTE EPITELIAL: APOPTOSE CELULAR.....	36
2.5	INTERAÇÃO ENTRE EPITÉLIO E <i>Candida albicans</i>	37
2.6	ÓXIDO NÍTRICO (NO)	40
2.7	PEPTÍDEO β -DEFENSINA HUMANA (hBD).....	41
3	PROPOSIÇÃO	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS.....	51
4.1.1	Células epiteliais de mucosa bucal de palato humano.....	51
4.1.1.1	Amostras da mucosa bucal de palato humano.....	51
4.1.1.2	Desinfecção da mucosa bucal de palato humano coletada.....	51
4.1.1.3	Obtenção das células epiteliais pelo método explante	52
4.1.1.4	Obtenção das células epiteliais pelo método enzimático	57
4.1.2	Fibroblastos gengivais humanos para a camada de sustentação (feeder-layer).....	57
4.1.3	Preparação da camada de sustentação	58
4.2	CO-CULTIVO DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA BUCAL DE PALATO HUMANO SOBRE A CAMADA DE FEEDER-LAYER.....	59
4.3	MANIPULAÇÃO DO FUNGO <i>Candida albicans</i> 90028.....	63
4.4	DESAFIO DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA PALATAL HUMANA COM <i>Candida albicans</i>	63

4.4.1	Desafio direto (D.D.)	64
4.4.2	Desafio indireto (D.I.)	64
4.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	64
4.6	AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA INVASÃO DA CÉLULA EPITELIAL PALATAL PÓS-DESAFIO DIRETO COM O FUNGO <i>Candida albicans</i>	65
4.7	ENSAIO DE APOPTOSE CELULAR.....	66
4.8	ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	66
4.9	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO hBD-2 (RT-qPCR).....	67
4.10	ANÁLISE DOS RESULTADOS	68
5	RESULTADOS	71
5.1	VIABILIDADE DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE PALATO HUMANO	73
5.2	INVASÃO DAS CEPH PELO FUNGO <i>Candida albicans</i> APÓS O DESAFIO DIRETO	85
5.3	APOPTOSE DAS CEPH APÓS DESAFIO COM O FUNGO <i>Candida albicans</i>	91
5.4	LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) IN VITRO PELAS CÉLULAS EPITELIAIS DE PALATO HUMANO	97
5.5	EXPRESSÃO GÊNICA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO hBD-2 (RT-qPCR)	101
6	DISCUSSÃO	107
7	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	125
	APÊNDICES	139
	ANEXOS	145

1 INTRODUÇÃO

A estomatite protética é a lesão mais frequente em usuários de próteses dentárias removíveis, sendo uma doença inflamatória que acomete a mucosa bucal palatal e alveolar que se encontra em íntimo contato com o acrílico da superfície interna das próteses, principalmente totais superiores (BERDICEVSKY et al., 1980; FOTOS; HELLSTEIN; VINCENT, 1991; DARWAZEH; AL-REFAI; AL-MOJAIWEL, 2001). A incidência desta doença, em pacientes usuários de próteses totais no Brasil, está entre 19,5% e 50,6% (PIRES et al., 2002; MARCHINI et al., 2006), sendo diagnosticada, principalmente, em indivíduos na faixa etária entre 50 e 60 anos, com prevalência do gênero feminino (PEREIRA, 2007) e maior acometimento da mucosa palatal (CATALÁN et al., 2008). Doença decorrente de uma etiologia multifatorial, a estomatite protética está fortemente relacionada com a presença do fungo *Candida albicans* (*C. albicans*), em especial na superfície interna resinosa das próteses (REICHL, 1990; FARAH; ASHMAN, CHALLACOMB, 2000; OLIVEIRA et al., 2010), bem como com fatores sistêmicos, como doenças endócrinas e depressão da resposta imune (ABIKO et al., 2007; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010), muito comum em indivíduos idosos (PEREIRA, 2007; GASPAROTO et al., 2004; GASPAROTO et al., 2012).

Encontrada nas formas levedura e hifa, *C. albicans* leveduriforme vive em comensalismo com indivíduos saudáveis (REICHL, 1990). A mudança dessa condição comensal para patogênica envolve a transição da forma levedura para hifa. Estrutura filamentosa, a forma hifal cresce por alongamento, com capacidade de penetrar nos tecidos bucais, sendo sugerida como a morfologia responsável pelo início da reação inflamatória na estomatite protética (GOW; BROWN; ODDS, 2002; LU et al., 2006; MALIC et al., 2007). A interação in vitro fungo-epitélio passa por fases como aderência, invasão e dano celular (WEINDL et al., 2007; ZAKIKHANY et al., 2007), com a ativação dos mecanismos apoptóticos celulares por *C. albicans* auxiliando na promoção da patogênese fúngica (VILLAR; ZHAO, 2010; WAGENER et al., 2012).

Apesar dos danos provocados pela penetração das hifas nas células, o epitélio, por sua vez, tenta controlar o crescimento da célula fúngica e a invasão tecidual (WEINDL et al., 2007). Em um primeiro momento, o epitélio bucal funciona

como uma barreira mecânica resistente de forma passiva às infecções microbianas. Além dessa proteção passiva, as células epiteliais respondem ativamente, por meio de um processo inflamatório, secretando citocinas e quimiocinas que interagem com vários tipos celulares para ativação da resposta imune inata e, posteriormente, resposta imune adaptativa (ABIKO et al., 2007; DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010).

Com enfoque na imunidade inata em resposta a presença de microrganismos patogênicos, as células epiteliais produzem, além das citocinas, moléculas antimicrobianas que podem contribuir com o combate do patógeno antes da infecção se instalar (SEO et al., 2002; LU et al., 2006; ABIKO et al., 2007; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010). Os peptídeos antimicrobianos β -defensinas (hBD) destacam-se por serem secretados por queratinócitos da mucosa bucal (DALE; FREDERICKS, 2005; PEYRET-LACOMBE et al., 2007) e apresentarem atividade antifúngica contra *C. albicans* (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007; VYLKOVA et al., 2007), além de participarem da modulação das respostas imunes inata e adaptativa contra vários patógenos bucais (DOSS et al., 2010). O óxido nítrico (NO), sintetizado por diversas células, incluindo queratinócitos, também é produzido em resposta à infecção microbiana (SEO et al., 2002), com um papel importante na defesa do hospedeiro contra *C. albicans* pela destruição celular direta ou formação de ânions (NAKAI; KUBOTA; KOSAKA, 2004). Além disso, recentemente, NO foi descrito como um potente agente microbicida contra infecções bucais (GASPAROTO et al., 2012).

Poucos dados na literatura referem-se ao estudo da participação de células epiteliais nas candidoses bucais, incluindo a estomatite protética. Não são encontrados estudos com células epiteliais de palato humano (CEPH), nem tampouco que avaliem a relação simultânea entre a agressão do epitélio pelo fungo *C. albicans* e as respostas epiteliais de defesa diante desse microrganismo. Avanços no conhecimento da participação das CEPH no combate à *C. albicans* são importantes para um maior esclarecimento dos aspectos biopatológicos destas células, principalmente quando afetadas pela estomatite protética, bem como das respostas de defesa imune inata nesta doença. Assim, o presente estudo avaliou in vitro o efeito do contato direto e dos produtos secretados pelo fungo *C. albicans*, sobre as CEPH ao longo do tempo.

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA

A estomatite protética, também conhecida como estomatite por dentadura, é uma doença inflamatória da mucosa bucal palatal e alveolar, que se encontra em íntimo contato com o acrílico da superfície interna das próteses dentárias removíveis, principalmente totais superiores (BERDICEVSKY et al., 1980; FOTOS; HELLSTEIN; VINCENT, 1991; DARWAZEH; AL-REFAI; AL-MOJAIWEL, 2001). Caracterizada, clinicamente, por lesões hiperêmicas e edemaciadas, variando de moderada a intensa, essa reação inflamatória é classificada como uma forma de candidose eritematosa, com o termo candidose crônica atrófica sendo também utilizado como sinonímia (REICHL, 1990; FARAH; ASHMAN, CHALLACOMB, 2000; BADAUY et al., 2005). Na maioria das vezes, a doença se apresenta de forma assintomática e apenas uma minoria dos pacientes apresentam sintomatologia como dor, coceira ou sensação de ardência, sendo diagnosticada, em um primeiro momento, durante o exame clínico de rotina (BUDTZ-JORGENSEN, 1974; WILSON, 1998; GENDREAU; LOEWY, 2011).

A primeira classificação clínica da doença, proposta por Newton (1962), e ainda hoje utilizada, é subdividida 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; e Tipo III: Inflamação com hiperplasia papilar (mucosa com superfície hiperêmica nodular). Muitos trabalhos citam o Tipo I como a mais comum (PIRES et al., 2002; FIGUEIRAL et al., 2007) e as lesões, se não tratadas, tendem a evoluir para o Tipo II e, em seguida, para o Tipo III (NEWTON, 1962).

Estudos sugerem que até dois terços ou mais dos indivíduos que usam próteses totais removíveis podem sofrer de estomatite protética (REICHART, 2000; RAMAGE et al., 2004; GENDREAU; LOEWY, 2011), com relato da incidência variando de 15% a 71% (ESPINOZA et al., 2003; PELTOLA; VEHKALAHTI; WUOLIJOKI-SAARISTO, 2004; FREITAS et al., 2008). A incidência da estomatite

protética, em pacientes usuários de próteses totais no Brasil, está entre 19,5% e 58,2% (PIRES et al., 2002; MARCHINI et al., 2006; FREITAS et al., 2008), sendo diagnosticada, principalmente, em indivíduos na faixa etária entre 50 e 60 anos, com prevalência do gênero feminino (PEREIRA, 2007) e maior acometimento da mucosa palatal (CATALÁN et al., 2008).

A etiologia da estomatite protética se apresenta de forma complexa, podendo estar relacionada com vários fatores predisponentes. Fatores demográficos incluem aumento da idade dos usuários de prótese total, gênero feminino, tabagismo e doenças concomitantes (diabetes mellitus, deficiência de vitamina A, deficiência de ferro) que comprometam a resposta imunológica do indivíduo (SCHULMAN; RIVERA-HIDALGO; BEACH, 2005). Fatores relacionados ao uso da prótese envolvem próteses mal adaptadas resultando em trauma e irritação da mucosa bucal, aumento da idade da prótese, uso contínuo e falta de higiene adequada da peça protética, bem como presença de infecção microbiana patogênica (WEBB et al., 1998). Assim, doença de causa variável, o consenso atual é de que a estomatite protética é decorrente de uma etiologia multifatorial, em que a higienização deficiente associada ao uso contínuo da prótese total são citados como principais fatores predisponentes (GENDREAU; LOEWY, 2011). Tais fatores contribuem com a formação de um biofilme microbiano na superfície da prótese, sendo fungos do gênero *Candida*, predominantemente *Candida albicans*, frequentemente isolados (DARWAZEH; AL-REFAI; AL-MOJAIWEL, 2001; PIRES et al., 2002; ESPINOZA et al., 2003).

Vários estudos apresentam uma associação clara entre a má higienização da prótese e o aumento do risco da estomatite protética. Usuários de prótese total que mantinham a higienização da peça protética apenas com escovação, similar à escovação da dentição natural, apresentaram risco maior para o desenvolvimento da doença (KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; MARCHINI et al., 2006; CROSS et al., 2004; DIKBAS; KOKSAI; CALIKKOCAOGLU, 2006). O uso noturno da prótese, durante o sono, também esteve associado com higiene inadequada e risco aumentado para o desenvolvimento da doença (PELTOLA; VEHKALAHTI; WUOLIJOKI-SAARISTO, 2004; MARCHINI et al., 2004; CROSS et al., 2004; DIKBAS; KOKSAI; CALIKKOCAOGLU, 2006). Assim, próteses de uso constante mantém condições anaeróbicas e baixo pH entre a base acrílica e a mucosa,

favorecendo o crescimento excessivo de fungos patogênicos oportunistas (GENDREAU; LOEWY, 2011). Em 1970, Davenport já relacionava a concentração de leveduras comumente encontradas na prótese superior à teoria de que a prótese mal higienizada atuaria como reservatório microbiológico facilitador da reinfecção contínua da mucosa bucal por *C. albicans*.

2.2 FUNGO *Candida albicans*

C. albicans é um fungo dimórfico, encontrado nas formas levedura e hifa, constituinte da microbiota normal da pele e mucosas, como a bucal, trato gastrointestinal e vaginal (REICHL, 1990). Presente na mucosa bucal, este fungo, também, é um dos constituintes dos biofilmes dentários, estando associado à cárie radicular e sulcos gengivais infectados (MARTIN et al., 2011), além da sua relação com a estomatite protética (VANDEN ABEELE et al., 2008).

Em condições normais, a forma levedura vive em comensalismo com indivíduos saudáveis (REICHL, 1990), usuários ou não de prótese total (VANDEN ABEELE et al., 2008). A mudança dessa condição comensal para patogênica requer alterações do estado homeostático entre o fungo e o hospedeiro e, consequentemente, transição da forma levedura para hifa. Estrutura filamentosa, a forma hifal cresce por alongamento nas superfícies das próteses e da mucosa, com capacidade de penetrar nos tecidos bucais, sendo a morfologia sugerida como responsável pelo início da reação inflamatória na estomatite protética (GOW; BROWN; ODDS, 2002; LU et al., 2006; MALIC et al., 2007).

Considerada como um fator etiológico importante, possivelmente, o papel de *C. albicans* na estomatite protética ocorre em combinação com outros fatores, especialmente a falta de higiene da prótese e o uso contínuo da mesma (WEBB et al., 1998; KULAK-OZKAN; KAZAZOGLU; ARIKAN, 2002; COULTHWAIT; VERRAN, 2007). Outras espécies bucais de *Candida* como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* também foram evidenciadas nas lesões. Essas espécies, porém, estão presentes em menor prevalência quando comparadas a *C. albicans*, não apresentando, segundo Odds (1997), um papel patológico relevante para a doença. Além da prevalência da forma hifal ser detectada na mucosa de pacientes

com estomatite protética (WEBB et al., 1998; SONG et al., 2009), também há evidências de que *C. albicans* penetra e adere nas fissuras das superfícies de resina das próteses dentárias (WEBB et al., 1998; RAMAGE et al., 2004; GUSMÃO et al., 2011).

2.3 MECANISMO DE INVASÃO PELO FUNGO *Candida albicans*

No interior da cavidade bucal, *C. albicans* reside em biofilmes mistos com bactérias, em que as interações entre estes microrganismos podem influenciar na patogênese, proliferação e sobrevivência dos mesmos (MUKHERJEE et al., 2005). Além dessa interação direta fungo-bactéria, *C. albicans* exposta a condições físicas e químicas instáveis, como alteração de pH, reage alterando sua parede celular, morfologia (BISWAS; VAN DIJCK; DATTA, 2007) e expressão gênica, contribuindo em potencial para interações patogênicas com células epiteliais bucais humanas (MARTIN et al., 2011). Assim, em conjunto com a interação com as bactérias comensais, a interação entre *C. albicans* e o epitélio bucal são os principais eventos para elucidar como o fungo causa infecções bucais.

O contato inicial de *C. albicans* com os tecidos do hospedeiro, independente da fase patogênica ou comensal, requer a aderência do fungo com as células hospedeiras (WÄCHTLER et al., 2011; ZAKIKHANY et al., 2007). Essa adesão é considerada a fase inicial de uma infecção, permitindo a sobrevivência do microrganismo e, eventualmente, a colonização do tecido durante o desenvolvimento da candidose (ZAKIKHANY et al., 2007; ROUABHIA et al., 2011). Assim, o contato físico das leveduras com as células epiteliais é suficiente para desencadear a formação de hifas e a expressão de genes que medeiam essa aderência (WÄCHTLER et al., 2011; ZAKIKHANY et al., 2007). Outras propriedades de superfície, como a hidrofobicidade e a interação das moléculas PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) glucano, manano ou quitina com seus receptores correspondentes nas células hospedeiras, podem contribuir para a adesão da célula fúngica ao epitélio (MARTIN et al., 2011; ROUABHIA et al., 2011).

Posterior à adesão, trabalhos descrevem uma invasão das células hospedeiras por hifas através de dois mecanismos distintos: penetração ativa e

endocitose induzida (ZAKIKHANY et al., 2007; DALLE et al., 2009; ZHU; FILLER, 2010). Malic e colaboradores (2007), em um estudo in vitro com epitélio bucal humano reconstituído (RHOE), demonstraram a forma hifal de *C. albicans* invadindo o epitélio por penetração direta do queratinócito e indireta, passando por entre as células epiteliais.

No processo de penetração ativa, hifas de *C. albicans* podem penetrar as células epiteliais diretamente ou através das junções intercelulares (DALLE et al., 2009; VILLAR et al., 2007). A pressão mecânica exercida pela ponta ativa hifal em crescimento, além das enzimas hidrolíticas secretadas como proteases (proteínase aspartil secretada, SAP), lipases e fosfolipases, são sugeridos como mecanismos responsáveis por esta via de invasão, desempenhando um papel no potencial de virulência fúngica (MARTIN et al., 2011).

A segunda via de invasão, endocitose induzida, é caracterizada por uma invaginação da membrana celular e rearranjos do citoesqueleto da célula hospedeira, resultando em imersão fúngica (ZAKIKHANY et al., 2007; DALLE et al., 2009). Este processo é mediado pela interação de caderinas da célula epitelial com a proteína fúngica GPI-ancorada Als3 (DALLE et al., 2009; MARTIN et al., 2011). Além disso, Dalle e colaboradores (2009) demonstraram que as proteases SAP1-3 e SAP4-6 participam de ambos os processos de penetração ativa, bem como da endocitose induzida.

As fases iniciais da invasão epitelial por *C. albicans* não estão associadas à destruição significativa do epitélio. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, mesmo não viáveis, hifas fúngicas podem passar por endocitose induzida e invadirem as células epiteliais humanas, porém sem provocarem danos ao epitélio (DALLE et al., 2009). No entanto, as fases posteriores da invasão são caracterizadas por lesões celulares significativas e destruição tecidual (ZAKIKHANY et al., 2007).

A interação entre os fatores de virulência de *C. albicans* e os mecanismos de defesa do hospedeiro desempenha um papel central para determinar se a colonização permanece inofensiva ou se resulta na destruição do epitélio. Importantes fatores de virulência expressos por *C. albicans* incluem dimorfismo, fatores de adesão, mudança fenotípica e, principalmente, a secreção de enzimas

hidrolíticas como lipase, fosfolipase e proteinase (WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011).

2.4 MORTE EPITELIAL: APOPTOSE CELULAR

A apoptose e necrose são mecanismos pelos quais as células eucarióticas entram em processo de morte. A necrose é considerada uma reação patológica devido as principais perturbações ocasionadas no ambiente celular, resultantes na tumefação citoplasmática, lise osmótica e extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular. A apoptose, apesar de ser reconhecida como uma via de morte fisiológica celular, também é destacada como uma resposta a condições de estresse, como infecções intracelulares. As enzimas caspases apoptóticas clivam substratos celulares, resultando nas características apoptóticas, incluindo a condensação nuclear e citoplasmática, ruptura da membrana mitocondrial, fragmentação do DNA e manutenção de uma membrana plasmática intacta. Os conteúdos das células apoptóticas são empacotados por membranas em corpos apoptóticos, os quais são removidos por fagocitose na ausência de inflamação. Apoptose é estritamente regulada por programas suicidas genéticos e bioquímicos, importantes para o desenvolvimento e a homeostasia dos tecidos, bem como para a modulação da patogênese de doenças infecciosas (THOMPSON, 1995).

Diversos sinais extra e intracelulares iniciam a apoptose celular (YU et al., 2006). As vias de sinalização extrínsecas iniciam quando ligantes de sinais extracelulares se acoplam a receptores de morte celular localizados na superfície da célula (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001), enquanto que a via intrínseca é ativada a partir de sinais que promovem a ruptura da integridade mitocondrial (SAELENS et al., 2004), com a participação da família Bcl-2 de proteínas (MIHARA et al., 2003). A translocação do citocromo c da membrana mitocondrial para o citosol catalisa a formação do complexo apoptossomo que, por sua vez, conduz à ativação da via intrínseca caspase (LAVRIK; GOLKS; KRAMMER, 2005). Caspase ativada promove a clivagem proteolítica de várias proteínas com funções significativas na propagação da apoptose (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 2001).

A invasão fúngica das camadas superficiais do epitélio bucal é acompanhada pela destruição das células epiteliais nas infecções orofaríngeas (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMB, 2000). Modelos experimentais, utilizando linhagem de células epiteliais bucais humanas, revelaram extensa morte das células hospedeiras após a invasão intracelular pelo fungo pela via de endocitose induzida (PARK et al., 2005; CHIANG et al., 2007). Relatos na literatura apresentam a morte das células epiteliais bucais ocorrendo após 18 h de infecção por *Candida* (PARK et al., 2005; VILLAR; ZHAO, 2010).

Diante do fato de que durante a infecção as interações entre *C. albicans* e células epiteliais bucais resultam na morte da célula hospedeira, Villar e Zhao (2010), utilizando linhagem de células epiteliais derivadas de carcinomas bucais, observaram que este fungo estimula vias de sinalização que promovem a morte celular por apoptose precoce, através da ativação das caspases celulares. Em continuidade, Villar e colaboradores (2012) demonstraram que *C. albicans* provoca uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial e translocação do citocromo c a partir da mitocôndria para o citoplasma das células epiteliais, bem como um aumento significativo da atividade de caspase-9 e de caspase-3, sugerindo a ativação da via de apoptose intrínseca epitelial em resposta a *C. albicans*.

Com enfoque no microrganismo, a parede celular de *C. albicans* é a estrutura fundamental de mediação das interações entre hospedeiro e fungo. A glicosilação das proteínas da parede celular de *C. albicans*, não apenas estimula as respostas inatas epiteliais, mas também participa da regulação da proliferação de células epiteliais e da ativação dos mecanismos apoptóticos. A indução da apoptose por *C. albicans* ocorre na fase inicial da infecção e depende da parede celular intacta do microrganismo, mostrando a importância das unidades de superfície fúngicas nas interações fungo-epitélio e na promoção da patogênese fúngica (WAGENER et al., 2012).

2.5 INTERAÇÃO ENTRE EPITÉLIO E *Candida albicans*

Apesar da morte da célula hospedeira facilitar o escape do organismo fúngico (VILLAR; ZHAO, 2010), uma vez instalada a candidose, alterações do tecido

epitelial e, conseqüentemente, ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro (WEBB et al., 1998; ABIKO et al., 2007) também são esperadas. O epitélio bucal funciona como uma barreira protetora, resistente às agressões físicas, químicas e infecções microbianas, que contribui para a defesa do organismo sob três aspectos: barreira mecânica, imunidade inata e imunidade adaptativa. Como barreira mecânica, a estratificação das células epiteliais resiste passivamente às infecções e faz parte, já no primeiro momento, da imunidade inata. Além dessa proteção passiva, as células epiteliais respondem ativamente, por meio de um processo inflamatório, secretando citocinas e quimiocinas que interagem com vários tipos celulares para ativação da resposta imune inata e, posteriormente, resposta imune adaptativa (ABIKO et al., 2007; DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010). No combate a candidose, a resposta inata conta com a participação de fagócitos, incluindo neutrófilos e macrófagos, enquanto que a resposta adaptativa tem a participação das células Th1, Th17 e células T reguladoras (WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010).

O fungo *C. albicans* interage com as células epiteliais em diversos momentos, incluindo as fases de aderência, invasão e dano celular. Apesar do dano tecidual aumentar de acordo com a penetração das hifas no tecido, a célula epitelial é capaz de controlar o crescimento da célula fúngica e a invasão tecidual (WEINDL et al., 2007). Primeiramente, um estudo in vitro revelou que, durante a fase de colonização do epitélio bucal por leveduras, *C. albicans* provoca supressão da expressão de uma família de receptores de reconhecimento epitelial chamados receptores *Toll-like* (TLR), especialmente TLR4, inibindo a produção de citocinas por essas células (WEINDL et al., 2007). Em contrapartida, durante o período de colonização, o intenso crescimento fúngico pode ser limitado pela liberação de peptídeos antimicrobianos a partir das células epiteliais, ou ainda, devido à existência de bactérias da microbiota (WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011). Na fase de invasão do tecido por hifas, a célula epitelial passa a produzir citocinas responsáveis pelo recrutamento de polimorfonucleares (PMNs) no local da infecção. Em seguida, várias citocinas, especialmente TNF, estão diretamente envolvidas no aumento da expressão do receptor TLR4 pela via mediada por PMNs (WEINDL et al., 2007). Finalmente, esse receptor está diretamente envolvido na proteção da mucosa bucal contra a invasão fúngica, possivelmente, participando da produção de

peptídeos antimicrobianos por parte das células epiteliais (WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010), além do reconhecimento de patógenos invasores, induzindo à resposta imune inata e, conseqüentemente, ativando a resposta imune adaptativa (DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009). Assim, TLRs são considerados mediadores críticos entre as respostas imune inata e adaptativa (WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011).

O reconhecimento de *C. albicans* pelos receptores epiteliais TLR conduz a uma série de sinalizações, resultantes numa resposta aguda do hospedeiro, necessária para a eliminação do organismo patogênico. A atividade do queratinócito para a morte de *C. albicans* envolve os receptores TLR2 e TLR4 seguido da ativação da via NF- κ B (DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; ROUABHIA et al., 2011; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011). Como resposta à infecção pelo fungo, trabalhos apresentam células epiteliais liberando, em quantidades significativas, as citocinas pró-inflamatórias interleucinas (IL-6 e IL-8) e fator de necrose tumoral (TNF- α), sugerindo um desempenho ativo das citocinas no controle das infecções bucais e na manutenção da relação simbiótica entre a comunidade microbiana bucal e o hospedeiro (DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; ROUABHIA et al., 2011; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011). As citocinas estão envolvidas com o aumento da proliferação, ativação e atividade fungicida das células do sistema imunológico, além de regularem o tráfico de leucócitos (WEINDL et al., 2007).

Além da secreção de citocinas e quimiocinas para ativação da resposta inata local, em resposta a presença do fungo e de estímulos inflamatórios, o epitélio bucal produz rapidamente vários peptídeos antimicrobianos (LU et al., 2006; ABIKO et al., 2007; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010). Muitos desses peptídeos são encontrados na saliva humana a qual, no primeiro momento, atua diretamente na regulação da microbiota bucal e proteção contra agentes patogênicos (DALE; FREDERICKS, 2005). Assim, os peptídeos antimicrobianos contribuem com o reconhecimento e combate de microrganismos pelo epitélio antes da infecção se instalar, restringindo, possivelmente, a invasão fúngica às camadas mais superficiais do tecido.

Inúmeros peptídeos antimicrobianos salivares vêm sendo estudados, dentre eles estão a calprotectina (KIDO et al., 1999), adrenomedulina (KAPAS;

TENCHINI; FARTHING, 2001), histatina (DALE; FREDERICKS, 2005), lactoferrina (ASLAN; LEUNG; WU, 2009), defensinas e catelicidinas (DOSS et al., 2010). Dentre esses, as defensinas destacam-se por serem secretadas por queratinócitos de mucosa bucal (DALE; FREDERICKS, 2005; PEYRET-LACOMBE et al., 2007) e apresentarem atividade antifúngica contra *C. albicans* (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007; VYLKOVA et al., 2007), além de participarem da modulação das respostas imunes inata e adaptativa contra vários patógenos bucais (DOSS et al., 2010).

2.6 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO), um radical livre de meia-vida curta (GHOSH et al., 2008), é sintetizado em células de mamíferos com a participação da enzima NO sintase (NOS), que converte o aminoácido arginina e oxigênio em citrulina e NO (SEO et al., 2002). Esta enzima pode ser encontrada sob as formas constitutiva (cNOS) e indutiva (iNOS), sendo cNOS expressa em duas isoformas diferentes, uma presente em endotélio vascular (eNOS) e outra em células nervosas (nNOS) (SEO et al., 2002).

Normalmente, a forma indutiva da enzima não está presente nas células (GHOSH et al., 2008). iNOS são expressos em resposta à infecção microbiana, citocinas inflamatórias e agressões ambientais em diversas células, incluindo os queratinócitos, além dos hepatócitos, macrófagos, neutrófilos e condrócitos (SEO et al., 2002).

Efeitos antitumorais e antibacterianos são atribuídos ao NO, e em parte, mediados pela indução de iNOS. Tais propriedades englobam efeitos tóxicos, danos oxidativos, danos ao DNA e indução de apoptose (SEO et al., 2002). Assim, NO desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro sendo já conhecido contra *Escherichia coli*, *C. albicans* e *Mycobacterium spp* pela destruição celular direta ou formação de ânions (NAKAI; KUBOTA; KOSAKA, 2004). Os efeitos antibacteriano e antitumoral de NO são conhecidos por inibirem a respiração celular, além de outros efeitos sobre o metabolismo, mediados pela formação de complexos com ferro e enxofre, e pela indução de outros intermediários reativos de oxigênio

(ROS) e espécies reativas de óxido nítrico (RNOS) (SEO et al., 2002). A alteração química de DNA por RNOS é um dos principais mecanismos de ação antimicrobiana mediada por NO, envolvendo três mecanismos: reação direta de RNOS com a estrutura de DNA, inibição de reparo do DNA e aumento da geração de agentes alquilantes e peróxido de hidrogênio genotóxicos (SCHAIRER et al., 2012).

Durante o processo de fagocitose por macrófagos, NO e ROS são essenciais para a morte de *C. albicans* (FERRARI et al., 2011). Resultados de Heilman e colaboradores (2013) indicam que a forma hifal invasiva de *C. albicans* exibe mais sensibilidade a NO em comparação a forma de levedura. Os autores acreditam que doses moderadas de NO podem impedir a propagação da forma hifal de *C. albicans* e limitar os danos das infecções (HEILMAN et al., 2013). Gasparoto e colaboradores (2012) descrevem ainda NO como um potente agente microbicida atuando para as defesas bucais, auxiliando no controle da estomatite protética e evitando a disseminação de *C. albicans*.

2.7 PEPTÍDEO β -DEFENSINA HUMANA (hBD)

As defensinas humanas compõem um grupo de peptídeos catiônicos dividido em duas subfamílias, α -defensina humana (HNP) e β -defensina humana (hBD). HNPs são produzidas por neutrófilos e células intestinais de Paneth (YANG et al., 1999), enquanto que hBDs são secretadas, predominantemente, por células epiteliais de mucosas (YANG et al., 1999; HARADA et al., 2004; LU et al., 2006). Seis moléculas distintas de hBDs (hBD-1 a -6) foram identificados (HARADA et al., 2004), com os subgrupos hBD-1, hBD-2 e hBD-3 sendo encontrados em epitélio bucal, glândulas salivares, saliva e fluido crevicular gengival (LU et al., 2006; ABIKO et al., 2007). hBD-1 e hBD-2 são intensamente detectadas nas camadas espinhosa, granular e queratinizada do epitélio (DALE et al., 2001), protegendo a mucosa mediante atividade antifúngica direta, além de participarem no recrutamento de células dendríticas e linfócitos T (YANG et al., 1999); enquanto que hBD-3, encontrada principalmente na camada basal do epitélio (LU et al., 2005), atua principalmente como fator quimiotático para leucócitos PMNs (STEUBESAND et al.,

2009), sendo sugerida como elo de ligação entre epitélio e tecido conjuntivo, e respostas imunes inata e adaptativa (LU et al., 2005; ABIKO et al., 2007).

Além da modulação de respostas imunes do hospedeiro, hBDs apresentam atividade antifúngica direta contra *C. albicans*. Embora o mecanismo de ação não esteja totalmente elucidado, sugere-se que os peptídeos catiônicos hBDs sejam capazes de se ligar, com especificidade, a grupos iônicos localizados externamente à parede fúngica e, sequencialmente, de se inserir a essa parede microbiana, culminando com a formação de microporos. Tais poros facilitam, por sua vez, a perda seletiva de íons e pequenos nucleotídeos, principalmente moléculas de ATP, por parte do patógeno para o meio extracelular. Apesar da morte não imediata do fungo, o efluxo de ATP, somado ao desequilíbrio iônico intracelular, têm efeitos metabólicos sobre a célula interrompendo seu ciclo de vida (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007). Doses letais de hBD-2 e hBD-3 induzem efluxo de ATP em *C. albicans*, porém, sem romper por completo a parede do fungo (VYLKOVA et al., 2007).

Na literatura científica são encontrados trabalhos sobre a produção de hBDs por células epiteliais quando desafiadas com *C. albicans*. Os modelos epiteliais in vitro incluem o epitélio RHOE da linhagem TR146 (LU et al., 2006), epitélio gengival (FENG et al., 2005), vaginal (PIVARCSI et al., 2005) e esofágico (STEUBESAND et al., 2009). Outras pesquisas in vitro, utilizando também o epitélio gengival humano, avaliaram a produção de hBDs por queratinócitos quando desafiados por outros patógenos, como bactérias periodontopatogênicas (HOSOKAWA et al., 2006).

Estudos realizados por Tanida e colaboradores (2003) mostraram que as concentrações salivares de hBD-1 e hBD-2 em pacientes com candidose bucal são menores do que em indivíduos saudáveis. Por outro lado, Sawaki e colaboradores (2002), a partir de uma avaliação imunohistoquímica, observaram maior expressão gênica da defensina hBD-2 em epitélio bucal humano com candidose em comparação ao epitélio bucal normal. Feng e colaboradores (2005), estudando in vitro o efeito antifúngico dos subgrupos hBD-1, hBD-2 e hBD-3 contra cepas de *C. albicans*, demonstraram que o peptídeo recombinante hBD-2 é o mais efetivo para morte das células candidais, seguido do peptídeo recombinante hBD-3, enquanto que hBD-1 apresentou a pior atividade fungicida contra diferentes cepas do

microrganismo. Os relatos desses autores sugerem o subgrupo hBD-2 como a principal defensina envolvida na interface epitélio-ambiente bucal que interfere na interação entre *C. albicans* e hospedeiro.

Lu e colaboradores (2006) avaliaram a expressão das defensinas hBD-1, hBD-2 e hBD-3 pelas células epiteliais RHOE infectadas com *C. albicans*. Os resultados demonstraram aumento da expressão de RNAm e da secreção dos peptídeos, 12 h após a infecção. Em seguida, no tempo de 24 h, as expressões gênicas foram reduzidas e os peptídeos secretados não foram detectados, enquanto que ambos, expressões gênicas e peptídeos secretados, foram restabelecidos após 48 h de infecção. Em um ensaio paralelo, os autores observaram que esse aumento da expressão das defensinas nos primeiros momentos do experimento, ocorreu concomitantemente com a presença de hifas do microrganismo, enquanto que a ausência dos peptídeos secretados ocorreu com a progressão dessas hifas por entre as células epiteliais, ao longo do experimento. Porém, o restabelecimento dos peptídeos observado nos estágios tardios da infecção, permanece a ser esclarecido.

Hosokawa e colaboradores, em 2006, realizaram uma análise imunohistoquímica da expressão do peptídeo antimicrobiano hBD-2 no tecido gengival com doença periodontal e avaliaram, in vitro, a produção desse peptídeo por células epiteliais gengivais humanas em cultura, após desafio com bactérias periodontopatogênicas. O tecido com doença periodontal mostrou expressão de hBD-2 similar ao tecido gengival normal. Quanto ao peptídeo secretado pelas células epiteliais em cultura, algumas bactérias periodontopatogênicas, como *Fusobacterium nucleatum*, aumentaram a secreção de hBD-2; enquanto que a bactéria *Porphyromonas gingivalis* não interferiu na produção desse peptídeo. Os autores observaram, assim, que o peptídeo hBD-2 apresentou padrões de expressão distintos, podendo variar ou não, dependendo do microrganismo em questão.

Como abordado anteriormente, *C. albicans* pode inibir a produção de hBDs pelas células epiteliais por mecanismos não totalmente conhecidos, prejudicando a resposta inata do hospedeiro e facilitando a invasão do epitélio. Esse mecanismo de inibição pode ser dependente da progressão da forma hifal e representar um mecanismo patogênico do fungo (LU et al., 2006; ABIKO et al., 2007). O epitélio, por sua vez, pode ser capaz de impedir essa progressão hifal ao

longo do tempo, recuperando sua capacidade de síntese e secreção por mecanismos ainda desconhecidos (LU et al., 2006; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010). Uma hipótese provável é a participação de um dos principais peptídeos antimicrobianos, hBD-2, no combate contra *C. albicans*. A dinâmica de produção deste peptídeo em resposta ao microrganismo em diferentes tempos e intensidade, pode ser representada com o peptídeo atuando em momentos distintos durante a atividade antifúngica.

Apesar das atividades antimicrobianas do NO e das defensinas estarem consolidadas, não encontramos na literatura estudos in vitro com células epiteliais de palato humano desafiadas com *C. albicans* que avaliem, comparativamente, ao longo do tempo, a produção de NO e do peptídeo hBD-2 por esse epitélio palatal. A adequada compreensão das alterações gênicas e, conseqüentemente, da secreção do peptídeo, provocadas pelo fungo, permanece limitada. E ainda, não há estudos com CEPH que avaliem, simultaneamente, a agressão do epitélio pelo fungo *C. albicans* e as respostas epiteliais de defesa diante desse microrganismo. Não se tem o conhecimento se os processos de agressão e resposta de defesa epitelial são alterados tanto pelo efeito direto quanto indireto do fungo sobre a célula, e nem ao menos, se tais processos ocorrem ao mesmo tempo ou em tempos distintos.

Mesmo diante de inúmeras pesquisas sobre o controle da estomatite protética, essa doença ainda se apresenta como um problema clínico frequente. Faltam avanços quanto aos métodos de tratamento e preservação, bem como quanto ao conhecimento da patogênese da doença, incluindo as respostas das células imunes frente ao fungo *C. albicans*. O conhecimento mais detalhado da participação da célula epitelial palatal e suas moléculas antimicrobianas contra *C. albicans* podem colaborar para um esclarecimento da resposta imune inata do hospedeiro, em especial usuário de prótese total superior. Os peptídeos defensinas, detentores de uma atividade antimicrobiana e participantes efetivos da imunidade inata e adaptativa, podem ter aplicações terapêuticas para reforço dos mecanismos de defesa do hospedeiro (ABIKO et al., 2007; ALEKSEEVA et al., 2009). Além disso, ressaltamos a possibilidade de que aplicações tópicas de agentes terapêuticos possam potencializar a secreção dos peptídeos pelas células epiteliais, ajudando no tratamento contra *C. albicans*, na prevenção da disseminação do fungo e no controle da estomatite protética.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar in vitro o efeito direto e indireto de *C. albicans* sobre as células epiteliais de palato humano (CEPH) ao longo do tempo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar in vitro a viabilidade das CEPH após desafios direto (D.D.) e indireto (D.I.) com leveduras de *C. albicans*, ao longo do tempo, com o uso do KIT colorimétrico LIVE/DEAD *cell viability assay*[®].

Avaliar in vitro a invasão das CEPH após D.D. com leveduras de *C. albicans*, ao longo do tempo, por meio do corante fluorogênico laranja de acridina.

Avaliar in vitro a apoptose das CEPH após desafios D.D. e D.I. com leveduras de *C. albicans*, ao longo do tempo, a partir da marcação nuclear fluorescente com Hoechst 33258.

Avaliar in vitro a liberação de óxido nítrico (NO) por CEPH após desafios D.D. e D.I. com leveduras de *C. albicans*, ao longo do tempo, pela reação colorimétrica de Griess.

Avaliar in vitro a expressão gênica do peptídeo antimicrobiano hBD-2 por CEPH após desafios D.D. e D.I. com leveduras de *C. albicans*, ao longo do tempo, por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS

4.1.1 Células epiteliais de mucosa bucal de palato humano

4.1.1.1 Amostras da mucosa bucal de palato humano

Amostras de mucosa de palato duro foram obtidas de cinco doadores voluntários, integrantes da pesquisa. Os doadores foram atendidos na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), por um doutorando da área, para a intervenção cirúrgica periodontal sob supervisão dos docentes da Disciplina de Periodontia dessa faculdade. Fragmentos (5 mm²) retirados da área da mucosa palatina na região de pré-molares, foram, voluntariamente, doados pelo voluntário após o consentimento livre e esclarecido do indivíduo.

Os doadores apresentaram condições normais de saúde, sendo excluídos aqueles que faziam uso de fumo, álcool ou quaisquer outros tipos de drogas. Esses indivíduos responderam as perguntas de um questionário informativo (APÊNDICE A), assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, proposto pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição (resolução nº 196 de 16.10.96 – CNS, Portaria GD/007-2009/FOB) (APÊNDICE B), bem como, assinaram os instrumentos de doação de tecidos bucais (resolução nº 196/96 – CNS) (APÊNDICE C). O projeto de pesquisa foi previamente submetido e aprovado à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, da FOB/USP (protocolo nº 001/2012), conforme prevê a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO A).

4.1.1.2 Desinfecção da mucosa bucal de palato humano coletada

O fragmento de mucosa de palato duro coletada foi imediatamente armazenada em meio de cultura celular *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM, Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA, cod#12.100-046) isento de soro bovino fetal (SBF) e suplementado com os antibióticos penicilina/estreptomicina (200

UI/mL / 200 µg/mL, Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA), no período máximo de 24 h, à temperatura de 4°C.

A partir deste passo, todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar sob condições assépticas. Primeiramente, o fragmento de mucosa foi submetido a uma lavagem em solução fisiológica por alguns segundos, para a remoção de possíveis resíduos de sangue. Em seguida, uma desinfecção prévia do fragmento foi realizada com solução alcoólica a 70%, durante 15 s, para então proceder o enxágue, repetido por duas vezes, com solução fisiológica. O tecido epitelial passou por separação mecânica do tecido conjuntivo, sendo fragmentado em porções menores com auxílio de pinça clínica e lâmina de bisturi, em meio ao DMEM suplementado com penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL). Parte dos fragmentos de tecido epitelial foram processados pelo método explante e parte pelo método enzimático, para obtenção das células epiteliais e manutenção em cultivo, como proposto por Klingbeil (2006).

4.1.1.3 Obtenção das células epiteliais pelo método explante

Parte dos fragmentos de tecido epitelial desinfectados, e separados para o método explante, foram cortados em fragmentos menores, de aproximadamente 1 mm². Os fragmentos foram posicionados em placas de cultura com a superfície epitelial voltada para a placa. Em seguida, meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SBF (Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA, cod#16.030-074) e penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL), foi gotejado entre os fragmentos. As placas foram incubadas em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C), por 24 h, para possibilitar a adesão desses fragmentos na placa e ao mesmo tempo mantê-los úmidos. Os fragmentos foram cobertos com meio de cultura próprio para queratinócitos, constituído de DMEM e meio de Ham F12 (Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA, cod#21.700-075) na proporção de 2:1, suplementado com 10% de SBF Clone III (Hyclone, Logan, UT, USA, cod#SH30.109-03), penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL), glutamina (4 mM, Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA, cod#21.051-024), adenina (0,18 mM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, cod#A9795), insulina (5 µg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, cod#I1882), hidrocortisona (0,4 µg/mL, Sigma Chemical

Co., St. Louis, MO, USA, cod#H0396), toxina colérica (0,1 nM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, cod#C8052) e triiodotironina (20 pM, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, cod#T5516). Essas culturas foram diariamente observadas ao microscópio de luz invertida. Assim que as células epiteliais, após iniciarem a multiplicação ao redor dos fragmentos, atingiram um diâmetro de 2-5 mm, o hormônio de crescimento epidérmico (EGF, 10 ng/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, cod#236-EG) foi, também, acrescentado ao meio de cultura DMEM/Ham F12. Quando as células iniciaram o processo de diferenciação, aumentando de diâmetro, foram retiradas da garrafa por tripsinização, ou seja, foram submetidas a tratamento enzimático com solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02% (Gibco® Invitrogen, Grand Island, NY, USA, cod#25.300-054), separadas em suspensão e realizada sua propagação em cultura (**FIGURA 1**).

FIGURA 1. Obtenção das células epiteliais de palato humano (CEPH) pelo método explante. A) Halo de células em formação (seta preta) a partir da multiplicação celular ao redor do fragmento epitelial (*). B) Processo de tripsinização com rompimento das junções intercelulares (seta vermelha). Microscopia de campo claro (aumento de 100x).

4.1.1.4 Obtenção das células epiteliais pelo método enzimático

Parte dos fragmentos de tecido epitelial separados para o método enzimático (0,5 mm x 0,5 mm) foram imersos em solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02% sob agitação branda a 37°C. Em intervalos de 30 min, o sobrenadante com as células foi coletado, a tripsina neutralizada com meio DMEM contendo 10% de SBF (Gibco® Invitrogen) e penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL), e a suspensão de células foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 min. As células foram ressuspensas em meio de cultura próprio para queratinócitos DMEM/Ham F12 na proporção de 2:1, suplementado com 10% de SBF Clone III, penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL), glutamina (4 mM), adenina (0,18 mM), insulina (5 µg/mL), hidrocortisona (0,4 µg/mL), toxina colérica (0,1 nM) e triiodotironina (20 pM). As células (6×10^3 cél/cm²) foram semeadas sobre uma camada de sustentação (*feeder-layer*) de fibroblastos gengivais humanos mitoticamente inativos. O conjunto queratinócito/camada de sustentação foi mantido em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) com meio de cultura DMEM/Ham F12 suplementado e com trocas do meio a cada 2-3 dias. O hormônio EGF (10 ng/mL) foi, também, acrescentado ao meio de cultura DMEM/Ham F12 após a primeira troca do meio.

4.1.2 Fibroblastos gengivais humanos para a camada de sustentação (*feeder-layer*)

Fibroblastos gengivais humanos foram obtidos do tecido conjuntivo, separado mecanicamente do fragmento de mucosa doado (vide 4.1.1.2), foram isolados pelo método explante e utilizados como camada de sustentação (*feeder-layer*) para o cultivo dos queratinócitos de mucosa bucal de palato humano in vitro (XIAO et al., 2008).

A camada de sustentação se faz importante para a propagação da cultura de células epiteliais, retardando sua diferenciação, colaborando com a capacidade de duplicação dessas células e, assim, permitindo um maior rendimento da cultura quanto à concentração celular (KANG et al., 2000; KLINGBEIL, 2006). Diante da

habilidade da célula epitelial de se aderir ao fibroblasto, a camada de sustentação também impede o crescimento de outros tipos celulares, prevenindo a cultura de queratinócitos da contaminação por células indesejáveis (KANG et al., 2000).

Estes fibroblastos foram previamente cultivados em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF (Gibco® Invitrogen) e penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL) e incubados em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C). Sempre que a cultura de fibroblastos atingiu sub-confluência, a mesma foi tripsinizada e separada em suspensão. Parte das células permanecia em cultura e, de acordo com a necessidade, parte foi utilizada como camada de sustentação para cultura dos queratinócitos (**FIGURA 2**).

FIGURA 2. Cultura de fibroblastos gengivais humanos. Microscopia de campo claro (A, aumento de 100x; B, aumento de 400x).

4.1.3 Preparação da camada de sustentação

Parte dos fibroblastos tripsinizados, em concentração de $1,5 \times 10^4$ cél/cm², foi mitoticamente inativada por mitomicina C. Os fibroblastos foram tratados com meio DMEM contendo 10% de SBF (Gibco® Invitrogen) e mitomicina C (8 µg/mL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, cod#M0503) por 2 h a 37°C. Em

seguida, as células foram lavadas, ressuspensas em meio de cultura e semeadas em garrafas de cultura celular (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland) (XIAO et al., 2008).

4.2 CO-CULTIVO DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA BUCAL DE PALATO HUMANO SOBRE A CAMADA DE *FEEDER-LAYER*

A partir da cultura primária, as células epiteliais da mucosa bucal de palato humano foram cultivadas sobre a camada de *feeder-layer* (**FIGURA 3**). Ao atingirem sub-confluência, os queratinócitos foram tripsinizados e transferidos para novas garrafas com *feeder-layer* para propagação das mesmas. O conjunto queratinócito/*feeder-layer* foi, primeiramente, tratado com tripsina 0,05% / EDTA 0,02% por 5 min a 37°C, para remoção da camada de sustentação. O sobrenadante contendo a camada de sustentação foi descartado e a cultura de queratinócitos remanescente foi lavada com meio de cultura. Os queratinócitos foram removidos com tratamento de tripsina 0,05% / EDTA 0,02% por mais 15 min a 37°C ou até que a maioria dos queratinócitos estivessem destacados quando observados microscopicamente. A tripsina foi neutralizada com meio de cultura contendo 10% de SBF (Gibco® Invitrogen) e penicilina/estreptomicina (100 UI/mL / 100 µg/mL); o meio com as células foi centrifugado (1500 rpm, 5 min) e as células foram ressuspensas em meio de cultura DMEM/Ham F12 (2:1) suplementado. Os queratinócitos foram novamente semeados (6×10^3 cél/cm²) sobre nova camada de *feeder-layer*. O conjunto queratinócito/*feeder-layer* foi mantido em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) com meio de cultura DMEM/Ham F12 suplementado e com trocas do meio a cada 2-3 dias. O hormônio EGF (10 ng/mL) foi, também, acrescentado ao meio de cultura DMEM/Ham F12 após a primeira troca do meio (KLINGBEIL, 2006).

FIGURA 3. Co-cultivo das células epiteliais (*) de mucosa bucal de palato humano com fibroblastos gengivais humanos (seta) (*feeder-layer*). Microscopia de campo claro. A) Co-cultura de 4 dias (aumento de 40x). B) Co-cultura de 8 dias (aumento de 100x). C) Co-cultura de 15 dias (aumento de 40x). D) Co-cultura de 15 dias (aumento de 100x). E) Co-cultura confluenta de 30 dias (aumento de 40x). F) Co-cultura confluenta de 30 dias (aumento de 100x).

4.3 MANIPULAÇÃO DO FUNGO *Candida albicans* 90028

O fungo *C. albicans* ATCC/ N° de catálogo 90028 foi utilizado para os experimentos de desafio das células epiteliais da mucosa bucal de palato humano. A partir da levedura congelada em suspensão, alíquotas de 10 µL do fungo foram adicionadas em 5 mL de caldo triptona de soja (TSB, Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia, cod#M011) suplementado com 0,5% de cloranfenicol. As células foram incubadas durante 24 h sob agitação suave a 37°C. Após este período, as leveduras foram separadas do meio por centrifugação a 5000 rpm durante 10 min a 25°C e, em seguida, submetidas a três lavagens sucessivas com solução salina tamponada com fosfato (PBS 1x). Concentrações testes de 10^3 , $2,5 \times 10^3$, 4×10^3 , 10^4 e 4×10^4 cél/mL foram ressuspensas, separadamente, em meio de cultura DMEM/Ham F12 (2:1) suplementado sem antibiótico para cada experimento, após contagem em câmara de Neubauer e exclusão das células mortas pelo método azul de Tripán (STEUBESAND et al., 2009). Tais concentrações representaram as seguintes proporções 0,01/1; 0,025/1; 0,04/1; 0,1/1 e 0,4/1 levedura/queratinócito (FUN/EPI), respectivamente, para os experimentos.

Sobrenadantes da cultura de leveduras foram utilizados para avaliar os efeitos dos fatores secretados pelo fungo sobre as células epiteliais. Assim, as células fúngicas, nas diferentes proporções, foram incubadas em meio DMEM/Ham F12 (2:1) por 24 h a 37°C para obtenção da forma hifal. Em seguida, o meio referente a cada proporção foi separado por centrifugação (10000 rpm, 10 min) e utilizado nos experimentos de desafio indireto (STEUBESAND et al., 2009).

4.4 DESAFIO DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE MUCOSA PALATAL HUMANA COM *Candida albicans*

Parte das células epiteliais de mucosa bucal de palato humano em cultura (vide 4.2), após tripsinização e contagem em câmara de Neubauer com exclusão das células mortas pelo método azul de Tripán, foi utilizada para o desafio fúngico. Para isso, os queratinócitos (10^5 cél/mL) foram semeados em placas de cultura celular e incubados em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C) com o meio

DMEM/Ham F12 (2:1) suplementado e com EGF por 24 h, para adesão das células na placa. Após este período, as células foram desafiadas direta (D.D.) ou indiretamente (D.I.) com *C. albicans*. Células epiteliais mantidas em meio DMEM/Ham F12 (2:1) suplementado sem antibiótico foram utilizadas como controle do experimento (células não desafiadas, Meio).

4.4.1 Desafio direto (D.D.)

O meio de cultura epitelial presente nas placas de cultura foi descartado e substituído pela suspensão de *C. albicans*. Leveduras do fungo ressuspendidas no meio DMEM/Ham F12 (2:1) suplementado sem antibiótico foram colocadas em contato direto com as células epiteliais nas proporções de 0,01/1; 0,025/1; 0,04/1; 0,1/1 e 0,4/1 FUN/EPI, em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C), durante os tempos experimentais de 3, 6, 8, 10, 12 e 24 h (FENG et al., 2005; STEUBESAND et al., 2009).

4.4.2 Desafio indireto (D.I.)

Nesta etapa, o meio de cultura epitelial presente nas placas de cultura, também foi descartado e os queratinócitos foram incubados em estufa úmida (5%CO₂/95% ar, 37°C), porém, em contato com o sobrenadante das diferentes concentrações de *C. albicans* (vide 4.3) durante 3, 6, 8, 10, 12 e 24 h (STEUBESAND et al., 2009).

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O efeito do contato direto e indireto das diferentes concentrações de *C. albicans* sobre a viabilidade dos queratinócitos foi avaliado pela utilização do KIT colorimétrico LIVE/DEAD *cell viability assay*[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, cod#L3224), segundo as orientações do fabricante. Os queratinócitos foram

semeados e desafiados com o fungo (vide 4.4) em placas de cultura celular de 6 poços (1 mL/poço). Após os diferentes tempos de desafio, o meio de cultura foi removido e as células epiteliais, não e pós-desafiadas, foram coradas com 1 µL/mL do corante em PBS 1x (200 µL/poço), por 20 min a 37°C, sob proteção da luz. Imediatamente após, tomando-se o cuidado para que não ocorresse perda da fluorescência, o corante foi removido e a análise quantitativa foi realizada com uso do microscópio invertido de fluorescência (Leica DM IRBE, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha). Dez campos aleatórios por poço foram selecionados e capturados em objetiva de 20x, com auxílio da câmera de vídeo digital (Leica DFC310 FX, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha), acoplada ao microscópio invertido e a um computador. O índice quantitativo de viabilidade celular foi estabelecido mediante o número de células vivas expresso em porcentagem sobre o número total de células contadas.

4.6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA INVASÃO DA CÉLULA EPITELIAL PALATAL PÓS-DESAFIO DIRETO COM O FUNGO *Candida albicans*

Nesta etapa, os queratinócitos foram semeados e desafiados diretamente com *C. albicans* (vide 4.4.1) em placas de cultura celular de 24 poços (1 mL/poço), contendo lamínulas de vidro esféricas com diâmetro de 13 mm estéreis, para aderência das células. Após os diferentes tempos de desafio, o sobrenadante com a *C. albicans* foi removido, os queratinócitos foram lavados com PBS 1x e as lamínulas foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 2% (500 µL/poço), por 20 min. Em seguida, as lamínulas foram marcadas com o corante fluorogênico acidotrópico laranja de acridina (Merck®, Darmstadt, Hessen, Alemanha) a 0,05 mg/mL em PBS 1x (200 µL/poço), por 15 min sob proteção da luz. Após a montagem das lamínulas com resina PermOUNT® sobre lâminas de vidro para microscopia, as mesmas foram avaliadas qualitativamente, utilizando-se microscópio de varredura confocal a laser (Leica TCS-SPE, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha) (LIMA, 2011). Registros das imagens foram realizados no aumento de 63x para diferenciação dos queratinócitos com leveduras e/ou hifas em sua superfície e das células com o microrganismo em seu interior. Os experimentos foram realizados, também, na

ausência da célula epitelial para comparação do biofilme fúngico formado com àqueles desenvolvidos na presença das CEPH.

4.7 ENSAIO DE APOPTOSE CELULAR

A apoptose celular foi determinada a partir da marcação nuclear fluorescente com Hoechst 33258 (TANG et al., 2009). As células epiteliais palatais humanas foram desafiadas, direta e indiretamente, em placas de cultura de 24 poços (1 mL/poço) (vide 4.4). Neste ensaio, os desafios foram realizados nas proporções de 0,01/1; 0,025/1 e 0,1/1 FUN/EPI, durante os tempos experimentais de 3, 6 e 10 h. Após cada período de tempo, os meios de desafios foram descartados, as células foram lavadas com PBS 1x e coradas com Hoechst 33258 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, cod#H21491), 10 µg/mL em PBS (200 µL/poço), por 20 min a 37°C. Imediatamente após, tomando-se o cuidado para que não ocorresse perda da fluorescência, o corante foi removido e a análise quantitativa foi realizada com o uso do microscópio invertido de fluorescência (Leica DM IRBE). Células apoptóticas com a cromatina nuclear condensada e fragmentada (corpos apoptóticos) foram diferenciadas das células com padrão nuclear normal e, em seguida, foram contadas (WAGENER et al., 2012). Para isso, dez campos aleatórios por poço foram selecionados e capturados em objetiva de 40x, com auxílio da câmera de vídeo digital (Leica DFC310 FX), acoplada ao microscópio invertido e a um computador. O índice quantitativo de apoptose foi estabelecido mediante o número de células apoptóticas expresso em porcentagem sobre o número total de células contadas.

4.8 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A liberação de NO foi quantificada pela produção de nitrito (NO₂) na reação colorimétrica de Griess, em duplicatas. Neste ensaio, os desafios foram realizados nas proporções de 0,01/1; 0,025/1 e 0,1/1 FUN/EPI, durante os tempos experimentais de 3, 6 e 10 h. Assim, os sobrenadantes previamente coletados dos D.D. e D.I. foram descongelados e, para cada volume de 100 µL, foram adicionados

100 µL de reagente de Griess (Sigma Aldrich), os quais foram incubados a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, foi determinada a absorbância (540nm) em espectrofotômetro. Os resultados expressos em nmoles foram determinados pela comparação com a curva padrão (realizada com nitrito de sódio nas seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 e 1.5 µM).

4.9 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO hBD-2 (RT-qPCR)

A avaliação da expressão gênica do peptídeo hBD-2 humano pelas células epiteliais, não e pós-desafiadas com *C. albicans* por ambos os métodos D.D. e D.I., foi realizada de acordo com o método da reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (RT-qPCR). Para este experimento, a concentração de 10⁴ cél/poço foi semeada em placas de cultura de 96 poços. Os desafios foram realizados em duplicatas, nas proporções de 0,01/1; 0,025/1 e 0,1/1 FUN/EPI (200 µL/poço), durante os tempos experimentais de 1, 3, 6 e 10 h.

A extração de RNA total das células epiteliais e a confecção do DNA complementar (cDNA) foram obtidos, diretamente, por meio do Kit *Cells-to-CT™ Kit* (Ambion Inc., Life Technologies, Austin, TX, cod#AM1729), de acordo com as instruções do fabricante. Imediatamente, após cada período experimental, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e incubadas a temperatura ambiente, durante 5 min com 0,5 µL de DNase adicionado a 49,5 µL de solução de lise, para o rompimento das membranas celulares e exposição do material genético. Após esta incubação, 5 µL de solução de parada foram adicionados e a reação incubada, novamente, por 2 min a temperatura ambiente. Em seguida, a transcrição reversa (RT) foi realizada adicionando-se 25 µL do tampão, misturado com 2,5 µL da enzima transcriptase reversa, ao lisado de células. A reação de síntese do cDNA ocorreu em termociclador (Progene, FPROGO5D, Techne, Cambridge, Inglaterra) durante um período de 1 h de incubação a 37°C e foi paralisada pelo aquecimento a 95°C por 5 min.

A reação de qPCR avaliou o acúmulo do produto DNA dupla fita na fase logarítmica da reação de amplificação. O sistema de detecção utilizou o *TaqMan*

Gene Expression PCR master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, Cheshire, U.K., cod#4369016) e primers e sondas pré-desenhados para hBD-2 (Hs00175474_m1), adicionados às amostras transcritas. O fluorocromo, intercalado à dupla fita de DNA, emitiu fluorescência sob excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador. A detecção da fluorescência, no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR, permitiu a monitoração da quantidade crescente de DNA amplificado (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento do modelo ViiA 7 (Applied Biosystems, Life Technologies, Warrington, Cheshire, U.K.), usando o método do limiar do ciclo comparativo (Ct) ($\Delta\Delta C_t$). O gene humano β -globulina foi adotado como o gene de referência para todas as reações, pois foi o mais estável nos testes em comparação com β -actina (dados não mostrados). Todas as reações foram realizadas compreendendo 40 ciclos, com etapa de desnaturação a 95°C, anelamento e extensão a 60°C, utilizando-se os primers a uma concentração final de 0,4 μ M e sonda 0,2 μ M em um volume final de 5 μ L por reação, em placas de 384 poços. Para cada alvo foi realizada qPCR em água estéril (*blank*) para avaliação de sua possível contaminação. A quantificação relativa do gene-alvo hBD-2 foi determinada pela subtração do Ct (ciclo em que foi detectada a fluorescência do fluoróforo FAM) da hBD-2 pela Ct da β -globulina, e em seguida mais uma subtração do Ct da amostra de referência (amostra do grupo controle). Este cálculo pode ser representado pela fórmula: quantificação relativa = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Todas as amostras, para os dois alvos, foram amplificadas em duplicata.

4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados quantitativos para os testes de viabilidade celular, apoptose celular, liberação de NO e RT-qPCR, e qualitativo para o teste de invasão das células epiteliais foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Todos os resultados quantitativos foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD) e foram submetidos à análise de variância ANOVA Fatorial, seguida da análise comparativa pelo Teste de Contraste, de acordo com as análises de variância (Teste de Levene) e normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) dos dados. O teste foi

aplicado para verificação da existência de diferença entre os tempos, para uma mesma concentração de *C. albicans*, e entre as diferentes proporções do fungo durante o mesmo período de tempo, em ambos os desafios D.D. e D.I. A diferença entre D.D. e D.I. foi ainda verificada segundo o teste Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE DAS CÉLULAS EPITELIAIS DE PALATO HUMANO

Com relação ao ensaio de viabilidade das células epiteliais de palato humano (CEPH), após desafios in vitro direto (D.D.) e indireto (D.I.) com diferentes proporções de *C. albicans*/queratinócito (FUN/EPI), foi possível estabelecer um índice quantitativo de viabilidade celular ao longo de 24 h (vide 4.5). Células viáveis absorveram calceína e foram analisadas pela emissão de luz verde fluorescente, enquanto que as células mortas absorveram brometo de etídio, que se liga ao DNA da célula, sendo identificadas pelo sinal fluorescente vermelho (**FIGURA 4**).

O fungo na forma filamentosa foi detectado a partir da proporção de 0,025/1 FUN/EPI, no tempo de 8 h (**FIGURA 4D**), aumentando com a proporção de desafio FUN/EPI. Considerando a proporção de 0,1/1 FUN/EPI, notou-se o fungo filamentoso já a partir de 6 h (imagem não mostrada). Áreas totalmente cobertas pela forma filamentosa foram observadas em 0,4/1 FUN/EPI a partir de 10 h (**FIGURAS 4E e 4F**).

FIGURA 4. CEPH, ora coradas em verde (células vivas), ora coradas em vermelho (células mortas), após D.D. com leveduras de *C. albicans* (fungo na forma filamentosa, seta amarela). A: epitélio não desafiado (Meio); B a F: D.D. com as diferentes proporções FUN/EPI, após diferentes períodos. Microscopia de fluorescência (A, B, C, D e F, aumento de 200x; E, aumento de 50x).

O teste de viabilidade celular apresentou a manutenção da viabilidade das CEPH, ao longo de 12 h, quando desafiadas, diretamente, com leveduras de *C. albicans* nas proporções de 0,01/1 até 0,04/1 (FUN/EPI). O fungo, em maiores proporções (0,1/1 e 0,4/1 FUN/EPI), provocou morte celular significativa a partir de 10 h em relação aos tempos iniciais de 3 e 6 h, com percentual de viabilidade celular abaixo de 50% (**TABELA 1 e FIGURA 5**).

O aumento da concentração do fungo provocou morte significativa das CEPH quando comparadas com o epitélio não desafiado (Meio), a partir de 8 h. Com 24 h, *C. albicans*, em todas as proporções de desafio avaliadas, resultou em morte epitelial significativa em comparação com o meio de cultura (**FIGURA 6**).

TABELA 1. Percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 24 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).

Viabilidade celular (%) x D.D.						
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,04/1	0,1/1	0,4/1
3	98,42 $\pm$ 1,74	97,05 $\pm$ 2,2	97,33 $\pm$ 1,92	96,75 $\pm$ 2,9	96,12 $\pm$ 2,02	93,28 $\pm$ 4,18
6	98,06 $\pm$ 2,07	96,67 $\pm$ 1,84	94,84 $\pm$ 3,0	94,92 $\pm$ 4,96	96,18 $\pm$ 3,15	94,58 $\pm$ 4,15
8	100 $\pm$ 0	89,67 $\pm$ 1,46	92,01 $\pm$ 2,73	91,63 $\pm$ 2,66	72,94 $\pm$ 18,1	42,2 $\pm$ 43,72
10	97,98 $\pm$ 0,85	92,12 $\pm$ 5,16	72,94 $\pm$ 25,88	94,51 $\pm$ 3,01	49,44 $\pm$ 49,66	45,25 $\pm$ 45,65
12	98,62 $\pm$ 1,35	79,54 $\pm$ 26,11	68,23 $\pm$ 27,31	65,25 $\pm$ 49,39	67,19 $\pm$ 29,2	41,87 $\pm$ 48,49
24	100 $\pm$ 0	60,49 $\pm$ 33,18	41,65 $\pm$ 32,15	36,94 $\pm$ 45,51	23,93 $\pm$ 20,74	0

FIGURA 5. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.D. com *C. albicans* (FUN/EPI). (α) $p < 0,03$ quando comparado com 3, 6 e 8 h. (β) $p < 0,05$ quando comparado com 10 h. (γ) $p < 0,03$ quando comparado com 12 h. (ϕ) $p < 0,016$ quando comparado com 3 e 6 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 6. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.D., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,05$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

Como no D.D., a viabilidade das CEPH no D.I. foi mantida ao longo de 12 h, porém, para todas as proporções de leveduras utilizadas (**TABELA 2 e FIGURA 7**). Apenas após 24 h de D.I., as CEPH apresentaram morte significativa em relação aos tempos anteriores (**FIGURA 7**). O D.I. não alterou, significativamente, a viabilidade das CEPH a qual manteve-se aquela verificada no epitélio não desafiado até 12 h. Apenas as proporções maiores (0,1/1 e 0,4/1) de D.I. resultaram em morte significativa dessas células, após 24 h, comparando-se com células não desafiadas (**FIGURA 8**).

TABELA 2. Percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 24 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).

Viabilidade celular (%) x D.I.						
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,04/1	0,1/1	0,4/1
3	98,9 $\pm$ 0,31	96,77 $\pm$ 2,24	97,45 $\pm$ 1,5	97,1 $\pm$ 0,88	97,72 $\pm$ 2,72	96,37 $\pm$ 1,82
6	100 $\pm$ 0	96,66 $\pm$ 0,66	97,68 $\pm$ 2,52	97,26 $\pm$ 2,39	98,13 $\pm$ 2,33	96,47 $\pm$ 1,82
8	95,9 $\pm$ 3,16	96,51 $\pm$ 1,92	96,92 $\pm$ 0,58	95,73 $\pm$ 4,66	96,95 $\pm$ 1,08	96,1 $\pm$ 2,09
10	96,18 $\pm$ 2,21	97,35 $\pm$ 1,71	97,26 $\pm$ 1,54	96,41 $\pm$ 4,61	93,97 $\pm$ 2,21	94,5 $\pm$ 2,06
12	96,98 $\pm$ 0,35	96,51 $\pm$ 1,28	95,98 $\pm$ 0,72	96,08 $\pm$ 0,31	94,07 $\pm$ 2,27	95,59 $\pm$ 2,77
24	96,49 $\pm$ 0,36	97,75 $\pm$ 1,32	92,11 $\pm$ 9,95	95,19 $\pm$ 3,69	91,16 $\pm$ 1,7	89,55 $\pm$ 3,31

FIGURA 7. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I. com *C. albicans* (FUN/EPI). (α) $p < 0,03$ quando comparado com 3, 6 e 8 h. (β) $p < 0,03$ quando comparado com 10 h. (γ) $p < 0,01$ quando comparado com 3, 6, 8, 10 e 12 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 8. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, do percentual das CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,02$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

Em suma, ambas as formas de desafio fúngico (D.D. e D.I.) resultaram em morte das CEPH, principalmente, nos períodos mais tardios e nas maiores proporções FUN/EPI. Em contrapartida, comparando-se D.D. com D.I., o percentual de células viáveis foi significativamente mais baixo após D.D. em todas as proporções de desafio, no período de 24 h. Especificamente, na proporção de 0,4/1, o desafio das células epiteliais pelo D.D. resultou em viabilidade celular menor quando comparada aos resultados do D.I., já a partir de 8 h (**FIGURA 9**).

FIGURA 9. Comparação das CEPH viáveis após D.D. e D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI) durante um período de 24 h. (*) $p < 0,05$ quando comparado com D.I. durante o mesmo período experimental. Três experimentos independentes; Teste Mann-Whitney.

5.2 INVASÃO DAS CEPH PELO FUNGO *Candida albicans* APÓS O DESAFIO DIRETO

Por meio de avaliação qualitativa da invasão celular (vide 4.6), notou-se que o processo de invasão das CEPH por *C. albicans* passou por três diferentes momentos. Inicialmente, no tempo de 3 h, observaram-se inúmeros fungos filamentosos na região periférica das colônias de células epiteliais. O número de filamentos foi maior, proporcionalmente, ao aumento da concentração de FUN/EPI. Alguns campos demonstraram a presença de filamentos posicionados por cima das células epiteliais, porém, não denotando invasão epitelial (**FIGURAS 10A e 10B**).

O início da invasão intraepitelial (penetração epitelial ativa) pelo fungo foi observado, na maioria dos campos, após 6 h de desafio, a partir da proporção de 0,025/1. A penetração epitelial foi intensificada com o aumento da concentração de *C. albicans*; e, para cada proporção avaliada, separadamente, houve amplificação desta invasão ao longo do tempo (**FIGURAS 10C, 10D, 10E e 10F**). Assim, uma vez estabelecido o contato inicial fungo-epitélio, a penetração epitelial ativa aumentou, paralelamente, com o aumento das formas filamentosas prolíficas (6-12 h).

Danos celulares epiteliais significativos foram observados a partir de 10 h de incubação direta, caracterizados pela presença de filamentos fúngicos intracelulares e desestruturação epitelial, a qual se agravou após desafio com as maiores proporções fúngicas (0,1/1 e 0,4/1 FUN/EPI) e com o avanço do tempo experimental (**FIGURAS 10G e 10H**).

Vale ressaltar que, diante da menor proporção (0,01/1 FUN/EPI), não foi observada invasão intraepitelial, independentemente do tempo de desafio.

Na ausência da célula epitelial, o biofilme fúngico formado mostrou-se, qualitativamente, mais intenso, quando comparado aos biofilmes desenvolvidos na presença das CEPH, independente da proporção ou tempo testados (**FIGURAS 10I e 10J**).

FIGURA 10. Estágios da invasão das CEPH (*) por *C. albicans* (seta), diretamente desafiadas nas suas diferentes proporções FUN/EPI. Forma filamentosa aderida à superfície das células epiteliais (A e B). Início da invasão intraepitelial pelo fungo (C). Invasão intraepitelial intensificada com o aumento da proporção de *C. albicans* e com o passar do tempo experimental (D, E e F). Desestruturação das CEPH (G e H). Biofilme fúngico na ausência da célula epitelial (I e J). Coloração com laranja de acridina (Microscopia de varredura confocal a laser em cortes transversais, aumento de 630x).

Mediante os testes de viabilidade e de invasão das CEPH pelo fungo *C. albicans*, as proporções de 0,01/1; 0,025/1 e 0,1/1 FUN/EPI e os tempos experimentais de 3, 6 e 10 h foram selecionados para a análise da apoptose, da liberação de óxido nítrico (NO) e da expressão de hBD-2 pelas CEPH.

5.3 APOPTOSE DAS CEPH APÓS DESAFIO COM O FUNGO *Candida albicans*

Após D.D. e D.I. com as diferentes proporções de *C. albicans* (vide 4.7), foi possível diferenciar, morfologicamente, as células apoptóticas (corpos apoptóticos) das células com padrão nuclear normal (**FIGURA 11**).

FIGURA 11. Núcleos das CEPH em apoptose (setas) após D.D. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI). Microscopia de fluorescência (aumento de 400x).

As células epiteliais não desafiadas (Meio) demonstraram um percentual baixo de apoptose, entre 0,2% e 0,3%, independente do período analisado. Ao longo de 10 h de D.D., a apoptose das CEPH manteve-se baixa, com percentual inferior a 2%, independente da proporção FUN/EPI (**TABELA 3**). Apesar das baixas porcentagens de apoptose celular, o D.D. com 0,025/1, após 6 h, resultou em valores percentuais significativamente maiores em comparação aos tempos de 3 e 10 h. Este resultado foi coincidente com o momento de início da penetração ativa das CEPH pelo fungo. Embora sem diferença estatisticamente significativa, a proporção de 0,1/1 também resultou em maiores valores de apoptose das CEPH no período de 6 h, em relação aos outros tempos de desafio (**FIGURA 12**).

Com o aumento da concentração do fungo, mais precocemente se iniciou o processo de apoptose das CEPH. Assim, observou-se apoptose significativa das CEPH, em relação ao Meio, a partir de 3 h para 0,1/1 FUN/EPI e, no tempo de 10 h, para todas as proporções testadas. Vale ressaltar que a maior proporção de D.D. induziu apoptose significativa das células epiteliais em todos os tempos de desafio in vitro, em comparação às células não desafiadas (Meio). Desta forma, uma vez iniciada, a apoptose se manteve ao longo do tempo, para cada proporção avaliada individualmente. E, analisando cada período individualmente, a apoptose das CEPH não diferiu comparando-se as diferentes proporções fúngicas de D.D. (**FIGURA 13**).

TABELA 3. Percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).

Apoptose celular (%) x D.D.				
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,1/1
3	0,268 $\pm$ 0,028	0,731 $\pm$ 0,43	0,749 $\pm$ 0,391	1,138 $\pm$ 0,352
6	0,333 $\pm$ 0	1,018 $\pm$ 0,198	1,645 $\pm$ 0,412	1,477 $\pm$ 0,743
10	0,211 $\pm$ 0,216	1,165 $\pm$ 0,396	0,886 $\pm$ 0,34	1,266 $\pm$ 0,521

FIGURA 12. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com *C. albicans* (FUN/EPI). (*) $p < 0,04$ quando comparado com 3 e 10 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 13. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o meio, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,02$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

Contrariamente ao D.D., que resultou em um pico de apoptose após 6 h de desafio em comparação aos outros períodos, o D.I. resultou em percentual de apoptose das CEPH similar ao longo do tempo, para cada proporção fúngica analisada separadamente (**TABELA 4 e FIGURA 14**).

Em contrapartida, mediante a análise da apoptose após D.I. em comparação ao Meio, a proporção maior de desafio resultou em aumento significativo do percentual de células apoptóticas quando comparado com as respectivas células epiteliais não desafiadas (Meio), para todos os tempos. Semelhante ao D.D., ao desafiar indiretamente as CEPH com 0,025/1 FUN/EPI, o percentual de apoptose celular foi maior em comparação às células não desafiadas após 6 e 10 h (**FIGURA 15**). Analisando cada período individualmente, a apoptose das CEPH não diferiu comparando-se as diferentes proporções fúngicas.

Não houve diferença significativa entre D.D. e D.I para os ensaios de apoptose celular, quando se avaliou cada proporção individualmente, no mesmo período (dados não mostrados).

TABELA 4. Percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).

Apoptose celular (%) x D.I.				
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,1/1
3	0,152 $\pm$ 0,263	0,952 $\pm$ 0,098	0,769 $\pm$ 0,476	1,956 $\pm$ 0,758
6	0,351 $\pm$ 0,06	1,021 $\pm$ 0,168	1,551 $\pm$ 0,651	1,517 $\pm$ 0,522
10	0 $\pm$ 0	0,793 $\pm$ 0,764	1,401 $\pm$ 0,887	1,603 $\pm$ 0,593

FIGURA 14. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com *C. albicans* (FUN/EPI). Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 15. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o meio, do percentual de apoptose das CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,02$ quando comparado com o Meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

5.4 LIBERAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) IN VITRO PELAS CÉLULAS EPITELIAIS DE PALATO HUMANO

A liberação de NO pelas CEPH, desafiadas diretamente pelo fungo *Candida*, foi similar às concentrações basais (Meio), ao longo do tempo, ou seja entre 56 e 49 μM , exceto após desafio com 0,025/1 FUN/EPI, por 10 h. Neste caso, houve redução significativa da liberação do substrato, em relação aos demais tempos, bem como em relação ao Meio após 10 h (**TABELA 5 e FIGURA 16**).

Mas destaca-se, ainda, que a proporção de 0,025/1 levou a um discreto aumento dos valores da concentração de NO no tempo de 6 h, mesmo não diferindo estatisticamente das demais proporções de desafio ou do Meio (**FIGURA 17**).

TABELA 5. Liberação de óxido nítrico (NO) in vitro pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).

NO (μM) x D.D.				
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,1/1
3	56,87 $\pm$ 5,19	56,11 $\pm$ 1,77	60,3 $\pm$ 1,68	55 $\pm$ 6,14
6	54,79 $\pm$ 4,65	51,73 $\pm$ 9,9	59,69 $\pm$ 11,77	54,58 $\pm$ 3,83
10	55,55 $\pm$ 4,68	51,06 $\pm$ 4,71	48,81 $\pm$ 2,94	49,03 $\pm$ 4,11

FIGURA 16. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com *C. albicans* (FUN/EPI). (α) $p < 0,009$ quando comparado com 3 e 6 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 17. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D., para o mesmo período de tempo. (*) $p < 0,05$ quando comparado com as diferentes proporções de *C. albicans* e com o meio. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

Apesar de uma discreta redução nos valores da concentração de NO ao longo do tempo, a liberação de NO após D.I. com o fungo *C. albicans*, independente da sua proporção, manteve-se similar do período de 3 a 10 h (**TABELA 6 e FIGURA 18**). Avaliando cada tempo individualmente, o aumento da concentração do fungo não alterou o perfil da liberação de NO pelas CEPH, a qual foi similar à liberação por células não desafiadas (Meio) (**FIGURA 19**).

Ao se comparar D.D. com D.I., a liberação de NO foi semelhante, considerando o mesmo período e proporção fúngica individualmente (dados não mostrados).

TABELA 6. Liberação de óxido nítrico (NO) in vitro pelas CEPH, não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes).

Tempo (h)	NO (μ M) x D.I.			
	Meio	0,01/1	0,025/1	0,1/1
3	57,74 $\pm$ 6,85	58,34 $\pm$ 7,71	55,32 $\pm$ 5,4	62,1 $\pm$ 9,83
6	52,09 $\pm$ 0,44	58,18 $\pm$ 10,48	53,89 $\pm$ 0,51	56,08 $\pm$ 7,43
10	58,64 $\pm$ 7,31	51,29 $\pm$ 6,21	53,48 $\pm$ 6,27	52,94 $\pm$ 4,37

FIGURA 18. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com *C. albicans* (FUN/EPI). Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 19. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da liberação de óxido nítrico (NO) pelas CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I., para o mesmo período de tempo. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

5.5 EXPRESSÃO GÊNICA DO PEPTÍDEO ANTIMICROBIANO hBD-2 (RT-qPCR)

A expressão de RNAm de hBD-2 pelas CEPH frente a *C. albicans* também foi avaliada no tempo de 1 h, além dos demais tempos experimentais selecionados, já que seria possível que estas células realizassem um pico de expressão gênica em um breve período de desafio fúngico.

Considerando a expressão basal de hBD-2 pelo epitélio (Meio), bem como quando estimulado pelo controle LPS, a expressão máxima da molécula ocorreu no tempo de 6 h, diferindo estatisticamente dos demais tempos. Similarmente às células não desafiadas, o D.D. por 6 h, com as diferentes proporções de leveduras, resultou no aumento significativo da expressão de hBD-2, em comparação com os períodos anteriores e com 10 h (**TABELA 7 e FIGURA 20**).

No pico de expressão em 6 h, o D.D. com 0,01/1 e com 0,025/1 FUN/EPI resultou no aumento significativo de hBD-2 em relação ao basal. Este aumento após o desafio com 0,025/1 concordou com os resultados referentes ao início da penetração ativa das CEPH pelo fungo e ao discreto aumento de NO epitelial. Além disso, esta expressão elevada de hBD-2 após 6 h de D.D. foi superior significativamente ao estímulo com LPS (**FIGURA 21**).

TABELA 7. Regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes). Os valores de RNAm foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência).

hBD-2 mRNA, quantificação relativa x D.D.					
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,1/1	LPS
1	1,149 $\pm$ 0,057	1,233 $\pm$ 0,241	1,039 $\pm$ 0,056	1,076 $\pm$ 0,077	1,005 $\pm$ 0,078
3	0,910 $\pm$ 0,111	0,878 $\pm$ 0,122	0,830 $\pm$ 0,052	0,890 $\pm$ 0,043	0,806 $\pm$ 0,064
6	2,143 $\pm$ 0,229	3,966 $\pm$ 0,158	3,769 $\pm$ 0,692	2,991 $\pm$ 0,306	1,264 $\pm$ 0,154
10	0,924 $\pm$ 0,021	0,836 $\pm$ 0,143	0,825 $\pm$ 0,132	1,053 $\pm$ 0,089	0,995 $\pm$ 0,082

FIGURA 20. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. com *C. albicans* (FUN/EPI). Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (α) $p < 0,024$ quando comparado com 1, 3 e 10 hs. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 21. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.D. para o mesmo período de tempo. Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (*) $p < 0,007$ quando comparado com o meio. (#) $p < 0,047$ quando comparado com o LPS. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

Após D.I. com diferentes proporções do fungo, notou-se expressão gênica mais elevada de hBD-2, em relação ao tempo inicial de 1 h, após desafio com 0,025/1 por 6 h, bem como com 0,01/1 por 3 h (**TABELA 8 e FIGURA 22**).

Contrariamente ao D.D., o D.I. sobre as CEPH induziu uma menor expressão da molécula em relação ao basal, considerando todas as proporções testadas nos tempos de 1 e 6 h. Com enfoque no tempo de 1 h, a expressão gênica de hBD-2 foi inferior àquela provocada pelo LPS. Nos tempos de 3 e 10 h, os desafios com *C. albicans* resultaram em expressão próxima à produção basal de hBD-2 (**FIGURA 23**).

TABELA 8. Regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH viáveis não desafiadas (Meio) ou após D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h (Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes). Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência).

hBD-2 mRNA, quantificação relativa x D.I.					
Tempo (h)	Meio	0,01/1	0,025/1	0,1/1	LPS
1	1,149 $\pm$ 0,057	0,763 $\pm$ 0,104	0,749 $\pm$ 0,065	0,756 $\pm$ 0,034	1,005 $\pm$ 0,078
3	0,910 $\pm$ 0,111	1,033 $\pm$ 0,2	0,837 $\pm$ 0,089	0,904 $\pm$ 0,168	0,806 $\pm$ 0,064
6	2,143 $\pm$ 0,229	0,870 $\pm$ 0,075	1,020 $\pm$ 0,191	0,970 $\pm$ 0,249	1,264 $\pm$ 0,154
10	0,924 $\pm$ 0,021	0,854 $\pm$ 0,008	0,927 $\pm$ 0,132	0,904 $\pm$ 0,044	0,995 $\pm$ 0,082

FIGURA 22. Análise comparativa, entre os diferentes tempos, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. com *C. albicans* (FUN/EPI). Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (α) $p < 0,017$ quando comparado com 1, 3 e 10 h. (β) $p < 0,001$ quando comparado com 1 h. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

FIGURA 23. Análise comparativa, entre as diferentes proporções de *C. albicans* (FUN/EPI) e entre estas e o Meio, da regulação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH não desafiadas (Meio) ou após D.I. para o mesmo período de tempo. Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (*) $p < 0,0007$ quando comparado com o meio. (#) $p < 0,013$ quando comparado com o LPS. Três experimentos independentes; ANOVA Fatorial, Teste de Contraste.

Na comparação entre os desafios com *C. albicans* sobre as CEPH, o D.D. induziu maior expressão de hBD-2 no tempo de 6 h que o D.I., independentemente da proporção fúngica testada. Após 1 h, a expressão após D.D. foi maior em relação ao D.I., nas proporções 0,025/1 e 0,1/1 (**FIGURA 24**).

FIGURA 24. Comparação da expressão de mRNA de β -defensina (hBD-2) em CEPH após D.D. e D.I. com diferentes proporções de leveduras de *C. albicans* (FUN/EPI), durante um período de 10 h. Os valores de mRNA foram avaliados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan de expressão gênica e foram normalizados por β -globulina (gene de referência). (*) $p < 0,004$ quando comparado com D.I. durante o mesmo período experimental. Três experimentos independentes; Teste Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram demonstradas a capacidade de sobrevivência e respostas imunes de CEPH diante dos desafios *in vitro* direto e indireto com leveduras de *C. albicans* viáveis, sob intervalos de tempo. As CEPH infectadas revelaram significativa expressão gênica do peptídeo hBD-2, um importante mecanismo de defesa antimicrobiano, e discreto aumento de liberação de NO. Por outro lado, sob maiores proporções FUN/EPI, bem como sob o contato prolongado do fungo ou de seus produtos secretados, as CEPH apresentaram queda da viabilidade celular, com permissão da transição do fungo para sua forma patogênica (filamentosa), bem como da sua proliferação e de penetração intraepitelial. Além disso, as CEPH apresentaram apoptose e redução da liberação de NO, quando desafiadas nestas proporções.

De acordo com a literatura abordada, este é o primeiro relato acerca da influência do fungo *C. albicans* sobre estas respostas biológicas em células epiteliais, especificamente, palatais humanas. A partir deste modelo experimental, foi possível avaliar o contato direto fungo-epitélio (D.D.) e a interação entre fatores secretados fúngicos e os queratinócitos (D.I.), em diferentes tempos de desafio. Como esperado, as alterações observadas ocorreram, principalmente, após o D.D. com o fungo.

Primeiramente, os testes preliminares de viabilidade e penetração das CEPH, após desafios com *C. albicans*, permitiram a seleção de proporções FUN/EPI e de tempos experimentais, para posterior análise da apoptose, da liberação de NO e da expressão de hBD-2 pelas CEPH. O fungo, nas suas maiores proporções (0,1/1 e 0,4/1 FUN/EPI), provocou morte epitelial significativa a partir de 10 h, coincidindo com o momento de observação de filamentos fúngicos intracelulares e de desestruturação epitelial. Estes resultados levaram à seleção das proporções 0,01/1, 0,025/1 e 0,1/1 FUN/EPI, e dos tempos experimentais de 3, 6 e 10 h, buscando garantir células viáveis para as análises posteriores.

A invasão das CEPH por *C. albicans* seguiu três diferentes fases. Inicialmente, no tempo de 3 h de desafio, a presença de filamentos fúngicos na região periférica das colônias epiteliais, por vezes sobre as células, pode

caracterizar uma fase inicial de colonização com adesão do fungo na célula hospedeira. Em seguida, uma fase de invasão intraepitelial (penetração epitelial ativa), associada à transição da forma leveduriforme para a filamentosa do fungo, foi observada no tempo de 6 h, em especial na proporção 0,025/1, a qual se intensificou com o tempo e com o aumento das formas filamentosas prolíficas. E por último, uma fase tardia com destruição significativa das células epiteliais, a partir de 10 h de desafio, foi identificada. Essa fase de invasão epitelial, observada em nosso estudo, é corroborado por modelos similares *in vitro* utilizando epitélio bucal humano reconstituído (RHOE) da linhagem TR146 (GOW; BROWN; ODDS, 2002; LU et al., 2006; WILSON et al., 2009).

Portanto, no modelo experimental do presente trabalho, chamou-nos a atenção o desafio na proporção 0,025/1 FUN/EPI e no tempo de 6 h; pois, nestas condições, houve o início da penetração epitelial ativa pelo fungo ATCC 90028 e, simultaneamente, significativa apoptose epitelial, em relação aos demais tempos. Quanto maior a proporção *C. albicans*/Epitélio, mais precocemente se iniciou o processo de apoptose epitelial. Uma vez iniciada, a apoptose se manteve ao longo do tempo, para cada proporção avaliada individualmente. Embora não tenha ultrapassado o percentual de 2%, o teste de apoptose permitiu a detecção do sofrimento da célula epitelial já em 3 h, fato não observado nos experimentos de viabilidade celular, nos quais a queda do percentual de células viáveis foi observada a partir de 8 h, na maior proporção fúngica.

Poucos são os trabalhos que avaliaram a indução de apoptose de epitélio bucal por *C. albicans*, porém nenhum deles em células palatais. Os estudos encontrados têm utilizado linhagem de células epiteliais derivadas de carcinomas bucais bem diferenciados (SCC15, ATCC; TR146; FaDu) (VILLAR et al., 2010; LU et al., 2006; WAGENER et al., 2012; PARK et al., 2005) e linhagem de queratinócito bucal humano imortalizada (OKF6/TERT2) (VILLAR et al., 2012), e ainda, sem especificação da região bucal da qual as células foram obtidas. OKF6/TERT2 é uma linhagem celular não cancerosa, porém, criada a partir da expressão forçada de telomerase 2 que, por si só, pode afetar os sistemas envolvidos na sinalização da apoptose (VILLAR et al., 2012). Em nosso estudo, utilizamos um modelo experimental a partir de células primárias obtidas de epitélio de palato duro humano (CEPH), o que permitiu mimetizar a resposta do epitélio palatal em usuários de

próteses totais superiores, as quais, na grande maioria, estão contaminadas por fungos *Candida* resultando em estomatite protética.

Os poucos trabalhos encontrados sugerem que a morte apoptótica das células epiteliais bucais por *C. albicans* depende da capacidade do fungo de interagir fisicamente e de invadir a célula hospedeira (VILLAR; ZHAO, 2010); ou ainda da presença da parede celular intacta do microrganismo, destacando a importância das unidades de superfície fúngica nas interações fungo-epitélio e na promoção da patogênese fúngica (WAGENER et al., 2012). Porém, de acordo com nossos achados, os fatores secretados por *C. albicans* induziram apoptose de células epiteliais, principalmente nas maiores proporções fúngicas, não dependendo portanto do contato direto do fungo ou de constituintes de sua parede celular, já que os desafios fúngicos, tanto direto quanto indireto, resultaram em percentuais de apoptose celular similares.

Semelhante aos nossos resultados, Villar e Zhao (2010) verificaram porcentagens baixas de apoptose epitelial (10–15%) durante a infecção com *C. albicans*. Na sequência, em 2012, Villar e colaboradores, embora tenham observado alterações apoptóticas iniciais em mais de 50% das células epiteliais bucais desafiadas in vitro por *C. albicans*, demonstraram que apenas uma pequena porcentagem (10-15%) destas células evoluíram para os estágios finais da apoptose, tal como a degradação de DNA. Os autores revelaram que a transformação morfológica hifal invasora e altamente virulenta de *C. albicans* seria fundamental para este processo de apoptose (VILLAR et al., 2012). De fato, as células hifais são conhecidas por secretarem enzimas hidrolíticas solúveis que podem perturbar a integridade física e promover a morte das células epiteliais bucais (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Em nosso estudo, o sobrenadante do D.I. foi obtido a partir da forma hifal do fungo, portanto, provavelmente, com a presença destas enzimas solúveis, justificando os resultados semelhantes de apoptose após D.D. e D.I. Em acordo, Gasparoto e colaboradores, em 2004, ao avaliarem in vitro apoptose em macrófagos murinos, detectaram este processo de morte celular apenas após desafio com o fungo *C. albicans* viável, e não com o microrganismo morto, sugerindo a necessidade de fatores liberados pelo patógeno viável para a indução de apoptose.

Caspases ativadas são conhecidas por promoverem a clivagem proteolítica de várias proteínas com funções significativas na propagação da apoptose (SLEE; ADRAIN; MARTIN, 2001). Wagener e colaboradores (2012), após desafiar células epiteliais humanas (linhagem TR146) com proteínas glicosiladas da parede celular de *C. albicans*, observaram indução significativa de caspase-3 ativa, após 4 h. Morfologia celular típica de apoptose, como condensação e fragmentação nuclear (corpos apoptóticos), foi presenciada com 24 h de desafio. Em nosso trabalho, as células apoptóticas, identificadas a partir da presença dos corpos apoptóticos, estiveram significativamente presentes previamente às 24 h, ou seja, a partir de 3 h de desafio. Porém, Wagener e colaboradores (2012) não avaliaram períodos intermediários.

Em nosso trabalho, apesar do dano celular ter aumentado de acordo com a penetração das formas filamentosas no epitélio, a avaliação qualitativa das CEPH coradas com laranja de acridina, por meio de microscopia de varredura confocal, sugeriu uma resposta de defesa antimicrobiana contra o fungo. Os filamentos fúngicos, previamente acomodados sobre a monocamada de CEPH, foram observados, após 3 h, apenas na periferia dos aglomerados epiteliais, sugerindo um efeito repulsivo por parte das CEPH sobre o fungo. E ainda, na ausência das CEPH, o biofilme fúngico formado após 3 h apresentou-se mais espesso e ocupava toda a área dos poços das placas de cultura, em comparação ao biofilme na presença do epitélio. Possivelmente, as CEPH não só tiveram um efeito repulsivo como, também, interferiram na proliferação fúngica. Em acordo, Weindl e colaboradores (2007) afirmaram que a célula epitelial é capaz de controlar o crescimento da célula fúngica e a invasão tecidual. As células epiteliais bucais têm restringido a ação citopática de *C. albicans* por meio de sua atividade fungistática (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007), podendo, talvez, até interromper a progressão de vias apoptóticas (VILLAR et al., 2012).

Nos casos de candidose localizada, incluindo a bucal, ocorrem alterações do tecido epitelial e, conseqüentemente, ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro (WEBB et al., 1998; ABIKO et al., 2007). A participação do queratinócito, que pode levar à morte de *C. albicans*, envolve os receptores epiteliais TLR2 e TLR4 seguido da ativação da via NF- κ B (DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; ROUABHIA et al., 2011; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011). Como resposta à

infecção, as células epiteliais liberam NO (FERRARI et al., 2011) e peptídeos antimicrobianos (DALE; FREDERICKS, 2005; PEYRET-LACOMBE et al., 2007), além de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α), sugerindo um desempenho ativo no controle das infecções bucais (DÉCANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; ROUABHIA et al., 2011; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011).

Em relação à produção de NO por epitélio, também não foram encontrados na literatura estudos com células epiteliais de origem palatal. No entanto, está clara a produção deste radical por queratinócitos em resposta a agentes infecciosos (HUSSAIN et al., 2013), à radiação ultravioleta (SEO et al., 2002) e a gases tóxicos como sulfeto de hidrogênio (MERIGHI et al., 2012). Exceto na proporção 0,025/1 de D.D. por 10 h, em nosso estudo, tanto o D.D. quanto o D.I. não induziram níveis de NO acima daqueles basais, uma vez que as concentrações permaneceram entre 49 e 56 μ M, semelhante ao liberado pelas CEPH não desafiadas. É possível que a agressão provocada pelo fungo *C. albicans*, na sua forma viável, sobre as CEPH não tenha sido suficiente para estimular maior liberação de NO. No entanto, a proporção de 0,025/1 FUN/EPI (D.D.), mesmo que sem diferença estatisticamente significativa, levou a um discreto aumento dos valores da concentração de NO pelas células epiteliais no tempo de 6 h, coincidindo com o início da penetração ativa das mesmas pelo fungo. Como já realçado previamente, a proporção de 0,025/1 e o tempo de 6 h podem representar as melhores condições experimentais obtidas em nosso modelo experimental in vitro, no que diz respeito à resposta imune inata das CEPH. Em seguida, no tempo de 10 h, houve redução da liberação de NO pelas CEPH após D.D. com 0,025/1, sugerindo um mecanismo de escape da célula fúngica às respostas imunes destas células epiteliais, como proposto por Villar e Zhao (2010). Por outro lado, Gasparoto e colaboradores (2012) detectaram concentrações elevadas de NO na saliva de indivíduos com estomatite protética e alertaram quanto à importância da presença deste radical no controle da doença, evitando a disseminação de *C. albicans*.

A produção de NO por queratinócitos está consolidada, mas as quantidades variam de acordo com o tempo, a dose e o microrganismo envolvido (GHOSH et al., 2008). Além disso, células epiteliais de regiões anatômicas distintas podem responder, diferentemente, a uma agressão quanto à liberação deste radical

livre. Arany e colaboradores (1996) verificaram que queratinócitos de pele e de mucosa bucal reagem de maneira distinta aos sinais do cálcio para expressão da enzima iNOS e, conseqüentemente, para liberação de NO. Ao contrário dos queratinócitos da pele, queratinócitos da mucosa bucal são resistentes aos sinais de diferenciação induzida pelo cálcio, não aumentando os níveis de iNOS (ARANY et al., 1996).

Seo e colaboradores (2002) demonstraram que linhagens celulares de queratinócitos de pele humana expressam iNOS e produzem NO em momentos distintos, quando submetidos à radiação ultravioleta UVB. De maneira semelhante, outro estudo detectou aumento da produção de NO por queratinócitos de pele humana, somente após 24 h de exposição a altas concentrações de glicose (NAKAI; KUBOTA; KOSAKA, 2004). Ghosh e colaboradores (2008) afirmaram que, uma vez induzida, iNOS pode produzir quantidades micromolares de NO por períodos prolongados de tempo. Em contraste, em nosso estudo, os níveis basais de NO liberado pelas CEPH não foram alterados no decorrer dos períodos; porém, salientamos que nossos experimentos foram analisados somente até 10 h de desafio com *C. albicans*.

Assim como o NO, peptídeos antimicrobianos também são liberados por células epiteliais, fazendo parte da ativação de um mecanismo de defesa do hospedeiro no combate a microrganismos (YANG et al., 1999; HARADA et al., 2004; LU et al., 2006). Os peptídeos hBDs apresentam um amplo espectro antimicrobiano e são considerados um dos mediadores ativos no controle da infecção por *C. albicans* (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007; VYLKOVA et al., 2007). Estudos mostram células epiteliais gengivais humanas expressando níveis elevados de hBD-1, hBD-2 e hBD-3 após infecção com *C. albicans* (VYLKOVA; SUN; EDGERTON, 2007; DECANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009), *C. famata* (BAHRI; SAIDANE-MOSBAHI; ROUABHIA, 2010) e *C. parapsilosis* (BAHRI et al., 2010). Em nosso estudo, foi avaliada a expressão gênica de hBD-2 pelas CEPH, uma vez que a β -defensina 2 tem sido intensamente detectada nas camadas espinhosa, granular e queratinizada do epitélio (DALE et al., 2001). O peptídeo hBD-2 tem se mostrado efetivo na morte das células candidais, sendo a principal defensina envolvida na interface epitélio-ambiente bucal (FENG et al., 2005).

Nosso trabalho mostrou que a expressão máxima de hBD-2 pelas CEPH ocorreu no tempo de 6 h, em condições basais. Este pico em 6 h repetiu-se após D.D. com o fungo nas proporções 0,01/1 e 0,025/1, porém com valores mais elevados. Após 10 h, essa expressão do RNAm de hBD-2 retornou aos níveis basais. Mesmo não se mantendo com o passar do tempo, estes dados sugerem uma importante resposta de defesa imune pelas CEPH no período de 6 h. Vale ressaltar que esta importante resposta de defesa não foi observada após D.I., já que após este tipo de estímulo houve uma redução significativa da expressão de hBD-2 em relação à expressão basal, principalmente no tempo de 6 h. Isto indica que os fatores secretados pelo fungo não foram suficientes para elevar a expressão de hBD-2, havendo a necessidade da interação direta fungo-epitélio para ativação desta resposta de defesa pelas CEPH. Não podemos descartar a possibilidade de que a penetração ativa das células epiteliais pelo fungo, observada a partir de 6 h, também seja um fator primordial para a expressão gênica de hBD-2; porém, esta comprovação requer estudos adicionais.

Lu e colaboradores (2006), em um estudo similar, porém utilizando células epiteliais RHOE, encontraram uma dinâmica da produção de hBD-2 semelhante ao nosso estudo. Os autores demonstraram aumento da expressão de RNAm e da secreção de hBD-2 nas primeiras 12 h após a infecção com *C. albicans*, concomitantemente, com a presença de hifas do microrganismo; enquanto que a ausência do peptídeo secretado ocorreu após 24 h, com a progressão dessas hifas por entre as células epiteliais (LU et al., 2006). Em contrapartida, os pesquisadores encontraram, ainda, restabelecimento da expressão do peptídeo após 48 h (LU et al., 2006), fato este não observado em nossa pesquisa, uma vez que o fungo provocou morte significativa das CEPH a partir de 12 h de infecção.

A condição (carga fúngica de 0,025/1 e tempo de desafio de 6 h) de melhor resposta por parte das CEPH quanto à expressão de hBD-2 coincidiu com aquela que revelou discreto pico de liberação de NO epitelial. Isto fortalece o que relatamos previamente, ou seja, tal condição parece representar a melhor interação fungo viável/célula epitelial para acionar mecanismos de defesa imune, nas condições experimentais do presente trabalho. Assim, as CEPH apresentaram uma resposta máxima de defesa à agressão por *C. albicans* quando se iniciou a penetração ativa das células epiteliais pelo fungo, bem como os sinais de apoptose

epitelial. Considerando que a invasão intraepitelial foi intensificada com o aumento da proporção *C. albicans*/epitélio e amplificada ao longo do tempo, o fungo no interior das células epiteliais, em um momento posterior, foi capaz de bloquear vias de defesa e, inclusive, acionar vias de morte celular, criando estratégias de escape do sistema de defesa do hospedeiro (PARK et al., 2005; CHIANG et al., 2007; VILLAR e ZHAO, 2010); uma vez que houve a redução da concentração de NO e retorno da expressão de hBD-2 ao basal nos estágios mais tardios de nossos experimentos. Evidências científicas demonstraram que microrganismos no interior de células hospedeiras podem subverter mecanismos de defesa celular, garantindo a sobrevivência do patógeno no interior da célula, que resultam em efeitos deletérios ao hospedeiro (FÉGER et al., 2002). Assim sendo, embora tenha havido uma boa resposta imune após 6 h, no nosso modelo experimental, as CEPH não tiveram potencial para reverter os processos de invasão fúngica e de apoptose a partir de 10 h. Isto pode ter ocorrido em função da patogenicidade do fungo sobre estas células, o que levou à diminuição da expressão gênica do hBD-2, ou em função da diminuição desta ação antimicrobiana pelas CEPH, o que teria permitido a proliferação fúngica a concentrações letais para estas células.

Levando-se o exposto em consideração, nossos resultados com CEPH não corroboram a hipótese, apresentada por outros trabalhos, de que o peptídeo antimicrobiano hBD-2 impede a progressão hifal de *C. albicans* pelo epitélio, permitindo a recuperação da capacidade de síntese epitelial e controle do crescimento e da patogenicidade de *Candida spp* (LU et al., 2006; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2010).

Destaca-se, ainda, que o resultado de maior expressão constitutiva do RNAm de hBD-2 após D.D. por 6 h, em relação ao estímulo com LPS, indica que a agressão provocada pelo fungo *C. albicans* sobre as CEPH, no instante da invasão celular, foi mais intensa em comparação ao LPS. Este lipopolissacarídeo é considerado o principal componente da parede celular externa de bactérias Gram-negativas e um dos compostos mais biologicamente ativos (MÜLLER-DECKER et al., 2005). LPS contém uma heterogeneidade atípica no lipídeo A, mostrando tanto estruturas de lipídeo tetra como penta-acetilados (REIFE et al., 2006). Estruturas de lipídio tetra-acetilado são antagonistas de TLR4 (COATS et al., 2005) enquanto os penta-acetilados são agonistas de TLR4 (REIFE et al., 2006). Esta heterogeneidade

na estrutura da porção lipídica depende das concentrações de hemina no meio de crescimento das bactérias, que por sua vez, em última análise, determinam a capacidade do LPS em funcionar como um agonista ou um antagonista para TLR4 (AL-QUTUB et al., 2006; COATS et al., 2009; MORANDINI, 2012). A indução da resposta imune inata está relacionada com uma via dependente de NF- κ B e ativação dos receptores TLR2 e TLR4 (DECANIS; SAVIGNAC; ROUABHIA, 2009; WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011) que resulta na transcrição de peptídeos antimicrobianos como as defensinas (WEINDL; WAGENER; SCHALLER, 2011). Neste estudo, o efeito do LPS sobre a expressão de hBD-2 pelas CEPH, na concentração de 100 ng/mL, pode ter funcionado como um antagonista de TLR4 para esta indução, justificando a baixa expressão de hBD-2 encontrada após este estímulo. Além disso, curiosamente, um estudo recente demonstrou que o LPS de *P. gingivalis* em uma concentração de 10 μ g/mL pode ativar tanto TLR2 quanto TLR4, enquanto que 1 μ g/mL de LPS de *P. gingivalis* ativaria somente TLR2 (SUN et al., 2010).

Vários estudos experimentais já foram feitos na tentativa de identificar as principais moléculas envolvidas na interação entre *C. albicans* e o epitélio bucal. Modelos murinos de candidose bucal, por sua vez, não levam a resultados fidedignos, visto que *C. albicans* não coloniza, naturalmente, a cavidade bucal murina (PHILLIPS; BALISH, 1966), além das diferenças existentes entre os sistemas imunes inatos dos seres humanos e camundongos (MESTAS; HUGHES, 2004). Recentemente, modelos de epitélio bucal humano reconstituído (RHOE), a partir da cultura da linhagem celular de carcinoma TR146 (RHOE), têm sido amplamente utilizados em estudos de infecção por *C. albicans* (LU et al., 2006; LERMANN; MORSCHHAUSER, 2008), além de modelos primários, consistindo de queratinócitos bucais cultivados sobre uma matriz extracelular contendo fibroblastos (DONGARI-BAGTZOGLOU; KASHLEVA, 2006; YADEV et al., 2011). Os fibroblastos são essenciais para o fornecimento de fatores que contribuem para a proliferação e retardo da diferenciação de queratinócitos em epitélio escamoso (KANG et al., 2000; KLINGBEIL, 2006). No entanto, Yadev e colaboradores (2011) ressaltam que os diferentes modelos in vitro de mucosa bucal humana desafiados com *C. albicans* diferem quanto à secreção de citocinas inflamatórias e a expressão constitutiva dos peptídeos antimicrobianos β -defensinas.

Nosso estudo foi o primeiro a utilizar cultura primária de células epiteliais extraídas de palato duro humano, as CEPH. Estas células, em nosso modelo, foram co-cultivadas com fibroblastos gengivais humanos, a fim de se chegar o mais próximo de um modelo *in vitro* representativo de palato duro humano, principal região acometida pela estomatite protética, uma das formas de candidose bucal. Porém, reconhecemos que tal estudo pode fornecer informações limitadas por se tratar de uma cultura em monocamada, visto que a mucosa bucal é um tecido complexo de multi-camadas e de sinalização entre as células, o que pode ser importante para a efetividade do mecanismo de defesa do hospedeiro.

Em resumo, a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se inferir que os fatores secretados por *C. albicans* foram suficientes para agredir o epitélio palatal humano, com indução da apoptose, mesmo na ausência do contato direto fungo-epitélio. As CEPH, por sua vez, foram capazes de apresentar respostas de defesa antimicrobiana à agressão por *C. albicans* que, possivelmente, interferiram na proliferação fúngica. Entretanto, simultaneamente a estas respostas, as CEPH apresentaram os primeiros sinais de penetração ativa pelo fungo. Destaca-se a necessidade da interação direta fungo-epitélio palatal para a ativação desta resposta de defesa pelas CEPH. Ainda, segundo nossos achados, a ativação da via de apoptose do epitélio palatal, induzida pelo fungo ou seus constituintes, foi observada previamente à ativação destes mecanismos de defesa epitelial, principalmente a expressão de hBD-2. Porém, esta capacidade defensiva do epitélio não se manteve no período posterior; ao contrário, houve redução da liberação de NO e retorno da expressão de hBD-2 aos valores basais, além do aumento da invasão epitelial associado à manutenção da apoptose.

Vale destacar a importância desta resposta de defesa, observada neste trabalho, pelas células epiteliais de palato humano frente à agressão por *C. albicans* nas primeiras horas de contato. Tal resposta abrange aspectos antimicrobianos da imunidade inata, que podem ser fundamentais no controle e manutenção da estomatite protética, mais comumente encontrada no palato de usuários de próteses totais superiores. É possível que estas células epiteliais, ativadas pelo fungo e seus produtos, liberem fatores que atraiam e modifiquem outras células, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, participando ativamente da patogênese da doença. Nosso modelo experimental poderá auxiliar no desenvolvimento de estudos

futuros sobre a participação das CEPH e seus produtos antimicrobianos, além de citocinas e quimiocinas, no combate a *C. albicans* e no controle da estomatite protética.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

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

- Os fatores secretados por *C. albicans* hifal no desafio indireto, assim como o contato direto fungo-epitélio, agrediram as células epiteliais de palato humano com indução de apoptose celular.
 - A resposta máxima de defesa das CEPH ocorreu após desafio direto com *C. albicans*, especificamente na proporção 0,025/1 e no tempo de 6 h, coincidindo com os primeiros sinais de penetração ativa das células epiteliais pelo fungo.
 - A ativação da via de apoptose do epitélio palatal, induzida pelo fungo *C. albicans* ou seus constituintes, ocorreu previamente à ativação dos mecanismos de defesa antimicrobiana.
 - As CEPH apresentaram respostas de defesa à agressão por *C. albicans*, através da expressão do peptídeo antimicrobiano hBD-2 e da liberação de NO epitelial de forma dependente da interação direta fungo-epitélio; possivelmente, estas respostas prejudicaram a proliferação fúngica.
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, Sawamura D, Kaku T. Role of β -defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol*. 2007;40:179-84.
- Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 2006;74:4474-85.
- Alekseeva L, Huet D, Féménia F, Mouyna I, Abdelouahab M, Cagna A, et al. Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC Microbiol*. 2009;11:9-33.
- Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tying SK. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220:618-22.
- Aslan SY, Leung KP, Wu CD. The effect of lactoferrin on oral bacterial attachment. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24:411-6.
- Badauy CM, Barbachan JJD, Rados PV, Sant'ana Filho M, Chies JAB. Relationship between *Candida* infection and immune cellular response in inflammatory hyperplasia. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:89-92.
- Bahri R, Saidane-Mosbahi D, Rouabhia M. *Candida famata* modulates toll-like receptor, beta-defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells. *J Cell Physiol*. 2010;222:209-18.
- Bahri R, Curt S, Saidane-Mosbahi D, Rouabhia M. Normal human gingival epithelial cells sense *C. parapsilosis* by toll-like receptors and module its pathogenesis through antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines. *Mediators Inflamm*. 2010;1-13.
- Berdicevsky I, Ben-Aryeh H, Szargel R, Gutman D. Oral *Candida* of asymptomatic denture wearers. *Int J Oral Surg*. 1980;9:113-5.
- Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71:348-76.
-

- Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. Scand J Dent Res. 1974;82:151-90.
- Catalán A, Pacheco JG, Martínez A, Mondaca MA. In vitro and in vivo activity of melaleuca alternifolia mixed with tissue conditioner on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008;105:327-32.
- Chiang LY, Sheppard DC, Bruno VM, Mitchell AP, Edwards JE Jr, Filler SG. *Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis. Cell Microbiol. 2007;9:233-45.
- Coats SR, Pham TT, Bainbridge BW, Reife RA, Darveau RP. MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR4 signaling complex. J Immunol. 2005;175:4490-8.
- Coats SR, Jones JW, Do CT, Braham PH, Bainbridge BW, To TT, et al. Human Toll-like receptor 4 responses to *P. gingivalis* are regulated by lipid A 1- and 4'-phosphatase activities. Cell Microbiol. 2009;11:1587-99.
- Coulthwaite L, Verran J. Potential pathogenic aspects of denture plaque. Br J Biomed Sci. 2007;64:180-9.
- Cross LJ, Williams DW, Sweeney CP, Jackson MS, Lewis MA, Bagg J. Evaluation of the recurrence of denture stomatitis and *Candida* colonization in a small group of patients who received itraconazole. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97:351-8.
- Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, et al. Localized antimicrobial peptide expression in human gingival. J Periodont Res. 2001;35:1-10.
- Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial Peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. Curr Issues Mol Biol. 2005;7:119-33.
- Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C, Holland G, Bannert N, Wilson D, et al. Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. Cell Microbiol. 2009;12:248-71.
-

Darwazeh AM, Al-Refai S, Al-Mojaiwel S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and finger tips of complete denture wearers. *J Prosthet Dent*. 2001;86:420–3.

Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatitis. *British Dental Journal*. 1970;129:151-6.

Décanis N, Savignac K, Rouabhia M. Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human beta-defensin 2 production. *Cytokine*. 2009;45:132-40.

Dikbas I, Koksai T, Calikkocaoglu S. Investigation of the cleanliness of dentures in a university hospital. *Int J Prosthodont*. 2006;19:294-8.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc*. 2006;1:2012-8.

Doss M, White MR, Tecle T, Hartshorn KL. Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J Leukoc Biol*. 2010;87:79-92.

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, Challacomb SJ. Oral candidosis. *Clin Dermatol*. 2000;18:553-62.

Féger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, Arock M. The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol*. 2002;23:151-8.

Feng Z, Jiang B, Chandra J, Ghannoum M, Nelson S, Weinberg A. Human beta-defensins: differential activity against candidal species and regulation by *Candida albicans*. *J Dent Res*. 2005;84:445-50.

Ferrari CK, Souto PC, França EL, Honorio-França AC. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp*. 2011;59:441-8.

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.

Fotos PG, Hellstein JW, Vincent SD. Oral Candidosis revisited. *Gen Dent.* 1991;39:422-30.

Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MHNG, Ferreira E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. *J Oral Rehabil.* 2008;35:370-4.

Gasparoto TH, Gaziri LC, Burger E, de Almeida RS, Felipe I. Apoptosis of phagocytic cells induced by *Candida albicans* and production of IL-10. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;42:219-24.

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.* 2012;29:e331-9.

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

Ghosh A, Park JY, Fenno C, Kapila YL. *Porphyromonas gingivalis*, gamma interferon, and a proapoptotic fibronectin matrix form a synergistic trio that induces c-Jun N-terminal kinase 1-mediated nitric oxide generation and cell death. *Infect Immun.* 2008;76:5514-23.

Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5:366-71.

Gusmão JM, Ferreira dos Santos SS, Neisser MP, Jorge AO, Faria MI. Correlation between factors associated with the removable partial dentures use and *Candida spp.* in saliva. *Gerodontology.* 2011;28:283-8.

Harada K, Ohba K, Ozaki S, Isse K, Hirayama T, Wada A, et al. Peptide antibiotic human beta-defensin-1 and -2 contribute to antimicrobial defense of the intrahepatic biliary tree. *Hepatology.* 2004;40:925-32.

Heilman BJ, Tadle AC, Pimentel LR, Mascharak PK. Selective damage to hyphal form through light-induced delivery of nitric oxide to *Candida albicans* colonies. J Inorg Biochem. 2013;123:18-22.

Hosokawa I, Hosokawa Y, Komatsuzawa H, Gonçalves RB, Karimbux N, Napimoga MH, et al. Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. Clin Exp Immunol. 2006;146:218-25.

Hussain R, Oliynyk I, Roomans GM, Björkqvist M. Modulation of ENaC, CFTR, and iNOS expression in bronchial epithelial cells after stimulation with *Staphylococcus epidermidis* (94B080) and *Staphylococcus aureus* (90B083). APMIS. 2013;121:814-26.

Kang MK, Bibb C, Baluda MA, Rey O, Park NH. In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. Exp Cell Res. 2000;258:288-97.

Kapas S, Tenchini ML, Farthing PM. Regulation of adrenomedullin secretion in cultured human skin and oral keratinocytes. J Invest Dermatol. 2001;117:353-9.

Kido J, Nakamura T, Kido R, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, et al. Calprotectin in gingival crevicular fluid correlates with clinical and biochemical markers of periodontal disease. J Clin Periodontol. 1999;26:653-7.

Klingbeil MFG. Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primária de queratinócitos bucais humanos [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

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.

Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin Invest. 2005;115:2665-72.

Lermann U, Morschhäuser J. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. Microbiology. 2008;154:3281-95.

Lima HG. Avaliação da capacidade fagocítica de mastócitos frente ao periodontopatógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru; 2011.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104:487-501.

Lu Q, Samaranayake LP, Darveau RP, Jin L. Expression of human beta-defensin-3 in gingival epithelia. *J Periodont Res*. 2005;40:474-81.

Lu Q, Jayatilake JAMS, Samaranayake LP, Jin L. Hyphal invasion of *Candida albicans* inhibits the expression of Human β -defensins in experimental oral candidiasis. *J Invest Dermatol*. 2006;126:2049-56.

Malic S, Hill KE, Ralphs JR, Hayes A, Thomas DW, Potts AJ, et al. Characterization of *Candida albicans* infection of an in vitro oral epithelial model using confocal laser scanning microscopy. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:188-94.

Marchini L, Tamashiro E, Nascimento DF, Cunha VP. Self-reported denture hygiene of a sample of edentulous attendees at a University dental clinic and the relationship to the condition of the oral tissues. *Gerodontology*. 2004;21:226-8.

Marchini L, Vieira PC, Bossan TP, Montenegro FL, Cunha VP. Self-reported oral hygiene habits among institutionalised elderly and their relationship to the condition of oral tissues in Taubaté, Brazil. *Gerodontology*. 2006;23:33-7.

Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:417-22.

Merighi S, Gessi S, Varani K, Fazzi D, Borea PA. Hydrogen sulfide modulates the release of nitric oxide and VEGF in human keratinocytes. *Pharmacol Res*. 2012;66:428-36.

Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*. 2004;172:2731-8.

Morandini ACF. Avaliação do papel dos receptores TLR2 e TLR4 na produção de citocinas por fibroblastos humanos periodontais deficientes desses receptores [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru; 2012.

Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Med Mycol*. 2005;43:191-208.

Müller-Decker K, Manegold G, Butz H, Hinz DE, Hüttner D, Richter KH, et al. Inhibition of cell proliferation by bacterial lipopolysaccharides in TLR4-positive epithelial cells: independence of nitric oxide and cytokine release. *J Invest Dermatol*. 2005; 124:553-61.

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

Nakai K, Kubota Y, Kosaka H. Inhibition of nuclear factor kappa β activation and inducible nitric oxide synthase transcription by prolonged exposure to high glucose in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Br J Dermatol*. 2004;150:640-6.

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

Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real. *Rev Biotechnol Ciên Desenv*. 2004;33:10-3.

Odds FC. Mycology in oral pathology. *Acta Stomatolog Belg*. 1997;94:75-80.

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

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, Edwards JE, et al. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*. 2005;7:499-510.

Peltola P, Vehkalahti MM, Wuolijoki-Saaristo K. Oral health and treatment needs of the long-term hospitalised elderly. *Gerodontology*. 2004;21:93-99.

Pereira EM. Candidose associada ao uso de prótese total superior: avaliação demográfica, clínica e microscópica [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; 2007.

Peyret-Lacombe A, Duplan H, Watts M, Charveron M, Brunel G. Antimicrobial peptide modulation in a differentiated reconstruction gingival epithelium. *Cell Tissue Res.* 2007;328:85-95.

Phillips AW, Balish E. Growth and invasiveness of *Candida albicans* in the germ-free and conventional mouse after oral challenge. *Appl Microbiol.* 1966;14:737-41.

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

Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human β -defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect.* 2005;7:1117-27.

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.

Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28:390-8.

Reichl RB. Oral Candidiasis: an old disease of growing concern. *Gen Dent.* 1990;38:114-20.

Reife RA, Coats SR, Al-Qutub M, Dixon DM, Braham PA, Billharz RJ, et al. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide lipid A heterogeneity: differential activities of tetra- and penta-acylated lipid A structures on E-selectin expression and TLR4 recognition. *Cell Microbiol.* 2006;8:857-68.

Rouabhia M, Mukherjee PK, Lattif AA, Curt S, Chandra J, Ghannoum MA. Disruption of sphingolipid biosynthetic gene IPT1 reduces *Candida albicans* adhesion and prevents activation of human gingival epithelial cell innate immune defense. *Med Mycol.* 2011;49:458-66.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, Van Gurp M, Van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004;23:2861-74.

Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Fukunaga J, Sugahara T. Immunohistochemical study on expression of α -defensin and β -defensin-2 in human oral epithelia with candidiasis. *Oral Dis*. 2002;8:37-41.

Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012;3:271-9.

Seo SJ, Choi HG, Chung HJ, Hong CK. Time course of expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase and generation of nitric oxide by ultraviolet B in keratinocyte cell lines. *Br J Dermatol*. 2002;147:655-62.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*. 2001;276:7320-6.

Steubesand N, Kiehne K, Brunke G, Pahl R, Reiss K, Herzig K, et al. The expression of the β -defensins hBD-2 and hBD-3 is differentially regulated by NF- κ B and MAPK/AP-1 pathways in an *in vitro* model of Candida esophagitis. *BMC Immunol*. 2009;10:36-51.

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.

Song X, Sun J, Støre G, Hansen BF, Olsen I. Colony morphologies, species, and biotypes of yeasts from thrush and denture stomatitis. *Acta Odontol Scand*. 2009;67:248-55.

Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2010;81:1488-96.

Tang X, Yang X, Peng Y, Lin J. Protective effects of lycopene against H₂O₂-induced oxidative injury and apoptosis in human endothelial cells. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23:439-48.

Tanida T, Okamoto T, Okamoto A, Wang H, Hamada T, Ueta E, et al. Decreased excretion of antimicrobial proteins and peptides in saliva of patients with oral candidiasis. *J Oral Pathol Med*. 2003;32:586-94.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995;267:1456-62.

Vanden Abbeele A, Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. *Gerodontology*. 2008;25:222-8.

Villar CC, Kashleva H, Nobile CJ, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun*. 2007;75:2126-35.

Villar CC, Zhao XR. *Candida albicans* induces early apoptosis followed by secondary necrosis in oral epithelial cells. *Mol Oral Microbiol*. 2010;25:215-25.

Villar CC, Aniemeke JC, Zhao XR, Huynh-Ba G. Induction of apoptosis in oral epithelial cells by *Candida albicans*. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27:436-48.

Vylkova S, Sun JN, Edgerton M. The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides. *Purinergic Signal*. 2007;3:91-7.

Vylkova S, Nayyar N, Li W, Edgerton M. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:154-61.

Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6:e17046.

Wagener J, Weindl G, Groot PWJ, Boer AD, Kaesler S, Thavaraj S, et al. Glycosylation of *Candida albicans* cell wall proteins is critical for induction of innate immune responses and apoptosis of epithelial cells. *PLoS One*. 2012;7:e50518.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty DWS, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. An etiology and management: A review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Austral Dent J*. 1998;43:160-6.

Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, et al. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest*. 2007;117:3664-72.

Weindl G, Wagener J, Schaller M. Epithelial cells and innate antifungal defense. *J Dent Res*. 2010;89:666-75.

Weindl G, Wagener J, Schaller M. Interaction of the mucosal barrier with accessory immune cells during fungal infection. *Int J Med Microbiol*. 2011;301:431-5.

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

Wilson D, Thewes S, Zakikhany K, Fradin C, Albrecht A, Almeida R, et al. Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res*. 2009;9:688-700.

Xiao S, Zhu S, Ma B, Xia ZF, Yang J, Wang G. A new system for cultivation of human keratinocytes on acellular dermal matrix substitute with the use of human fibroblast feeder layer. *Cells Tissues Organs*. 2008;187:123-30.

Yadev NP, Murdoch C, Saville SP, Thornhill MH. Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis. *Microb Pathog*. 2011;50:278-85.

Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999;286:525-8.

Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, et al. Apoptosis-inducing factor mediates poly (ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18314-9.

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

Zhu W, Filler SG. Interactions of *Candida albicans* with epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2010;12:273-82.

APÉNDICES

APÊNDICE A – Formulário para coleta de dados clínicos dos voluntários**1. FICHA CONTROLE DO VOLUNTÁRIO DA PESQUISA****Voluntário da pesquisa:** _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Cor: _____

Profissão: _____

Data da biópsia: _____

Nome do profissional: _____

Tamanho do fragmento: _____

Enfermidades agudas ou crônicas: _____

Doenças sistêmicas: () sim () não Quais: _____

Medicamentos de uso terapêutico: _____

Uso de fumo: () sim () não Uso de álcool: () sim () não

Drogas: () sim () não Especificar: _____

Hábitos: _____

Antecedentes familiares (câncer, enfermidades auto-imune): _____

Observações: _____

Assinatura do Voluntário_____
Assinatura do autor da pesquisa
Ana Regina Casaroto

APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para o desenvolvimento da pesquisa em questão, **Produção de β -defensina e catelicidina por células epiteliais frente a *Candida albicans***, se faz necessário a manutenção, em laboratório, de células epiteliais da região de palato duro da boca, ou seja, “células do céu da boca”. A obtenção dessas células será a partir de fragmentos da mucosa de palato duro, doados por CINCO VOLUNTÁRIOS devidamente esclarecidos, ou seja, os próprios integrantes da pesquisa, incluindo o próprio autor da pesquisa. As células epiteliais da boca serão mantidas em laboratório e desafiadas com o fungo *Candida albicans* para estudo da sua produção de substâncias antifúngicas. Tais substâncias são importantes no combate da doença candidose bucal, provocada por esse fungo. Os resultados da pesquisa, futuramente, poderão ajudar na elaboração de métodos de prevenção e tratamentos alternativos para essa doença. Assim, todos os resultados serão publicados, não havendo restrições quanto à divulgação dos mesmos.

Os possíveis riscos são inerentes ao ato cirúrgico necessário para a retirada do fragmento de mucosa do palato. Porém, por se tratar de fragmentos pequenos e superficiais, retirados por um profissional devidamente capacitado, não há riscos para o indivíduo quanto à cicatrização e formação de defeitos na região. Quanto aos benefícios, por se tratar de uma pesquisa em laboratório, a mesma não traz benefícios diretos e imediatos para o indivíduo.

Para mais informações, procurar a aluna Ana Regina Casaroto, no Departamento de Estomatologia, disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - FOB/USP, telefone (14)3235-8251 ou (14) 8103-8626.

Caso o sujeito da pesquisa 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, localizado no endereço Al. Octávio Pinheiro Brizolla, 9-75 (sala no prédio da biblioteca, FOB-USP) ou pelo telefone (14)3235-8356.

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**, 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** concordando em participar da pesquisa proposta.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).
 Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do Voluntário da Pesquisa

Assinatura do Autor da pesquisa
 Ana Regina Casaroto

APÊNDICE C – Instrumento de doação de tecidos bucais**Identificação do doador:**

Nome: _____

Data de nascimento: _____ Local de nascimento: _____ UF: ____

RG nº: _____ CPF nº: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ UF: _____ CEP: _____

Telefones para contato: _____

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram a necessidade de remoção do(s) tecido(s) bucal(is), e concordo que o mesmo seja utilizado na pesquisa de título “Produção de β -defensina e catelicidina por células epiteliais frente a *Candida albicans*” – que objetiva analisar se o fungo *C. albicans* altera a produção desses peptídeos por essas células.

Fui ainda esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

Bauru, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do doador

ANEXO A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB/USP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 001/2012

Bauru, 9 de março de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Produção de β -defensiva e catelicidina por células epiteliais frente a *Candida albicans*"**, de autoria de Ana Regina Casaroto, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia **29 de fevereiro de 2012**.

O CEP-FOB/USP considerou o projeto APROVADO lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador

Profª Drª Vanessa Soares Lara
Docente do Departamento de Estomatologia

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: cep@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

ANEXO B

<p style="text-align: center;">Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru</p> <hr/> <p style="text-align: center;">Comitê de Ética em Pesquisa</p>
<p>Proc. Nº 001/2012</p>		
Título do Projeto:	<i>Produção de β-defensina e catelicidina por células epiteliais frente a Candida albicans</i>	
Autor(es):	Ana Regina Casaroto	
Orientador(a):	Profª Drª Vanessa Soares Lara	
Co-orientador(a)		
Data de entrega do Relatório Final:	10 de julho de 2013	
Data da reunião do CEP em que o Parecer Final será analisado:	28 de agosto de 2013	
<hr/>
Maristela Petenucci Ferrari Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa		