

UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GABRIELA CAROLINE ALONSO

**AVALIAÇÃO, DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA GENES DE
VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E SUA EXPRESSÃO EM ISOLADOS
CLÍNICOS SUBMETIDOS À TERAPIAS ANTIFÚNGICAS**

Araraquara

2017



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



GABRIELA CAROLINE ALONSO

**AVALIAÇÃO, DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA GENES DE
VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E SUA EXPRESSÃO EM ISOLADOS
CLÍNICOS SUBMETIDOS À TERAPIAS ANTIFÚNGICAS**

**Dissertação apresentada no Programa de Pós
Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese,
da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da
Universidade Estadual Paulista para obtenção do
título de Mestre em Reabilitação Oral.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Marlise Inêz Klein

Araraquara

2017

Alonso, Gabriela Caroline

Avaliação, desenho e padronização de primers para genes de virulência de *Candida albicans* e sua expressão em isolados clínicos submetidos à terapias antifúngicas / Gabriela Caroline Alonso. -- Araraquara: [s.n.], 2017

141 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Prótese) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina

Co-orientadora: Dra. Marlise Inês Klein

1. *Candida albicans* 2. Biofilmes 3. Fotoquimioterapia
4. Expressão gênica 5. Fatores de virulência I. Título

GABRIELA CAROLINE ALONSO

**AVALIAÇÃO, DESENHO E PADRONIZAÇÃO DE *PRIMERS* PARA GENES DE
VIRULÊNCIA DE *CANDIDA ALBICANS* E SUA EXPRESSÃO EM ISOLADOS
CLÍNICOS SUBMETIDOS À TERAPIAS ANTIFÚNGICAS**

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Comissão Julgadora

Presidente e orientadora: Prof^a Dr^a Ana Cláudia Pavarina

2º Examinador: Profº Drº Paulo Tambasco de Oliveira

3º Examinador: Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara, 07 de julho de 2017

Dados Curriculares

GABRIELA CAROLINE ALONSO

Nascimento: 09/02/1992 – Franca, São Paulo

Filiação: Fábio José Silva Alonso
Sônia Aparecida Carreira Alonso

- 2010 – 2014:** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2010 – 2014:** Estágio de Iniciação Científica no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2013 – 2014:** Representante Discente Titular junto ao Conselho do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2013 – 2014:** Intercâmbio realizado na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, Portugal, através de Bolsa Mérito Acadêmico pela Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2014 – 2014:** Aluna Monitora no departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- 2015 – 2016:** Estágio de Docência nas disciplinas de Prótese Parcial Removível I e II do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista Júlio Mesquita Filho.
- 2015 – 2017:** Curso de Mestrado em Reabilitação Oral com ênfase em Prótese pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Agradecimentos

*Agradeço primeiramente a **Deus** pela oportunidade e bênçãos para que esse trabalho fosse realizado e por ter colocado pessoas maravilhosas confortando minha caminhada.*

*Aos meus pais **Fábio e Sônia**, meu eterno agradecimento por dedicarem suas vidas a mim e a meu irmão, pelo amor incondicional, apoio e incentivo, que com certeza foram e são essenciais para essa caminhada. Obrigada por serem meus melhores exemplos. Todas as batalhas vencidas também são méritos de vocês. Amo vocês!*

*Ao meu irmão **Fábio Henrique**, pelo cuidado, amor, carinho e apoio durante toda a minha caminhada. Amo você!*

*Aos meus **Avós, Tios e Primos** minha eterna gratidão pela confiança, apoio e força que me fortaleceram nessa jornada.*

*Agradeço imensamente a minha orientadora, **Profª Drª Ana Cláudia Pavarina** por aceitar me orientar no curso de mestrado nesta instituição de ensino, por todas as oportunidades oferecidas, confiança, orientação, apoio e ensinamentos. Agradeço de coração o cuidado e carinho que teve comigo nesta jornada.*

*Agradeço a **Profª Drª Marlise Inêz Klein** pela paciência e dedicação neste trabalho, os quais foram essenciais para o seu desenvolvimento. Obrigada pelos inúmeros conhecimentos transmitidos e por permitir meu crescimento acadêmico e pessoal estando comigo desde o início desta jornada. Agradeço também todo o carinho e amizade.*

*Aos professores da disciplina de Prótese Parcial Removível, **Profª Drª Janaína Habib Jorge** e **Profº Drº Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, por todo apoio, ensinamentos e valiosa contribuição para minha formação profissional.*

*Agradeço aos demais **professores do Departamento de Materiais Dentários e Prótese** pelos ensinamentos durante o curso, os quais foram essenciais para a minha formação profissional.*

*Agradeço à amiga **Fernanda Alves** por todos os momentos vividos, pelas conversas, pelo apoio e pela disposição em me ensinar desde o início. Obrigada pela convivência e amizade! Sem sua ajuda, calma e ânimo a jornada seria muito mais difícil. Muito obrigada!*

À amiga **Juliana Cabrini**, obrigada pelo apoio, pelos ensinamentos e contribuições ao longo dessa jornada. Obrigada também pela ajuda com a realização da estatística. Sem sua experiência e calma a jornada teria sido mais árdua. Muito obrigada!

Às amigas **Beatriz Panariello e Lívia Jacovassi**, obrigada pela amizade e apoio tanto dentro quanto fora da faculdade, durante todo o curso de mestrado.

Ao amigo **Elkin**, obrigada pelo companheirismo, amizade e apoio na execução deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular.

Aos amigos companheiros da pós-graduação **Guilherme Rocha, Bruna Pimentel, Kássia Dias, Jefferson Trigo, Vinícius Sakima, Isabel, Midian Castillo, Carmelia Lobo, Jacqueline Zoccolotti, Jéssica Bernegossi, Camila de Foggi, Larissa Miotto e Priscila Scavassin**, obrigada pela amizade e convívio.

Aos amigos **Mariana Amaral, Bruna Moura, Marina Intatilo, Bianca Hitos, Tháila Cruz e Vinícius Krieger** pela força, apoio, companheirismo e amizade que foram essenciais durante este período.

Agradeço também às técnicas dos laboratórios **Geisiane Bueno, Luana Sales e Lígia Sabino** pela ajuda com a execução da metodologia e pela amizade durante esta jornada.

À **Prof.^a Dr.^a Lívia Dovigo**, obrigada pela ajuda na execução da estatística.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/UNESP)** por abrir as portas para meu conhecimento, proporcionando ótima estrutura para realização do curso de pós-graduação, bem como para a realização deste trabalho, contribuindo para minha formação profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral**, do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da FOAr/UNESP, por toda acessibilidade durante este período.

Agradeço aos **funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese**, pelo convívio, amizade e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de Mestrado concedida no período de março/2015 a setembro/2015 e à **Fundação de**

Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2015/13409-0) pela bolsa de Mestrado concedida no período de outubro/2015 a fevereiro/2017.

Agradeço ao CEPID (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão) (2013/07276-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (305391/2012-7) pelo auxílio financeiro concedido a este trabalho.

Alonso GC. Avaliação, desenho e padronização de *primers* para genes de virulência de *Candida albicans* e sua expressão em isolados clínicos submetidos à terapias antifúngicas. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

Este estudo avaliou longitudinalmente a expressão de genes de virulência de isolados clínicos de *Candida albicans* de pacientes com candidose oral tratados com Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) ou Nistatina (NIS). Inicialmente, a especificidade de *primers* da literatura e novos *primers* desenhados para os genes de virulência de *C. albicans* ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SAP4, SOD1, SOD5 e ACT1 (gene de controle) foi avaliada através de análises *in silico* e *in vitro*. Para a análise *in silico*, foi realizada uma busca no *Pubmed* por artigos com sequências de *primers* que avaliaram a expressão gênica de *C. albicans*. Em seguida, a homologia dos *primers* foi analisada (*BLAST* e *ClustalW2*) assim como a presença de estruturas secundárias (*Mfold*). Novos *primers* foram desenhados (*Beacon Designer™*) a partir de sequências obtidas do "*Candida Genome Database*". Os *primers* foram sintetizados e testados *in vitro* pela técnica de PCR utilizando um painel de DNA genômico de diferentes espécies de *Candida*, com seus produtos visualizados em gel de agarose. Reações de qPCR foram realizadas para determinar a concentração ótima e a eficiência dos *primers*. Para a análise da expressão gênica, os pacientes foram submetidos à aPDT [6 sessões com aplicações do fotossensibilizador *Photoditazine™* (200 mg/mL) no palato e na prótese por 20 minutos com posterior aplicação de luz LED (660 nm – 50 J/cm²)] ou submetidos ao tratamento convencional [bochechos de um minuto com 1 mL da solução de Nistatina (100.000 UI/mL) quatro vezes ao dia durante 15 dias]. Coletas microbiológicas foram realizadas nos tempos Inicial (sem tratamento), Final (pós-tratamento) e 60 dias após o início do tratamento. As amostras foram plaqueadas em meio *CHROMagar* e as colônias (*C. albicans*) foram submetidas à extração e purificação do RNA. O cDNA foi sintetizado e a técnica de RT-qPCR realizada. Os dados da expressão foram analisados por Análise de Variância para Medidas Repetidas Mista ($\alpha = 0,05$). Os *primers* da literatura para os genes SAP1 e HWP1 foram específicos para *C. albicans* enquanto o gene SOD1 reagiu com *C. albicans* e *Candida dubliniensis*. Os *primers* delineados para os genes ACT1, ALS1 e HWP1 foram detectados apenas em *C. albicans*, enquanto os *primers* para os genes CAP1, CAT1, EFG1, LIP3 e PLB1 foram detectados em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Todos os *primers* apresentaram *Melt Curves* ideais, coeficiente

de correlação $\cong 1$ e eficiência entre 90-110%, com *slope* $\cong -3.3$. Os dados mostraram que a expressão gênica do gene CAT1 foi superior na coleta final em relação à coleta inicial para ambos os grupos ($p = 0,041$). A expressão do gene LIP3 foi reduzida significativamente da coleta inicial para a final, independente do tratamento ($p = 0,039$). O gene SOD1 teve sua expressão diminuída entre as coletas, independente do tratamento ($p = 0,021$). A expressão dos genes PLB1 e ACT1 foi maior no grupo aPDT, independente das coletas ($p < 0,01$ e $p = 0,046$, respectivamente). Para os genes ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 e SAP1 não houve diferença estatística entre as coletas independente do tratamento, os quais não influenciaram a expressão de tais genes ($p > 0,05$). Portanto, os dados mostram que os *primers* estão padronizados para análises de expressão gênica a partir de amostras clínicas e não ocorreram diferenças significativas na expressão dos genes de virulência de isolados clínicos de *C. albicans* de pacientes tratados com aPDT quando comparados com os tratados com NIS, exceto para os genes PLB1 e ACT1.

Palavras chave: *Candida albicans*, Biofilmes, Fotoquimioterapia, Expressão gênica; Fatores de virulência.

Alonso GC. Evaluation, design and standardization of primers for *Candida albicans* virulence genes and their expression in clinical isolates submitted to antifungal therapies. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

ABSTRACT

This study evaluated longitudinally the expression of *Candida albicans* virulence genes on clinical isolates from patients with oral candidiasis treated with Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) or Nystatin (NIS). First, specificity of primers from the literature and newly designed primers for *C. albicans* virulence genes ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SAP4, SOD1, SOD5 and ACT1 (control gene) was evaluated through in silico and in vitro analyzes. For in silico analysis, a Pubmed search was performed for studies with primer sequences that evaluated gene expression of *C. albicans*. Then, the homology of these primers was checked (*BLAST* and *ClustalW2*) as well as the presence of secondary structures (*Mfold*). New primers were designed (*Beacon Designer*[™]) from sequences obtained from the "*Candida Genome Database*". The primers were synthesized and tested in vitro by PCR using a panel of genomic DNA from different *Candida* species, with their products visualized on agarose gel. qPCR reactions were performed to determine primers' optimal concentration and efficiency. For gene expression analysis, patients were submitted to aPDT (6 sessions with applications of *Photoditazine*[™] photosensitizer (200 mg/mL) on the palate and dentures for 20 minutes with subsequent application of LED (660 nm - 50 J / cm²)] or conventional treatment [1 minute mouthwash with 1 mL of Nystatin solution (100.000 UI/ mL) four times a day for 15 days]. Microbiological cultures were taken at the initial (before treatment), final (post-treatment) and 60 days after treatment initiation. The samples were plated in *CHROMagar* medium and the colonies (*C. albicans*) were submitted to RNA extraction and purification. The cDNA was synthesized and RT-qPCR technique was performed. Expression data were analyzed by Analysis of Variance for Mixed Repeated Measures ($\alpha = 0.05$). The literature primers for the SAP1 and HWP1 genes were specific for *C. albicans* while the SOD1 gene reacted with *C. albicans* and *Candida dubliniensis*. The designed primers for ACT1, ALS1 and HWP1 genes were detected only in *C. albicans*, while the primers for CAP1, CAT1, EFG1, LIP3 and PLB1 genes were detected in *C. albicans* and *C. dubliniensis*. All primers presented ideal Melt Curves, correlation coefficient of $\cong 1$ and efficiency between 90-110%, with slope $\cong -3.3$. The data showed that the gene expression of CAT1 gene was higher in the final culture compared to the initial culture for both groups ($p = 0,041$).

Expression of the LIP3 gene was significantly reduced from initial to final culture, regardless of treatment ($p = 0,039$). The SOD1 gene had its expression decreased between the cultures, regardless of the treatment ($p = 0,021$). The PLB1 and ACT1 genes expression was higher in the aPDT group, independent of the cultures ($p < 0,01$ and $p = 0,046$, respectively). For the ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 and SAP1 genes, there was no statistical difference between the cultures, independent of the treatment, which did not influenced the expression of such genes ($p > 0,05$). Therefore, the data show that the primers are standardized for gene expression analyzes from clinical samples and there are no significant differences on virulence gene expression of clinical isolates of *C. albicans* from patients treated with aPDT when compared to those treated with NIS, except for PLB1 and ACT1 genes.

Keywords: *Candida albicans*, Biofilms, Photochemotherapy, Gene expression, Virulence factors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Infecções Causadas por Espécies de <i>Candida</i>	18
2.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	24
2.3 Técnica de qPCR e Delineamento de <i>Primers</i>	31
2.4 Expressão Gênica dos Fatores de Virulência de <i>C. albicans</i>	33
3 PROPOSIÇÃO	47
4 MATERIAL E MÉTODO	48
4.1 Estudo 1: Análise e Padronização de <i>Primers</i> para Utilização na Técnica de RT - qPCR.....	48
4.1.1 Análise in silico dos <i>primers</i>	48
4.1.2 Extração de DNA para padronização dos <i>primers</i>	52
4.1.3 Padronização dos <i>primers</i>	55
4.2 Estudo 2: Expressão Gênica dos Genes de Virulência em Isolados Clínicos de Pacientes Submetidos à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Nistatina.....	62
4.2.1 Preparo das amostras.....	62
4.2.2 Análise da expressão gênica.....	66
4.3 Análise Estatística.....	72
5 RESULTADO	73
5.1 Estudo 1: Análise e Padronização de <i>Primers</i> para Utilização na Técnica de RT - qPCR.....	73
5.1.1 Análise in silico – <i>Primers</i> da literatura.....	73
5.1.2 Análise in silico - <i>Primers</i> delineados	82
5.1.3 Justificativa para a escolha dos <i>primers</i>	86
5.1.2 Análise in vitro para padronização dos <i>primers</i> desenhados e da literatura	88

5.2 Estudo 2: Análise da Expressão Gênica em Isolados Clínicos de Pacientes	
Submetidos à aPDT ou NIS.	102
5.2.1 Análise da expressão gênica.....	102
6 DISCUSSÃO	119
7 CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS	130
APÊNDICE.....	136
ANEXO.....	141

1 INTRODUÇÃO

A infecção de tecidos moles da cavidade bucal por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é a infecção fúngica mais frequente entre humanos^{1,72}. *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente e patogênica^{1,43,72}. Alguns fatores predisponentes podem acentuar a susceptibilidade do hospedeiro à infecção, tais como próteses mal ajustadas, uso de antibióticos de amplo espectro e imunossupressores, terapias antineoplásicas e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)^{71,76}.

A capacidade das diferentes espécies de *Candida* em desenvolver infecção nos seres humanos parece ser mediada por diversos fatores de virulência, os quais podem ser entendidos como as características ou produtos microbianos que possibilitam a interação com as células do hospedeiro causando algum tipo de dano^{34,76}. Os principais fatores de virulência identificados nas espécies de *Candida* são: adesão e formação de biofilme em tecidos humanos e superfícies abióticas^{15,69}; e a produção de enzimas hidrolíticas com capacidade de destruição tecidual⁷⁶.

Os biofilmes são comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície, organizados em camadas de células e envoltos em uma matriz polimérica extracelular²⁸. A presença dessa matriz e a organização em camadas celulares têm sido sugeridas como fatores contribuintes para a resistência dos biofilmes frente aos antifúngicos, pois limitam a penetração das drogas e protegem as células da resposta imunológica do hospedeiro⁷⁶. Dessa forma, a adesão inicial das células de *Candida* aos tecidos ou outras superfícies abióticas, a posterior divisão e proliferação celular e a subsequente formação de biofilme apresentada pelas espécies de *Candida* estão diretamente relacionadas à virulência destes microrganismos e à sua capacidade de causar infecções²⁷.

A capacidade de adesão das células de *Candida* ao hospedeiro, crucial na etapa de formação do biofilme, parece ser mediada por diversas propriedades da parede celular como: hidrofobicidade da parede celular; composição da mesma e sua carga molecular; e morfologia do fungo²⁷. O gene ALS1 é responsável por codificar a proteína de adesão celular: adesina²⁸. Ainda, este fungo possui a habilidade de adaptação às alterações no pH do ambiente, flexibilidade metabólica e resposta ao estresse oxidativo. A resposta ao estresse oxidativo parece ser vital para a sobrevivência de *C. albicans*, uma vez que esse dano causa a morte celular²¹. Como proteção e em resposta ao estresse oxidativo, este fungo expressa genes antioxidantes, entre eles CAP1, CAT1 e SOD1 que ativam vias que auxiliam na proteção

contra radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen species*)^{21,26,40,46,83}.

Além desses fatores, o gene EFG1 regula a transcrição de genes responsáveis pela formação do biofilme³⁵. A formação de hifas, mediada pelo gene HWP1, facilita a adesão e invasão do fungo no tecido do hospedeiro⁷⁷. A habilidade de *C. albicans* em formar hifa auxilia este fungo a invadir o substrato em que está aderido, transformando-o em sua forma mais invasiva. Além disso, a forma alongada da hifa ajuda na translocação direcional de *Candida* no hospedeiro, na consolidação da colônia, na aquisição de nutrientes e na formação de matrizes tri-dimensionais⁷⁹. As lipases são enzimas que degradam lipídeos e são codificadas por vários genes, entre eles os LIP3, que permite o crescimento deste fungo em lipídios, que são importantes fontes de carbono³⁶ o qual auxilia o crescimento do biofilme na mucosa⁶⁰.

Por fim, a secreção de enzimas degradativas como as fosfolipases (por exemplo, PLB1)⁴⁴ e as proteinases (por exemplo, SAP1)⁵⁹ desempenha um papel importante na infecção por *Candida* spp., uma vez que são capazes de hidrolisar importantes constituintes da membrana citoplasmática da célula hospedeira, como por exemplo, fosfolipídios e proteínas. Esse processo resulta na ruptura da membrana celular pelo microrganismo, permitindo a invasão do fungo nos tecidos do hospedeiro⁷⁰ o que causa o aumento da virulência.

Visto os diversos mecanismos que o fungo se dispõe para contornar os tratamentos contra a candidose, pode-se observar que *C. albicans* possui uma ampla gama de ferramentas biológicas que permitem a invasão deste fungo no tecido do hospedeiro, garantindo sua sobrevivência no meio bucal, a formação de biofilme e sua proteção contra a imunidade do hospedeiro e as terapias antifúngicas convencionais.

Os tratamentos direcionados à candidose bucal consistem na utilização de terapia antifúngica tópica⁶ (polienos e os azóis), medicação antifúngica sistêmica⁹ (anfotericina B, itraconazol e equinocandinas) e procedimentos de higienização e desinfecção das próteses⁶. Embora esses medicamentos se mostrem eficazes no alívio dos sinais e sintomas clínicos da infecção associada a *Candida* spp., na maioria das vezes, não eliminam totalmente os microrganismos^{43,64}. Além disso, a saliva e movimentos da musculatura bucal agem como agentes diluentes, os quais podem reduzir a dose do medicamento deixando-os em concentrações subterapêuticas^{5,47}. Deste modo, há uma frequente re-colonização da mucosa bucal pelos microrganismos após o tratamento, o que leva a infecções recorrentes⁴⁹. A terapia antifúngica sistêmica é usualmente prescrita a pacientes com saúde geral comprometida e nos

episódios de infecções recorrentes⁶⁵. No entanto, a utilização destes medicamentos pode promover o desenvolvimento de hepatotoxicidade e resistência antifúngica⁷².

Diante dos problemas associados à capacidade das espécies de *Candida* em desenvolver infecção, a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (do inglês “*Antimicrobial Photodynamic Therapy*” - aPDT) tem sido sugerida como um método alternativo na inativação de *Candida* spp. e para o tratamento de infecções fúngicas superficiais^{25,31,81}. Com resultados positivos, essa terapia tem sido muito estudada no tratamento das infecções fúngicas bem como no tratamento do câncer⁴. Em linhas gerais, o processo fotodinâmico demanda a utilização de um agente fotossensibilizador (FS), a aplicação de uma luz que seja correspondente à banda de absorção do FS, e a presença de oxigênio^{22,41}. Inicialmente, a célula-alvo deve ser tratada com o FS de absorção máxima de luz específica, num processo conhecido como fotossensibilização. Em seguida, uma fonte de luz deve ser acionada para a iluminação do alvo sensibilizado. A interação da luz de comprimento de onda adequado com o FS, na presença de oxigênio, resulta em espécies ROS capazes de induzir a inativação celular⁸. Tem sido sugerido que esse mecanismo envolve a absorção de fótons da fonte de luz pelo FS, o que leva seus elétrons a um estado excitado. Na presença de oxigênio, o FS excitado pela luz pode reagir com moléculas vizinhas, por meio da transferência de elétrons ou hidrogênio (reação do tipo I) ou pela transferência de energia ao oxigênio (reação do tipo II), levando à produção de espécies ROS⁸. Ambos os caminhos podem levar à morte celular.

Diferentes tipos de FSs de primeira geração foram utilizados em estudos anteriores, incluindo as porfirinas^{7,25}. Atualmente, os FSs de segunda geração têm sido avaliados^{17,45,78} e entre esses compostos estão as clorinas, que são FSs que apresentam forte banda de absorção na região vermelha do espectro fotomagnético. O Photodithazine[®] (PDZ), derivado de uma clorina e6, é extraído da cianobactéria *Spirulina platensis* - e apresenta alto rendimento quântico de formação de oxigênio singlete¹⁸. Em estudos preliminares in vivo, Carmello et al.¹² em 2015, demonstraram que a associação do PDZ (100 mg/L) e luz LED (aPDT) foi eficaz na inativação do fungo após uma aplicação da terapia, a qual reduziu 4,36 log₁₀ de *C. albicans* presente em lesões induzidas em língua de camundongo. A aPDT foi caracterizada como eficaz na inativação de *C. albicans* sem causar qualquer efeito nocivo sobre os tecidos do hospedeiro¹². Outro estudo conduzido por Carmello et al.¹¹ (2016) demonstrou a efetividade da aPDT mediada pelo PDZ no tratamento de candidose induzida em língua de camundongo. Neste estudo os autores observaram que aplicações sucessivas da aPDT e NIS promoveu redução de 3 e 3,2 logs₁₀, respectivamente, 24h após o tratamento. Os animais

submetidos a aPDT também apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto que os animais tratados com Nistatina apresentaram remissão parcial de lesões orais em ambos os períodos avaliados. Adicionalmente, a aPDT induziu a expressão de TNF- α quando comparado com o controle (sem FS e sem luz) 24 h e 7 dias após o tratamento¹¹.

Segundo a literatura, alguns estudos indicam que a aPDT pode diminuir a biomassa de biofilmes^{24,32}. Já foi mostrado que, embora biofilmes microbianos não tenham sido completamente inativados pela aPDT, esta ocasionou a remoção das camadas celulares mais externas dos biofilmes⁴⁸. Este mecanismo de ação sugere que sucessivas aplicações de aPDT podem tornar o biofilme mais susceptível às terapias antifúngicas convencionais. Porém, os efeitos que as aplicações de aPDT podem causar aos genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência de *C. albicans* ainda não foram avaliados.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para caracterizar os principais fatores de virulência responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento da infecção no hospedeiro. Entre elas, está a técnica de qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*) que vem sendo promissora para quantificação da expressão de genes envolvidos em determinado processo.

A técnica de PCR foi desenvolvida por Kary Mullis e co-autores na década de 80, descoberta que proporcionou à Kary Mullis o Prêmio Nobel em Química no ano de 1993⁴². RT-PCR é uma técnica de transcrição reversa em que RNA é transformado em cDNA. Esse cDNA pode ser utilizado para quantificação da transcrição de genes de interesse por método de PCR quantitativo (qPCR). Esta técnica tem sido muito utilizada na biologia molecular por sua eficácia, especificidade e fidelidade¹⁴ uma vez que quantifica e não apenas avalia qualitativamente a expressão gênica, o que faz do qPCR o método de escolha em biologia molecular. Entretanto, dentre os critérios que devem ser tomados para que o ensaio de qPCR seja adequadamente realizado, destaca-se a obtenção de um anelamento específico dos *primers*¹⁰. Os *primers* são sequências de ácidos nucléicos que agem como iniciadores da reação, tendo como característica ideal o anelamento em uma região única do DNA molde (do genoma) a ser estudado para que não haja reação cruzada com outras espécies ou outros genes da espécie em estudo.

Para isto, a reação de qPCR requer um par de *primers*, constituído por *Forward* (F) e o *Reverse* (R). Estes são um fator crítico e devem apresentar sequências específicas para que ocorra uma amplificação fidedigna do DNA alvo^{76,84}. A análise da especificidade dos *primers* para os genes a serem estudados é de extrema importância uma vez que sendo específicos, garantem especificidade e fidelidade a técnica. Para isso, *primers* com boas características são

essenciais para resultados confiáveis, fundamentados, e sensíveis à expressão gênica. Essa análise da especificidade dos *primers* muitas vezes é desconhecida, diminuindo assim a sensibilidade e fidelidade dos resultados⁸⁵. Em consequência da negligência dessa análise, os *primers* podem quantificar a expressão de outros genes que não são os do objetivo do estudo, além de outras espécies de microrganismos, alterando assim a viabilidade dos resultados, principalmente quando as amostras provêm de pacientes, nas quais podemos encontrar variações de uma mesma espécie.

Adicionalmente, os parâmetros a serem considerados para o desenho de um *primer* promissor para qPCR são: tamanho do *primer* (entre 18-24bp)^{10,80}; temperatura de anelamento (Tm) que devem estar entre 52-58°C¹⁰; ausência de estruturas secundárias (*hairpin*, *cross dimer*)^{67,80}; e porcentagem de pares de bases G (guanina) e C (citosina) entre 40-60%^{10,67}. Além da padronização dos *primers* para sua utilização em ensaios clínicos, avaliar a expressão fidedigna dos genes de virulência de micro-organismo responsável por infecção em pacientes submetidos a duas terapias distintas, uma convencional (Nistatina) e outra em estudo (aPDT), é de grande importância. A análise da expressão dos genes de virulência pode esclarecer os efeitos da terapia em estudo no tratamento das infecções fúngicas, tais como candidose oral, elucidando seus efeitos nos micro-organismos responsáveis pela infecção, como por exemplo a diminuição da virulência e redução da patogenicidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções causadas por espécies de *Candida*

Em 1994, Scully et al.⁷³, em uma revisão de literatura sobre a candidose oral afirmaram que espécies de *Candida* são comumente isoladas da cavidade oral, sendo *C. albicans* a mais prevalente. Outras espécies como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, embora menos frequentes, também foram isoladas da cavidade oral estando associadas a infecções. Segundo os autores estes fungos sofrem dimorfismo, podendo ser encontrados tanto na forma de levedura quanto na forma de hifas (exceto *C. glabrata*). Estes microrganismos vivem em relação de comensalismo na cavidade oral e são considerados patógenos oportunistas desenvolvendo infecção, principalmente, em pacientes imunocomprometidos. Um aspecto importante citado neste estudo é que a microbiota está associada diretamente com doenças sistêmicas, alterações hormonais dos pacientes, e o uso constante de medicações como corticosteroides e antibióticos, assim como em usuários de prótese e aqueles que possuem hábitos alimentares e/ou higiene oral deficiente. Nesta revisão também foram levantados estudos que analisaram os fatores que interferem na patogenicidade da *C. albicans*, sendo eles: as enzimas, como fosfolipases e proteinases; variações da temperatura; sua capacidade de adesão tanto nas células do hospedeiro, quanto em resinas acrílicas; e variações no pH. Os autores também demonstraram que, com o surgimento da síndrome da imunodeficiência humana (AIDS), pacientes foram severamente acometidos por essa infecção, emergindo a resistência antifúngica das espécies de *Candida*. Adicionalmente, foram relatados outros trabalhos que demonstraram os sinais clínicos comuns da candidose oral, assim como outras variações clínicas como a candidose eritematosa ou atrófica. Segundo esses trabalhos, o tratamento para candidose oral tem mostrado resultados transitórios uma vez que a medicação utilizada, principalmente do tipo azol, tem causado resistência a esses microrganismos, fazendo com que ocorram recidivas da infecção. Assim, os autores sugerem que com o aumento das infecções orais causadas por *Candida* spp. e da resistência que esses patógenos desenvolvem frente aos antifúngicos, novas terapias precisam ser investigadas para futuras aplicações.

Um estudo clínico comparando três diferentes tratamentos para estomatite protética foi realizado por Kulak et al.⁴³ (1994). Neste estudo os autores dividiram 45 pacientes em três grupos nos quais as lesões eram estudadas clinicamente e micologicamente. No primeiro,

pacientes foram tratados com 50 mg de fluconazol em tablete diariamente por duas semanas. O segundo grupo de pacientes foi orientado a fazer aplicações de solução de clorexidina a 2% na superfície da prótese duas vezes por dia em conjunto com a medicação de fluconazol por duas semanas. O terceiro grupo recebeu novas próteses sem nenhuma medicação. Amostras microbiológicas foram coletadas do palato através de *swabs* e espátula de metal antes dos tratamentos, posterior a finalização dos tratamentos e duas semanas após os tratamentos. Eles encontraram que 87% do primeiro grupo responderam positivamente ao tratamento, 40% foram curados e 47% tiveram melhora no quadro fúngico com redução clínica da inflamação. 87% dos pacientes do segundo grupo também demonstraram resposta positiva ao tratamento, nos quais 54% foram curados enquanto que 33% tiveram melhora. Este grupo também demonstrou melhora clínica da inflamação. Do terceiro grupo, 33% tiveram uma pequena melhora, onde 13% foi curado e 20% tiveram a redução da inflamação, no entanto, sem cura, além de não apresentar melhora significativa clinicamente. Em controle posterior, os autores observaram reicidiva das lesões, relatando que a incidência da recorrência da infecção após a medicação apenas do fluconazol foi maior do que a recorrência naqueles tratados com fluconazol e clorexidina. Este último tratamento, com associação de um antifúngico e de um antimicrobiano de amplo espectro, resultou em eliminação total de hifas nas coletas microbiológicas, mesmo que ainda houvessem blastoporos na maioria das amostras coletadas dos palatos (vistos através de microscopia). Os autores então concluíram que o tratamento realizado com fluconazol associado a clorexidina apresentou melhor resultado no quadro da infecção fúngica e ainda propuseram que este tratamento resultaria em cura mais permanente da candidose oral.

Segundo McCullough et al.⁵¹, em uma revisão de literatura em 1996, *C. albicans* foi caracterizada por ser uma levedura diploide, que sofre dimorfismo, e tem sido frequente em hospedeiros imunocomprometidos, em especial, naqueles pacientes em idade avançada, que apresentam alguma infecção ou que estão sob terapia imunossupressora. Nesta revisão, os autores descreveram a história, a taxonomia e a epidemiologia deste importante fungo bem como algumas características que podem estar relacionados à sua virulência. Segundo eles, os três fatores de virulência mais estudados na época da publicação foram: fatores relacionados à adesão celular, a parece celular e a produção de enzimas proteolíticas extracelulares. Alguns métodos fenotípicos de diferenciação de cepas como sorotipagem, morfotipagem e métodos genéticos também foram discutidos como mais relevantes naquela época para estudos de virulência.

White et al.⁸², em 1998, delinearão o conhecimento sobre os fatores clínicos, celulares e moleculares que contribuem para resistência fúngica frente aos medicamentos. Segundo os autores, a literatura demonstrou que a resistência fúngica varia conforme a droga avaliada. Um exemplo de mecanismo de ação de um dos medicamentos, os agentes azóis, que podem contribuir para a resistência fúngica dos microrganismos, é a inibição da biossíntese do ergosterol por esses medicamentos, alterando a função de enzimas e a integridade da membrana citoplasmática. Com essa alteração, os microrganismos resistentes apresentam mutações genéticas nas enzimas alvo do medicamento (envolvidas na formação do ergosterol) diminuindo assim a concentração intracelular da droga. Os autores também afirmam que o efeito fungistático do medicamento, a dose de aplicação, a farmacocinética (absorção, distribuição e metabolismo da droga) e as interações medicamentosas são parâmetros que podem influenciar no surgimento de resistência dos microrganismos aos antifúngicos, além de fatores inerentes aos indivíduos como a imunidade, o local e severidade da infecção e a presença de fatores de risco, como as próteses. Embora muitos fatores que contribuem para a resistência foram identificados pelos autores, há apenas informações rudimentares sobre o mecanismo pelo qual esses fatores contribuem para a resistência aos medicamentos. Os autores concluíram que o avanço do conhecimento da resistência fúngica pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para o diagnóstico e tratamento das infecções, visto que novas drogas existentes podiam continuar gerando mecanismos diferentes de resistência fúngica.

Uma revisão sobre a candidose oral foi realizada no ano de 2001 pelos autores Akpan e Morgan¹. Segundo os autores, a candidose oral é a infecção mais comum entre os humanos e, quando esta não é tratada, pode levar a má nutrição e infecção generalizada. Adicionalmente, os autores classificaram a candidose como: candidíase aguda, entre elas a pseudomembranosa e a eritematosa; candidíase crônica, que são as hiperplásicas, as induzidas por próteses totais (eritematosa) e a glossite rombóide mediana; e por último, ainda classificam a quielite angular. Ainda nesta revisão, os autores citaram alguns artigos que estudaram a patogenicidade das espécies de *Candida*, ressaltando que quanto mais patogênico o fungo, maior a capacidade de infecção do mesmo. Ainda ressaltaram que fatores locais e sistêmicos, como próteses, mal funcionamento das glândulas salivares, câncer oral, diabetes, fumo, idade, imunossupressão, antibióticos e deficiências nutricionais podem acarretar no aparecimento da candidose. Planejar o tratamento dos acometidos pela candidose oral (conhecendo a história do paciente, sua história médica e bucal e preservar tratamento

antifúngico adequado) podem garantir bom prognóstico. Os autores finalizaram a revisão relatando que o diagnóstico é geralmente realizado clinicamente e testes laboratoriais podem ser feitos para excluir outras lesões em potencial, além de enaltecer a importância da eliminação de fatores predisponentes à essa infecção, além de boa higiene oral, para impedir o surgimento da infecção.

No mesmo ano citado acima, Chandra et al.¹⁵ (2001), avaliaram a formação de biofilmes sobre dois substratos. O primeiro consistia em corpos de prova de metilmetacrilato e o segundo, por sua vez, de silicone. Duas espécies diferentes tiveram a formação do biofilme avaliada: *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. A metodologia aplicada consistiu na utilização de cepas padrão e isolados clínicos que foram inoculados separadamente nos corpos de prova. Os autores utilizaram técnicas para verificação do número de células pela redução de tetrazolium e pelo peso seco. A atividade metabólica foi analisada por meio de fluoróforos e microscopia confocal a laser. Outro teste realizado foi a avaliação da susceptibilidade dos microrganismos a fluconazol, anfotericina B, nistatina e clorexidina em diferentes concentrações (0,5 a 256 mg/mL). Observou-se neste estudo que as leveduras, após a adesão, são transformadas em comunidades celulares complexas e bem estruturadas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos. Essa organização leva o nome de biofilme, o qual estabelece uma barreira de proteção eficaz contra a terapia com antifúngicos. Com a metodologia do microscópio de fluorescência e confocal de varredura a laser, os autores mostraram que os biofilmes de *C. albicans* são heterogêneos, formados por elementos celulares e não celulares. Em ambos os modelos de formação, a medida que ocorria a maturação do biofilme, a resistência fúngica das células aumentava. Ao oposto da espécie de *C. albicans*, *S. cerevisiae* não apresentou capacidade de formar biofilme maduro, no entanto, também se aderiu às superfícies protéticas. Segundo os autores, com este estudo foi possível observar a existência de três fases distintas da formação do biofilme, estas fases de crescimento transformam blasporos aderentes em comunidades bem organizadas e envoltas por uma matriz extracelular (biofilme). Segundo os autores este estudo descreveu a base da investigação dos mecanismos moleculares da formação do biofilme de *Candida albicans*, bem como sua biologia e resistência fúngica, promovendo conhecimento para o desenvolvimento de novas terapias para infecções provocadas por biofilme.

Ramage et al.⁶⁹, em 2005, realizaram uma revisão de literatura analisando a capacidade de formação de biofilmes. Segundo os autores, a capacidade de *C. albicans* causar infecção está intimamente associada a sua capacidade de formação do biofilme, o qual é um

fator de virulência determinante para a candidíase. A conformação do biofilme, incluindo as atividades celulares, resulta em resistência destes fungos a drogas antifúngicas e promove proteção contra as defesas do hospedeiro, o que repercute em manifestações clínicas importantes. Estudos envolvendo ensaios moleculares sobre a formação de biofilme começaram a lançar luz sobre o entendimento do biofilme, incluindo o mecanismo de *quorum sensing* o qual pode ser, no futuro, uma importante via para estratégias terapêuticas. Os autores ainda citaram alguns estudos relevantes sobre a aplicação da técnica de “*DNA microarrays*” e de tecnologias com técnicas proteômicas para detalhar e facilitar a análise do biofilme. Eles ainda sugerem que estudos futuros com biofilmes devem focar mais em pesquisas in vivo com biofilmes mistos (bactérias-fungos) bem como na determinação da capacidade de formação de biofilme de outras espécies de *Candida*, além de possíveis investigações de novos materiais e estratégias preventivas que possam ser empregadas para inibir a formação de biofilme.

Em relação à formação de biofilme, Finkel e Mitchell²⁸, em 2011 fizeram uma revisão de literatura para estudar o desenvolvimento de biofilme pelas espécies de *Candida*, em especial de *C. albicans*, que é o fungo patogênico mais frequentemente isolado. Neste artigo, os autores constataram que, na grande maioria dos casos, infecções causadas pelas espécies de *Candida* são resultados da sua capacidade de formar biofilmes, principalmente em superfícies abióticas implantadas. Nesta revisão, os autores discorreram sobre estudos que identificaram genes que participam diretamente do desenvolvimento do biofilme por *C. albicans*, bem como o circuito regulatório e a rede que controla a atividade e a expressão gênica da formação do biofilme. Os autores citam que ambas as morfologias de *C. albicans*, levedura e hifa, tem um papel único e crucial no processo de formação do biofilme. Ainda nesta revisão descrevem as fases da formação do biofilme: adesão de *C. albicans* em forma de levedura ao substrato (fase de adesão); proliferação celular e produção de projeções alongadas que são as formas filamentosas de *C. albicans*, incluindo hifas e pseudohifas (fase de iniciação); formação de matriz extracelular, fazendo com que o biofilme adquira resistência medicamentosa (fase de maturação); e, por último, células que se desprendem do biofilme e são dispersas para o meio (fase de dispersão celular). Segundo os autores, tem sido descobertos novos mecanismos e sinais que norteiam o desenvolvimento da formação do biofilme e sua associação com as drogas resistentes. Além disso, foi ressaltada a importância dos genes envolvidos nas diferentes fases da formação do biofilme, gerando maior patogenicidade do microrganismo e consequente resistência fúngica. Entre outros genes citados no estudo estão os de interesse:

EFG1; ALS1 e ALS3 que codificam proteínas de adesão expressas na fase de iniciação; e HWP1, que codifica uma proteína da parede celular expressa na fase de iniciação e quando há a formação de hifas. Os sinais que influenciam a expressão gênica na formação do biofilme ainda não são bem compreendidos. Os autores concluíram que embora muitos genes já tenham sido estudados, ainda há uma lacuna muito grande no entendimento das vias de expressão gênica, o que representa uma oportunidade para estudos futuros.

Uma revisão de literatura foi realizada em 2013 por Sardi, et al.⁷² com o objetivo de discorrer sobre a epidemiologia, a patogenicidade, a formação de biofilme, os antifúngicos naturais e as novas estratégias antifúngicas nas infecções causadas pelas espécies de *Candida*. Eles ressaltam que a incidência das infecções fúngicas causadas pelas espécies de *Candida*, tem aumentado significativamente, contribuindo para a morbidade e mortalidade em pacientes com tal infecção. Os autores justificam essa maior incidência pelo aumento da resistência microbiana e o número restrito de drogas antifúngicas, as quais apresentam grandes efeitos colaterais. Ainda ressaltam que as espécies de *Candida* são os fungos mais patogênicos e que causam infecções tanto na mucosa quanto infecções sistêmicas. De acordo com os estudos revisados pelos autores, as infecções associadas a esse patógeno estão relacionadas a sua capacidade de formar biofilme, o qual pode ser caracterizado como comunidades altamente organizadas, envoltos a uma matriz extracelular. Tal organização está associada com a alta resistência antimicrobiana das espécies de *Candida*. A capacidade deste fungo em criar resistência é um importante fator para as doenças nos humanos. Diante desses problemas, tem aumentado o número dos estudos com produtos naturais individualmente ou associados a outras terapias. Além disso, os autores elencam outras estratégias alternativas e promissoras para contornar tal situação, como por exemplo, o uso de nanopartículas, anticorpos e, mais recentemente, inativação fotodinâmica para o tratamento de infecções fúngicas, a qual tem sido muito estudada devido seu potencial terapêutico promissor. Os autores também concluem que existe ainda a necessidade de procurar novos produtos com habilidades antifúngicas efetivas, devido aos efeitos colaterais adversos de medicamentos existentes, aumento de cepas resistentes a agentes antifúngicos convencionais e formação de biofilmes em implantes médicos e tecidos.

Em 2013, Mayer et al.⁵⁰, descreveram uma revisão sobre os mecanismos de patogenicidade de *C. albicans*. Os autores ressaltam neste estudo que a espécie *C. albicans* vive em comensalismo na microbiota humana. No entanto, em determinadas circunstâncias, como em pacientes idosos e usuários de próteses, esse fungo pode causar infecções que

variam desde infecções superficiais até infecções sistêmicas, ocasionando risco de morte. Tanto para as infecções superficiais quanto para infecções sistêmicas, o fungo *C. albicans* depende de uma série de fatores de virulência e atividade celular que contribuem para sua patogenicidade. Entre eles estão: moléculas de adesão que favorece a invasão do fungo nas células hospedeiras; a secreção das hidrolases; a transição de levedura para hifa; a detecção de contato e o tigmotropismo (crescimento do fungo envolto a um suporte após estímulos ambientais); a formação de biofilme; a mudança fenotípica e uma gama de atributos de atividade celular. Neste estudo os autores concluíram que compreender os mecanismos da infecção e patogenicidade de *C. albicans* é crucial para diagnóstico e desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, ressaltando que o entendimento das vias dos fatores de virulência deve ser o alvo para estudos futuros de tratamentos alternativos.

2.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Uma revisão crítica da literatura sobre a Terapia Fotodinâmica (PDT) foi realizada por Konopka e Goslink⁴¹, 2007. Nesta revisão, foram citadas outras denominações desta terapia: fotorradiação, fototerapia, ou photoquímico – terapia. Com este estudo, os autores afirmaram que o mecanismo de ação da PDT consiste na utilização de luz (em um comprimento de onda adequado) para ativar um agente fotossensibilizador na presença de oxigênio. A transferência de energia do fotossensibilizador ativo, juntamente com o oxigênio disponível, gera a formação de espécies tóxicas de oxigênio, entre eles o oxigênio singlete e radicais livres. Estas espécies reativas de oxigênio afetam a estrutura dos lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares. Ainda, os autores discutiram sobre o grande crescimento de aplicações da PDT na odontologia principalmente no tratamento do câncer oral, na inativação bacteriana e fúngica, e na utilização da terapia fotodinâmica para diagnóstico (PDD) da malignização das lesões orais. Ainda citou que o uso da PDT no tratamento da leucoplasia oral, líquen plano e câncer de cabeça e pescoço apresentou resultados satisfatórios. Dentre os benefícios e os malefícios, os autores citaram as seguintes vantagens do uso dessa técnica: não invasiva e não inconveniente para o paciente; trata seletivamente a área afetada; se não curar totalmente a lesão, pode melhorar a qualidade de vida do paciente bem como prolongar sua sobrevivência; possui efeitos colaterais moderados; e pode apresentar excelentes resultados cosméticos não deixando nenhuma cicatriz. O autor ainda citou outra modalidade da PDT: a Quimioterapia Antimicrobiana Fotodinâmica (PACT) a qual, utilizando fotossensibilizadores

diferentes da PDT, tem se mostrado mais eficaz no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias e virais mais superficiais, como infecções orais. Segundo os autores a PDT não causou efeitos genotóxicos e mutagênicos às células, tornando-a mais segura para um tratamento em longo prazo. Outro importante ponto positivo foi a utilização da PDT como uma nova abordagem terapêutica: no tratamento de biofilmes orais. A ruptura da placa, a qual estrutura o biofilme, traz consequências importantes para a homeostase do mesmo. Os autores ainda observaram que novos estudos tem que ser realizados para analisar se essa terapia atinge a microbiota natural, e concluem que a cavidade oral é uma área adequada para o uso dessa técnica, uma vez que é relativamente acessível à iluminação.

Em 2008, Donnelly et al.²² realizaram uma avaliação na literatura sobre aplicações antifúngicas da Quimioterapia Fotodinâmica Antimicrobiana (PACT). Esses autores caracterizaram a PACT, uma combinação de um fotossensibilizador com uma luz visível, a qual faz uma destruição seletiva de células microbianas. Eles ainda ressaltaram que, embora a combinações de luz a de drogas para inativar microrganismos tem sido conhecido há mais de 100 anos, só no ano de 2007 se iniciou a busca por tratamentos alternativos para patógenos resistentes a antibióticos. Nesta revisão, os autores citaram vários artigos que demonstraram, através de estudos in vitro, que esta terapia tem sido muito eficaz contra vírus, protozoários, fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Eles também uniram resultados de estudos experimentais que concluíram que tanto dermatomicetes e leveduras podem ser eficientemente inativadas por esta terapia quando utilizados os fotossensibilizadores “*fenotiazínicos*”, “*porfirinas*”, e “*ftalocianina*”. Um importante fator analisado nesta revisão é que não existem relatos que demonstrem que essa terapia cause resistência fúngica e alteração genotóxica e mutação das células humanas e fúngicas. Os autores concluíram que, apesar do êxito das investigações de estudos in vitro, mais estudos in vivo (tanto em animais quanto em pacientes) são necessários, pois apenas uma pequena quantidade desses estudos foi realizada.

Em um estudo realizado em 2010, Mima et al.⁵³ avaliaram a inativação de *C. albicans* em candidose induzida em camundongos por meio aPDT utilizando uma hematoporfirina, Photogem®, como FS. Neste estudo os autores utilizaram dois tipos de luz LED, uma azul (455 nm) e outro vermelho (630 nm). Desta maneira, 71 camundongos fêmeas (~6 semanas de idade) foram imunossuprimidos com prednisolona 100 mg/kg. Tetraciclina foi diluída na água de beber dos animais para que os mesmos não desenvolvessem outra infecção além da candidose oral. Para a indução da lesão, foi inoculada uma suspensão padronizada de cepa

padrão de *C. albicans* no dorso da língua dos animais (sedados com clorpromazina) por meio de *swabs* previamente embebidos na suspensão fúngica. Quatro dias após a inoculação, a lesão estava instalada, então os animais foram divididos em 6 grupos com 5 animais cada. O FS foi aplicado no dorso da língua dos animais nas concentrações de 400, 500 ou 1000 mg/L, sendo que os mesmos ficaram mantidos no escuro por 30 minutos, caracterizando o tempo de pré-irradiação. Após, iluminou-se a língua dos camundongos com luz LED [455nm ou 630nm (305 J/cm²)] durante 20 minutos. O efeito do FS ou da luz isoladamente também foram avaliados, sendo que o controle positivo não recebeu nenhum tratamento: apenas foi inoculado com *C. albicans*. O grupo controle negativo não recebeu nenhum tratamento e nem inoculação de *Candida*. Após os tratamentos, foi realizada a coleta das leveduras por meio de *swabs* estéreis por 1 minuto. Foi realizada diluição seriada, a qual foi plaqueada em meio de cultura. Após as placas serem incubadas a 37°C por 48 horas, o número de células viáveis foi obtido por meio de contagem de colônias. As línguas foram removidas para avaliação histológica após os animais terem sido sacrificados. Os autores observaram que a aPDT reduziu o número de colônias de *C. albicans* em 1,59 log₁₀ em comparação ao grupo controle positivo. Não houve diferença significativa entre as concentrações do FS e os comprimentos de onda utilizados (455 e 630 nm), porém a luz vermelha demonstrou maior penetração na língua. Através da avaliação histológica, observou-se que a aPDT não causou alterações adversas no tecido epitelial e conjuntivo da língua dos animais. Com este estudo, os autores concluíram que a aPDT promoveu redução significativa na viabilidade do biofilme de *C. albicans* sem causar dano tecidual à língua dos animais.

Com o objetivo de avaliar a eficácia da aPDT na inativação de diferentes espécies de *Candida* em prótese total superior, caracterizando um método de desinfecção, Mima et al.⁵⁴ realizaram um estudo in vitro em 2011. Cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* foram testadas. Foram fabricadas 34 próteses e submetidas à esterilização por óxido de etileno. As próteses foram inoculadas individualmente com uma das cepas e foram incubadas a 37°C durante 24h. As próteses submetidas a aPDT (F+/L+) foram tratadas individualmente com 50 mg/L do fotossensibilizador Photogem (PS) e, após 30 minutos, foram iluminadas por uma luz LED por 26 minutos (37,5 J/cm²). Foram avaliados outros grupos experimentais: próteses tratadas apenas com FS (F+/L-) ou luz (F-/L+) ou nenhum tratamento (F-/L-). As amostras foram diluídas e plaqueadas em meio de cultura. Após 48 horas de incubação a 37°C, as colônias foram contadas, e os valores de log (UFC/mL) foram analisados por testes estatísticos. Os autores notaram que a aPDT

proporcionou uma redução significativa ($p < 0,05$) dos valores de log (UFC/mL) em todas as próteses incubadas com as diferentes espécies de *Candida*, quando comparado com grupo F-L-. *C. tropicalis* apresentou a maior redução de log (UFC/mL) ($3,99 \log_{10}$) após a aPDT, seguida de *C. krusei*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* (2,67; 2,29; 2,17; e 1,73 \log_{10} , respectivamente). Diante desses resultados, os autores concluíram que a aPDT é um método eficaz para reduzir as espécies de *Candida* em próteses totais superiores.

Com base nos resultados acima descritos, Mima et al.⁵⁵ em 2012 avaliaram clinicamente a efetividade da aPDT, associando Photogem® com LED, no tratamento da estomatite protética comparada com o antifúngico tópico nistatina. No estudo, 20 pacientes foram submetidos a 6 sessões de aPDT, sendo 3 sessões por semana durante 15 dias. A aPDT foi aplicada tanto no tecido infectado (palato), como também nas próteses dentais dos pacientes. A nistatina foi prescrita aos pacientes 4 vezes ($n=20$) ao dia durante 15 dias. Para a avaliação do tratamento, foram realizadas culturas microbiológicas para contagem de *Candida* spp., além da tomada de fotografias intra-orais, antes e depois do término do tratamento, bem como durante o período de acompanhamento de 30, 60 e 90 dias. Os resultados demonstraram redução no número de colônias viáveis de *Candida* spp. após o término do tratamento e redução dos sinais de inflamação do palato, sendo que a aPDT foi tão efetiva quanto à aplicação do antifúngico tópico no tratamento da estomatite protética, uma vez que a razão de sucesso clínico foi de 45% e de 53% para a aPDT e a Nistatina, respectivamente. Os resultados obtidos nesse estudo reforçaram o potencial da aplicação da aPDT para o tratamento da estomatite protética, porém, com a necessidade da investigação de FSs mais efetivos.

Dovigo et al.²³, em 2013, realizaram um estudo para avaliar o efeito da aPDT, associada ao fotossensibilizador Photodithazine® na inativação de *Candida* spp. de 15 isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. A sobrevivência das células em suspensão foi avaliada pelo teste de população (UFC/ml). Os efeitos antifúngicos da aPDT nos biofilmes foram avaliados por UFC/ml e ensaio metabólico (XTT). Os autores mostraram que a aPDT promoveu redução significativa na viabilidade de suspensões celulares de *C. tropicalis* e *C. glabrata* enquanto cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a aPDT. Quando analisado o biofilme, a maior redução do UFC/mL demonstrada pelos autores foi de 0,9 \log_{10} para *C. albicans*, 1,4 \log_{10} para *C. tropicalis* e 1,5 \log_{10} para *C. glabrata*. A redução do metabolismo do biofilme para *C. albicans* foi de 62,1% enquanto para *C. tropicalis* e *C. glabrata* foi equivalente a 76 e 76,9%, respectivamente. Os autores

concluíram a aPDT associada ao PDZ causou redução significativa na viabilidade dos isolados das espécies de *Candida*.

Quishida et al.⁶⁸ em 2015 avaliaram a eficácia de sucessivas aplicações de aPDT mediada por Photodithazine® (PDZ) e luz LED na inativação de biofilmes multi-espécies formados por *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. mutans* em resina acrílica para base de prótese. Foram realizadas suspensões das cepas padrão das espécies e estas foram inoculadas sobre os corpos de prova de resina acrílica, seguido de incubação durante 48h a 37°C/75 rpm para formação do biofilme. Após a formação do biofilme, a aPDT foi realizada. Foi administrado o fotossensibilizador PDZ (175 e 200 mg/L) e estes foram deixados no escuro (período de pré irradiação) durante 20 minutos e posteriormente, as amostras foram expostas a uma luz LED a 37,5 J/cm² (660 nm), durante 9 minutos. As amostras também foram tratadas apenas com PDZ ou apenas com a luz. Amostras controle não foram tratadas nem submetidas à luz ou PDZ. As condições descritas foram aplicadas uma vez ou em três aplicações consecutivas para todos os grupos. A viabilidade celular foi determinada por UFC/ml, atividade metabólica pelo teste de XTT, quantificação da biomassa total e microscopia confocal de varredura a laser. Os resultados obtidos demonstraram que três aplicações da aPDT resultou na redução da viabilidade celular, do metabolismo celular (XTT) e da biomassa dos biofilmes. Este efeito também foi observado nas imagens da microscopia confocal de varredura após três aplicações da Terapia. Em conclusão, os autores afirmaram uma maior redução da viabilidade celular e biomassa total de biofilme multi-espécies formados em resina acrílica, após três aplicações de aPDT mediada pelo PDZ e luz LED quando comparados com apenas uma aplicação.

Em 2015, Carmello et al.¹², realizaram um estudo descrevendo a fotoinativação de *C. albicans* em um modelo murino de candidíase oral, mediada por Photodithazine® (PDZ) associado a luz LED. Os camundongos foram imunossuprimidos e inoculados com *C. albicans* para indução de candidose oral. Após cinco dias da imunossupressão, foi realizada uma aplicação de PDZ nas concentrações de 75, 100, 125 e 150 mg/L sobre a língua dos animais e estes foram submetidos a luz. Após o tratamento, *C. albicans* foi recuperada da língua dos animais por meio de *swabs* estéreis e foi realizada avaliação microbiológica para quantificação da população microbiana (UFC/ml). Após 24 h de tratamento, os animais foram sacrificados e as línguas foram cirurgicamente removidas para análise histológica. De acordo com resultados a associação de PDZ (100 mg/L) e luz LED (aPDT) reduziu 4,36log₁₀ de *C. albicans* presente em lesões induzidas em língua de camundongo, sendo eficaz na inativação de *C. albicans* sem causar qualquer efeito nocivo sobre os tecidos do hospedeiro.

Carmello et al.¹¹ em 2016, avaliaram a eficácia da aPDT no tratamento de candidíase oral em um modelo murino utilizando Photodithazine (PDZ) com o objetivo de simular um tratamento com aplicações sucessivas da terapia. Os autores desenvolveram um modelo de indução de candidíase oral para permitir melhor controle da infecção e o estabelecimento do tratamento. Camundongos fêmeas de seis semanas de idade foram imunossuprimidos e a espécie *C. albicans* foi inoculada para induzir candidíase oral. Os tratamentos (aPDT mediada por PDZ e luz LED e Nistatina), foram realizados durante 5 dias consecutivos, sendo uma aplicação por dia. Após o término do tratamento, foi realizado um esfregaço das línguas dos camundongos para recuperação das células de *C. albicans* e a avaliação macroscópica das lesões. Colônias viáveis foram quantificadas e o número de UFC/ml determinado. Um grupo de animais foi sacrificado 24 horas após o tratamento e o outro grupo após 7 dias do tratamento para que as línguas fossem cirurgicamente removidas para análise histológica e análise da expressão de citocinas inflamatórias (IL-1, TNF- α e IL-6) por RT-qPCR. Os autores concluíram que a aPDT foi tão eficaz quanto Nistatina na inativação de *C. albicans*, reduzindo 3 e 3,2 logs₁₀ respectivamente, 24 h após o tratamento. Os animais submetidos a aPDT também apresentaram remissão completa das lesões orais, enquanto que os animais tratados com Nistatina apresentaram remissão parcial de lesões orais em ambos os períodos avaliados. A avaliação histológica revelou discreto infiltrado inflamatório nos grupos tratados com aPDT e Nistatina em ambos os períodos avaliados. A aPDT induziu a expressão de TNF- α quando comparado com o controle (sem FS e sem luz) 24 h e 7 dias após o tratamento. Em suma, os autores demonstraram que o modelo murino utilizado neste estudo foi capaz de imitar a infecção por *C. albicans*, bem como a aPDT foi eficaz para o tratamento dos camundongos com candidíase oral.

Com o objetivo de discutir sobre a efetividade da PDT na odontologia, Prazmo, et al.⁶⁶, em 2016, fizeram uma revisão de literatura a respeito desse tema. Segundo os autores, o professor Herman Von Tappeiner, usou o termo “ação fotodinâmica” em 1904 para descrever interações entre substâncias químicas específicas, oxigênio e luz. Mas a terapia (PDT), em si, surgiu mais tarde com o físico Friedrich Meyer-Betz, com o primeiro experimento realizado na área da dermatologia. A partir dessa época, os autores afirmam que o uso da PDT tem aumentado cada vez mais, inclusive na Odontologia. Em suma os autores descrevem a ação da PDT como: administração de um fotossensibilizador (FS) e consequente fotossensibilização das células; luz irradiada; e reações fotoquímicas que destroem seletivamente as células. Neste estudo, os autores ressaltam que a irradiação da luz resulta na

transição do FS em seu estado de baixa energia a um estado de excitação, o estado singlete, este pode se transformar em um estado triplete. O estado triplete por sua vez, pode sofrer dois tipos de reações: a de tipo I, em que o FS ativo reage diretamente com uma molécula do substrato, como por exemplo, a membrana celular, onde um elétron ou hidrogênio é removido da molécula para formar radicais livres. Posteriormente, estes radicais livres reagem com o oxigênio produzindo espécies altamente reativas, entre elas: superóxido, radicais hidroxila e oxigênio singlete. Na reação tipo II, o fotossensibilizador excitado interage diretamente com o oxigênio para formar produtos oxigenados. Estes dois tipos de reações são totalmente dependentes da tensão do oxigênio e da concentração do FS. Os autores ainda citam que existem diferentes tipos de luz aplicadas na PDT: uma fonte de luz não coerente, usada no passado; luz por filamento de tungstênio, de iodetos metálicos e lâmpadas fluorescentes (listadas como luz não-laser); e luz laser. O terceiro elemento da PDT também foi citado, os fotossensibilizadores (FSs). Segundo os autores, existe grande variedade de FSs que estão divididos em grandes grupos que diferem na estrutura química e origem: corantes fenotiazinas (azul de metileno, azul de toluidina); corantes de ftalocianina de alumínio (dissulfonato alumínio ftalocianina, ftalocianina de zinco catiônica, naftalocianina); porfirinas (Photofrin, ALA-ácido 5-aminolevulínico, precursor do fotossensibilizador Protoporfirina IX); clorinas [Temoporfina (Foscan®)], clorina e6; xantinas (Eritrosina), e monoterpênos (azulene). Os primeiros fotossensibilizantes, incluindo as porfirinas, foram descobertos há 40 anos e são chamados de fotossensibilizadores de primeira geração. A segunda geração é mais eficaz na geração de oxigênio singlete, se refere às porfirinas derivadas e aos FSs sintéticos. Ainda, hoje existe a terceira geração de FS, na qual os FS foram modificados e conjugados com anticorpos ou proteína/receptor, que ajuda a aumentar a seletividade do FS em relação aos tecidos tumorais, reduzindo a localização em células saudáveis e aumentando a afinidade para células tumorais. Os autores ressaltam que as maiores utilizações da PDT na odontologia são: na terapia contra o câncer; terapia periodontal; terapia endodôntica; estomatite e candidose oral. Eles ainda concluem que há muitos estudos *in vitro* sobre o tratamento de candidose com PDT, no entanto, são necessários mais estudos *in vivo* para trazer mais dados sobre sua eficácia como antifúngico.

2.3 Técnica de qPCR e delineamento de *primers*

Em 1993, com o objetivo de elucidar os componentes essenciais para resultados mais eficazes da técnica de PCR, Cha e Tilly¹⁴ discutiram a influência de cada componente na especificidade, eficiência e fidelidade da técnica. Segundo os autores, o PCR é uma técnica *in vitro* utilizada para amplificação rápida de um fragmento específico de DNA e, segundo eles, é uma técnica perfeita quando se obtém resultados com alta especificidade, rendimento (eficiência), e fidelidade. Essas características são influenciadas pela sequência alvo, bem como por cada um dos componentes de PCR. Neste estudo, além dos autores ressaltarem a importância de manter os parâmetros adequados, afirmaram que estudos previamente realizados indicaram três parâmetros essenciais que influenciam o PCR: as condições tampões; as características dos ciclos do PCR (temperatura de anelamento, duração de cada passo, entre outros); e a enzima DNA polimerase, e estas devem ser atentamente avaliadas e planejadas anteriormente a realização da técnica.

Os autores Bustin¹⁰ e Thornton e Basu⁸⁰, em 2004 e 2011, respectivamente, discutiram sobre as características ideais que os *primers* devem apresentar para serem utilizados na técnica de qPCR. Estas características estão descritas a seguir:

- Primer Length: O tamanho do *primer* tem que ser grande o suficiente para uma especificidade adequada e curto o suficiente para se ligar facilmente ao DNA do gene alvo. Geralmente o tamanho mais aceito é entre 18 e 24 pares de base^{10,80}.

- PCR product size: O tamanho do produto de PCR, também chamado de amplicon¹⁰, deve estar entre 80 e 150 pares de base⁸⁰. Essa característica é importante pois a reação de polimerização depende do tamanho do produto.

- Primer Melting Temperature (T_m): A temperatura de fusão é um importante parâmetro para a estabilidade da interação entre o *primer* e seu alvo¹⁰. Os *primers* com T_m entre 52-58°C produzem melhores resultados⁶⁷, sendo que a T_m do *Forward* deve ser próxima da temperatura do *Reverse*.

- GC Content (GC%): A porcentagem de G e C no *primer* em relação ao total de bases nitrogenadas deve estar próxima a 50%^{10,67}. As bases G e C apresentam ligações de pontes de hidrogênio mais fortes, aumentando a eficiência da ligação. No entanto, se esta porcentagem

for maior que 50%, não apresenta uma boa desnaturação, pois necessitam de uma temperatura alta, propiciando uma reação menos eficiente¹⁰.

- GC Clamp: Se refere ao máximo de ΔG das últimas 5 bases nitrogenadas no sentido 3' do *primer*^{67,80}. Apresentar 1 a 2 CG Clamps é ideal pois permite que o *primer* tenha uma ligação forte a fita alvo, tornando-o mais específico⁸⁰.

- Primer Secondary Structures: Estruturas secundárias são produzidas por interações intermoleculares ou intramoleculares⁶⁷. A presença delas nos *primers* pode conduzir a um produto não específico, pois o *primer* pode se ligar a ele mesmo (interação intramolecular, como por exemplo, os *hairpins*) ou ligar-se ao outro *primer* (interação intermolecular, como por exemplo, os *self dimers* e os *cross dimers*). Essas estruturas devem ser evitadas^{67,80}.

As técnicas de PCR e qPCR, quando consideras as características descritas previamente, são técnicas muito eficazes na biologia molecular. O objetivo principal de qPCR quando RNA foi convertido em cDNA pela enzima transcriptase reversa (também chamado de RT-qPCR) é analisar a expressão gênica em amostras. Essa análise é importante para que mecanismos celulares sejam melhor elucidados.

Em 2006, Nolan et al.⁶³, realizaram um estudo no qual resultou em um artigo na forma de protocolo. Neste estudo, os autores afirmam que a Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-qPCR) aborda os requisitos para uma análise de dados quantitativa em medicina molecular, biotecnologia, microbiologia e diagnóstico tornando-se o método de escolha para a quantificação de RNA mensageiro (mRNA). Embora seja frequentemente descrito na literatura como um padrão ouro, neste ano ainda não era considerado um ensaio padrão. Os problemas mais significativos são causados pela variabilidade dos *templates* de RNA, análise de desenhos e protocolos, bem como a normalização inadequada dos dados e análises inconsistentes. Como um primeiro passo para a padronização, os autores descrevem protocolos para a realização da técnica de RT-qPCR que ilustram as etapas essenciais necessárias para gerar dados confiáveis e reprodutíveis. Os autores ainda enfatizam que os dados desta técnica são apenas informações instantâneas sobre a quantidade de uma transcrição em determinada célula ou tecido.

Com o objetivo de ressaltar a importância do desenho de *primers* específicos para a técnica de PCR e qPCR, Ye et al.⁸⁴, em 2012, realizaram um estudo afirmando que a escolha adequada dos *primers* é provavelmente o fator mais importante a se considerar nestas técnicas

de PCR, pois a amplificação específica do gene alvo garante resultados reais. Os autores ainda citaram que existem duas etapas para a escolha dos *primers*: primeiro, a escolha de regiões dos genes de interesse; e segundo, a pesquisa destas áreas contra um banco de dados com sequência de nucleotídeos para analisar homologias. Neste estudo, os autores enfatizam o uso de uma ferramenta chamada *Primer-BLAST* para desenho de *primers*, percorrendo sua forma de utilização.

2.4 Expressão Gênica dos Fatores de Virulência de *C. albicans*

Gilfillan et al.³⁰, em 1998 realizaram um estudo para discorrer sobre a espécie *C. dubliniensis*. Neste estudo, os autores afirmaram que *C. dubliensis* foi uma espécie identificada em pacientes com HIV que apresentavam candidose oral. Eles ressaltaram que as espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis* dividem muitas características fenotípicas e filogenéticas muito próximas. Dessa forma, a relação filogenética de ambas as espécies e a comparação de fatores considerados de virulência foram realizados. Quatro isolados clínicos de *C. dubliniensis* de diferentes pacientes foram comparados com duas cepas referências de *C. albicans*. Primeiramente, a posição filogenética distinta de *C. dubliensis* foi estabelecida pela comparação da sequência da sua pequena subunidade de RNA ribossômico (rRNA) com espécies representativas de *Candida*. Os isolados de *C. dubliensis* formaram hifas não restritas na maioria das condições de indução testadas, mas não produziram hifas verdadeiras quando induzidas com N-acetilglucosamina. Os autores também encontraram que os isolados de *C. dubliensis* foram mais aderentes às células epiteliais bucais humanas, quando cultivados em glicose, quando comparados com os isolados de *C. albicans* de referência e igualmente aderentes quando cultivados em galactose. Os isolados de *C. dubliensis* foram sensíveis ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B. Através de análises por *Southern*, foram identificados sete genes homólogos de aspartil proteases (SAPs) de *C. albicans* testados em *C. dubliensis*. Ensaios sistêmicos de virulência in vivo utilizando um modelo de rato, sugerem que *C. dubliensis* é uma espécie menos virulenta quando comparada a *C. albicans*. Os autores concluíram que *C. dubliniensis* e *C. albicans* estão intimamente relacionadas e compartilham muitas propriedades, como a formação de tubos, adesão a superfícies epiteliais, a secreção de aspartil proteinases e a formação de clamidósporos, sendo a *C. dubliniensis* a espécie mais relacionada com *C. albicans*. A diminuição da capacidade de *C. dubliniensis* em formar hifas e seus níveis aumentados da produção de proteinases pode ajudar a fornecer uma explicação

sobre porque *C. dubliniensis* é, de acordo com os autores, quase exclusivamente associado à candidose oral, sendo menos invasiva.

Em 1998, Wysong et al.⁸³, descreveram o papel da catalase como agente antioxidante. Eles enfocam esse estudo na candidíase sistêmica, na qual caracterizam *C. albicans* como um fungo oportunista e patogênico, sendo o principal responsável por essa doença. Neste estudo eles fizeram análises *in vitro* e *in vivo* (em um modelo de rato). Assim, constataram que a catalase desempenha um papel antioxidante importante na proteção dos microrganismos contra os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio, proteção na qual é postulada como um fator de virulência. Para ajudar a elucidar a função da catalase em *C. albicans*, um gene catalase, o CAT1, foi isolado e clonado. Os *primers* utilizados para a técnica de PCR foram gerados com base em áreas altamente conservadas dos outros genes de catalase fúngicas, estes foram usados para amplificar um produto de 411 pares de base (pb) a partir do DNA genômico de *C. albicans* (ATCC 10261). Ao utilizar o produto de PCR como uma sonda, clones da catalase foram isolados a partir de bibliotecas genômicas de *C. albicans*. Os genes mutantes para CAT1 foram sintetizados e exibiram morfologia normal e taxas de crescimento comparáveis em levedura e formas de micélio. A análise enzimática deste gene revelou a proteína catalase em abundância na cepa padrão, sendo que essa atividade diminuiu quando foram analisadas as cepas mutantes, não sendo detectadas em mutantes nulas para catalase. Os ensaios *in vitro* mostraram que as cepas mutantes foram mais sensíveis aos danos causados por neutrófilos e peróxidos exógenos que foram sub-letais para a cepa parental. Em comparação com a cepa parental, a cepa mutante nula homocigótica foi muito menos virulenta para os ratos induzidos a um modelo de infecção intravenosa de candidíase disseminada. Portanto, os autores concluíram que há uma ligação da expressão gênica de CAT1 com a virulência de *C. albicans* uma vez que a reintrodução dos genes nas cepas mutantes restaurava a função da atividade catalase. Os testes *in vitro* e *in vivo* deste estudo sugerem que a catalase pode aumentar a patogenicidade de *C. albicans*.

Com o objetivo de elucidar o papel da superóxido desmutase contendo cobre e zinco (Cu/ZnSOD), umas das enzimas antioxidantes mais determinantes sobre a virulência em alguns microrganismos, Hwang et al.³⁸, em 2002, realizaram um estudo do gene SOD1 de *C. albicans*. Através da técnica “*URA blaster*”, houve a disruptura do gene para posterior análise. O mutante resultante *sod1/sod1* mostrou menor formação de hifas em meio “*Spider*”, mas ainda pode formar hifas em outros meios sólidos ou líquidos, particularmente em resposta ao soro. Além disso, os autores relataram que o mutante *sod1/sod1* é mais sensível à

menadiona, um agente redoxciclante, embora ainda apresentasse uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Além disso, as células mutantes de *sod1/sod1* apresentaram crescimento lento quando comparadas às cepas de referência. Ademais, os resultados sugeriram que a mutante *sod1/sod1* de *C. albicans* era significativamente mais suscetível à atividade fungicida de macrófagos do que as cepas de referência e revertentes, com virulência diminuída em camundongos. Assim, esses resultados sugerem que Cu/ZnSOD é necessário para a proteção do fungo *C. albicans* contra os estresses oxidativos.

No ano de 2003, Naglik et al.⁵⁸ conduziram uma revisão de literatura a respeito da expressão de genes da família aspartil proteinases (SAPs) e sua ação na virulência e patogênese em *C. albicans*. Os autores ressaltam que este fungo é o mais prevalente em humanos e tem desenvolvido vários mecanismos de virulência que permite sua colonização e posterior infecção do hospedeiro diante de fatores predisponentes. Os autores escolheram esse tipo de gene uma vez que a atividade proteolítica extracelular dessa proteína desenvolve um papel central na patogenicidade de *Candida* além de ser produzida por uma família com 10 genes (*Sap proteins*). Nesta revisão, os autores constataram que as proteinases agem, pelo menos, em uma das sete vias que foram mais profundamente descritas por eles, enfatizando como esses genes podem ajudar na invasão, infecção e consequente patogenicidade de *C. albicans*: 1) correlação da expressão gênica de SAPs in vitro com sua virulência; 2) degradação das proteínas humanas e análise estrutural para determinar a especificidade de SAPs ao substrato; 3) associação da produção de SAPs com outros processos de virulência de *C. albicans*; 4) expressão das proteínas SAPs e respostas imunitárias à SAPs em infecções em animais e em humanos; 5) expressão de genes SAPs durante infecções por *Candida*; 6) modulação da virulência de *C. albicans* por inibidores da aspartil proteinase; e 7) utilização de genes mutantes para analisar virulência em *C. albicans*. Os autores concluíram que as proteínas SAPs possuem funções especializadas durante o processo infeccioso, que incluem a função simples de digestão de moléculas para a aquisição de nutrientes, digestão ou distorção das membranas da célula hospedeira para facilitar a adesão e invasão de tecidos, e digestão das células e moléculas do sistema imunológico do hospedeiro para evitar que os microrganismos sofram os ataques antimicrobianos do hospedeiro.

Naglik et al.⁵⁹, conduziram outro estudo no ano de 2003 com o objetivo de determinar se a expressão gênica de enzimas hidrolíticas extracelulares se correlaciona com candidíase oral ou vaginal, em oposição a pacientes que apenas apresentam o fungo (sem infecção instalada), e para detectar se determinada expressão de genes da família aspartil proteinases

(SAPs) e fosfolipases (PLBs) são expressos especificamente ou seletivamente durante a doença oral ou vaginal. Estes genes foram selecionados porque, segundo os autores, as enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo as SAPs e os PLBs, estão entre os genes que apresentam relação direta com a virulência de *C. albicans*. Para isso, foi realizado um estudo in vivo para avaliar a expressão dos genes SAP1 – SAP8 e PLB1 e PLB2 em amostras clínicas de 137 pacientes com candidose oral ou vaginal, ou que apenas eram portadores do microrganismo. O RNA foi isolado a partir da coleta de saliva não estimulada ou esfregaços vaginais através de *swabs*. A expressão dos genes SAP1-8 e PLB1-2 foi avaliada por meio de RT-PCR utilizando *primers* específicos. Um montante de perfil da expressão gênica de SAPs foi obtido a partir de cepas de *C. albicans* durante diferentes fases da doença (sintomática e assintomática). De acordo com os resultados, os genes SAP2 e SAP5 eram os mais comuns expressos durante a fase assintomática e sintomática. A expressão dos genes SAP1, SAP3, SAP4, SAP7, SAP8 e PLB1 foi correlacionada com a doença oral, enquanto a dos genes SAP1, SAP3, e SAP6-SAP8 foram correlacionadas preferencialmente com a doença vaginal. Além disso, SAP1, SAP3, e SAP8 foram expressos preferencialmente em doença vaginal, em vez da infecção oral. Com estes dados, os autores demonstraram a diferença de expressão gênica das famílias SAPs e PLBs em amostras clínicas de humanos além de correlacionar a expressão de genes de virulência específicos nas espécies de *Candida* com a doença ativa e com a localização anatômica.

Martchenko et al.⁴⁶, em 2004, conduziram um estudo no qual identificaram três novos tipos potenciais de genes da família superóxido dismutase em *C. albicans*. Diante da descoberta, estudaram a expressão, regulação e função de um desses genes em especial, o SOD5. Neste estudo caracterizam os genes da família “*Superóxido Dismutase*” (SOD) como responsáveis por converter ROS em espécies menos prejudiciais ao fungo *C. albicans*. Neste estudo ainda citam que o gene SOD1 é expresso no citosol enquanto que o SOD3, na mitocôndria. Com o intuito de avaliar 1 dos 3 novos genes (SOD4, SOD5 e SOD6) descobertos na sequência do genoma de *C. albicans*, os autores cultivaram cepas padrão de *C. albicans* e de *Escherichia coli* e, após crescimento das cepas, fizeram extração de RNA a partir do método de fenol seguido da análise pelo método de *Northern Blot*. Modelos experimentais em ratos também foram realizados pelo grupo para análises de macrófagos e de virulência bem como carga fúngica. O gene alvo para este estudo foi o SOD5. O gene ACT1 foi usado como controle interno. Também na metodologia, realizaram a confecção de genes mutantes do SOD5 para analisar se realmente a remoção deste gene alvo interferiria nos

resultados. Os autores observaram que a transcrição do gene SOD5 foi super expressa durante a transformação morfológica de levedura para hifa de *C. albicans*, assim como a expressão desse gene foi aumentado quando células eram cultivadas em substratos não fermentados com única fonte de carbono. A supressão do gene SOD5, através do gene mutante, produziu uma cepa mutante viável que mostrou sensibilidade ao peróxido de hidrogênio. Portanto, os autores concluíram que o gene SOD5 é necessário para a virulência de *C. albicans* em um modelo de infecção. No entanto, a cepa mutante do gene SOD5 (*sod5*) apresentou a mesma resistência ao ataque de macrófagos que a cepa padrão, o que sugere que a perda de virulência não ocorre devido a uma sensibilidade aumentada ao ataque de macrófagos. Concluíram que o gene SOD5 está sob uma regulamentação complexa de expressão gênica sendo que os testes funcionais não mostram envolvimento de SOD5 na defesa contra a morte induzida por macrófagos. Porém, os efeitos da supressão do gene de virulência SOD5 podem sugerir o envolvimento de Sod5p na remoção de superóxidos produzido pelo hospedeiro. Com isso, a expressão gênica do gene SOD5 aumenta a formação de hifas, sendo que a ausência deste gene leva a um defeito na virulência deste microrganismo.

Com o conhecimento que biofilmes são comunidades de microrganismos com significativo impacto na área médica, Nobile et al.⁶² em 2008, conduziram um estudo avaliando mecanismos de aderência dos fungos às células do hospedeiro que permite a formação de biofilme de *C. albicans*. As cepas padrão dos microrganismos foram cultivadas assim como aquelas com genes mutantes. A integridade estrutural do fungo foi visualizada através de *Colony PCR* enquanto que a expressão de cada gene foi detectada através de RT-PCR. As cepas foram cultivadas tanto *in vitro* para analisar crescimento e biomassa do biofilme, quanto *in vivo*, em um modelo de infecção de cateter venoso em ratos. Os autores obtiveram os seguintes resultados: a família de proteínas de superfície (Als) tem sido implicada na formação de biofilme sendo que neste estudo foi observado que os genes ALS1 e ALS3 têm um papel crítico, porém redundante. A sobreexpressão de várias outras proteínas da família Als permitiram a formação de biofilme em uma amostra mutante dos genes *als1/als1* e *als3/als3*, permitindo assim, argumentar que as funções da proteína Als são governadas por níveis de expressão de diferentes genes da mesma família. Com este estudo também se concluiu que a proteína de superfície Hwp1 também é necessária para a formação de biofilme, além de descobrir que uma mistura de biofilme formada com cepas mutantes de *hwp1/hwp1* e *als1/als1 als3/als3* podem formar um biofilme híbrido tanto nos ensaios *in vitro* quanto *in vivo*, num modelo de infecção de cateter. Os autores, portanto, concluíram que os

genes HWP1 e ALS1/3 desempenham funções complementares na formação de biofilmes sugerindo que a complementaridade das adesinas no biofilme promove a formação de biofilmes monoespécies.

Jackson et al.³⁹, conduziram um estudo em 2009 com o objetivo de comparar as características genômicas dos fungos *C. dubliniensis* e *C. albicans*. Segundo os autores, *C. dubliniensis* é o fungo conhecido mais próximo de *C. albicans*, espécie mais patogênica em seres humanos. Contudo, eles ainda afirmaram que embora ambas as espécies compartilhem muitas características fenotípicas, incluindo a capacidade de formar hifas, *C. dubliniensis* é um patógeno significativamente menos virulento e menos versátil. Portanto, para identificar os genes específicos de *C. albicans* que podem ser responsáveis pela maior capacidade de causar doenças, Jackson et al.³⁹ sequenciaram o genoma de *C. dubliniensis* e o compararam com a já conhecida sequência do genoma de *C. albicans*. Embora as duas sequências sejam altamente similares, são identificados 168 genes específicos de espécies, incluindo alguns fatores de virulência específicos de hifas, tais como as aspartil proteinases Sap4 e Sap5 e a proposta invasina Als3. 115 pseudogenes confirmados em *C. dubliniensis* são ortólogos a vários genes de regulação do crescimento filamentosos que possuem papel na patogênese. No entanto, as principais diferenças no repertório genômico dizem respeito à expansão da família de genes TLO de fatores de transcrição putativos e a família de proteínas transmembranares putativas IFA em *C. albicans*, que representam um novo candidato aos fatores associados à virulência, além de observarem aumento na expressão dos genes das famílias SAP e ALS em *C. albicans*. Os autores sugerem que as recentes histórias evolutivas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* diferem entre si. Enquanto vários genes envolvem a patogênese de *C. albicans*, a espécie *C. dubliniensis* perdeu sua capacidade genômica de desenvolver funções patogênicas. Segundo este resultado, os autores sugerem que isso poderia explicar porque *C. albicans* é mais patogênico em humanos quando comparado com *C. dubliniensis*.

No ano de 2010, Nailis et al.⁶⁰ conduziram um estudo sobre a íntima relação da patogenicidade de *C. albicans* e a formação de biofilme, levando em consideração que as infecções por *C. albicans* são frequentemente associados com a formação de biofilme. Estes autores relacionaram estudos anteriores que comprovaram que a expressão de genes das famílias HWP (*hyphal wall protein*), ALS (*agglutinin-like sequences*), SAP (*secreted aspartyl proteases*), PLB (*phospholipase B*) e LIP (lipase) está associada com a formação do biofilme em superfícies mucosas. Diante disso, os autores investigaram, através da técnica de qPCR, se esses genes que codificam proteínas com potenciais fatores de virulência são expressos em

maiores quantidades em biofilmes associados a superfícies abióticas. Para isso, biofilmes de *C. albicans* foram formados em placas com microtitulação de silicone (MTP), em reatores “Centres for Disease Control” (CDC) em um modelo de animal in vivo (modelo de cateter de poliuretano instalado subcutâneo) (SCR), e em superfícies mucosas em um modelo reconstituído do epitélio humano (RHE). Os resultados obtidos pelos autores foram: os genes HWP1 e os pertencentes as famílias dos genes ALS, SAP, PLB foram constitutivamente expressos nos biofilmes de *C. albicans*. Os genes ALS1 ao ALS5 foram ativados em todos os diferentes modelos, enquanto o gene ALS9 foi reprimido. Os genes HWP1 e ALS6 foram sobre-expressos em todos os modelos, exceto no MTP e RHE, respectivamente. Os níveis de expressão SAP1 foram mais evidenciados nos modelos in vitro, enquanto a expressão dos genes SAP2, SAP4 e SAP6 foram maiores no modelo in vivo. Além disso, SAP5 foi muito regulada nos modelos in vivo e RHE. Para SAP9 e SAP10, a expressão gênica observada foi similar em todos os modelos experimentais. Não houve aumento de expressão dos genes PLB nos biofilmes, enquanto que para os genes LIP1-3, LIP5-7 e LIP9-10, houve aumento da expressão nos modelos experimentais in vitro. Além disso, uma elevada atividade da lipase foi detectada em sobrenadantes de biofilmes que cresceram nos modelos RHE e MTP. Diante desses resultados, os autores concluíram que a expressão do gene HWP1 e da maioria dos genes pertencentes às famílias ALS, SAP e LIP são sobre expressos nos biofilmes de *C. albicans*. Outro fator importante que analisaram é que a expressão dos genes é diferente nos diferentes modelos experimentais, não podendo extrapolar os dados obtidos em um modelo para outro, salientando a necessidade de usar vários sistemas experimentais ao estudar a expressão de genes que codificam fatores de virulência potenciais em biofilmes de *C. albicans*.

Zhu et al.⁸⁶, em 2011, buscaram demonstrar um processo apoptótico induzido por farnesol em *C. albicans*. Segundo os autores, o farnesol é um derivado chave na via de biossíntese de esterol em células eucarióticas previamente identificadas como uma molécula *quorum sensing* na espécie *C. albicans*. Em um estudo anterior o mesmo grupo demonstrou que o farnesol é capaz de desencadear a apoptose em *C. albicans*⁷⁵. No entanto, o mecanismo exato da citotoxicidade com farnesol não é totalmente elucidado. Compostos lipofílicos como o farnesol são conhecidos por conjugar com glutathione, um antioxidante crucial para a desintoxicação celular contra compostos prejudiciais. Os conjugados de glutathione atuam como substratos para transportadores ABC dependentes de ATP e são extraídos a partir da célula. Para esse fim, este estudo foi realizado para testar se a conjugação de farnesol com

glutathione intracelular, juntamente com a extrusão mediada por Cdr1p de conjugados de glutathione, resulta em depleção total de glutathione, estresse oxidativo e, finalmente, morte celular fúngica. Os autores demonstraram uma diminuição significativa nos níveis intracelulares de glutathione concomitante à elevação da regulação da CDR1 e à diminuição da viabilidade celular. No entanto, a adição de glutathione reduzida exógena manteve níveis intracelulares de glutathione e viabilidade melhorada. Em contraste, a toxicidade de farnesol diminuiu em um mutante com falta de CDR1, enquanto que aumentou em uma cepa de sobreexpressão de CDR1. Além disso, os estudos de expressão gênica demonstraram uma importante regulação dos genes SOD, enzimas primárias responsáveis pela defesa contra o estresse oxidativo, sem alterações na expressão na CDR1. Os autores ainda ressaltaram que a compreensão dos mecanismos subjacentes à citotoxicidade de farnesol em *C. albicans* pode levar ao desenvolvimento desse agente de ciclagem redox como agente antifúngico alternativo.

Em 2012, Moran et al.⁵⁷, realizaram uma revisão de literatura tentando justificar o fato de *C. dubliniensis* ser menos patogênica que *C. albicans*. Após levantamento bibliográfico, os autores concluíram que *C. albicans* e *C. dubliniensis* são espécies de leveduras patogênicas que estão intimamente relacionadas. Porém, relacionando com *C. dubliniensis*, *C. albicans* é um fungo mais prevalente na infecção humana, demonstrando ser mais patogênico em vários modelos de infecção estudados. O estudo comparativo dos genomas das duas espécies revelou que, embora existam algumas diferenças significativas, elas são muito semelhantes devido à expressão de famílias de genes relacionados à virulência, como por exemplo, os genes das famílias ALS e SAP. As análises comparativas da expressão de genes contra o estresse ambiental e a formação de hifas nas duas espécies também foram realizadas para investigar diferenças na capacidade de tolerância de ambas as espécies em relação ao meio. O conjunto de dados levantado pelos autores levaram-nos a concluir que entre as diferenças existentes entre as espécies, a principal discrepância entre elas está relacionada a diferenças na formação de hifas e na expressão de produtos específicos de hifa. Mas ainda ressalta que há a necessidade de entendimento da virulência deste fungo, em particular a expressão relativa às hifas e proteínas específicas da hifa para a patogênese das infecções de *Candida*.

No ano de 2012, o estudo de Nobile et al.⁶¹ teve como objetivo a análise da formação de biofilme de *C. albicans*. Para isso, o grupo combinou métodos da genética clássica, ferramentas do genoma, sequenciamento de RNA e dois modelos em animais in vivo para compreender melhor o mapa do circuito transcricional que controla a formação de biofilme

em *C. albicans*. Neste estudo eles avaliaram a ação de seis genes reguladores que controlam a expressão de mais de 1000 outros genes que participam da formação do biofilme. Os genes reguladores alvo foram: BCR1, TEC1, EFG1, NDT80, ROB1 e BRG1. Através da microscopia confocal, os autores observaram que as cepas mutantes para estes genes formam biofilmes com arquitetura mais fina e com menor quantidade do fungo na forma filamentosa, quando comparados com o biofilme formado com a cepa padrão. Esse resultado foi comprovado com a reintrodução dos genes na formação do biofilme, em que este voltou em uma formação muito parecida com a cepa parental. Com isso, os autores comprovaram que esses genes são requeridos para a formação do biofilme *in vitro*. No modelo experimental *in vivo*, os autores concluíram que os genes BCR1, TEC1, EFG1, NDT80, ROB1 e BRG1 são essenciais na formação do biofilme, tanto para o modelo de cateter quanto o de prótese. Os autores concluíram, portanto, que o circuito de regulação gênica desenvolvido fornece uma estrutura para a compreensão de muitos aspectos da formação do biofilme de *C. albicans* em um hospedeiro, fornecendo “*insights*” sobre os comportamentos celulares frente os circuitos de transcrição.

Neste mesmo ano, Monroy-Pérez et al.⁵⁶, conduziram um estudo *in vivo* que teve como objetivo detectar a frequência de expressão de oito genes da família ALS (ALS1-7, ALS9) bem como a característica genotípica do gene HWP1 em um grupo de isolados clínicos de *C. albicans* de 264 pacientes mexicanas acometidas com candidose vaginal. A espécie *C. albicans* foi identificada pela amplificação pela técnica de PCR. Os genes ALSs (adesão às células epiteliais) e HWP1 (codifica uma proteína envolvida no processo de adesão das células na morfologia de hifas) foram identificados pela técnica de PCR convencional, e os seus níveis de expressão foram determinados por RT-qPCR. A expressão gênica foi avaliada em um modelo de reconstituição de epitélio vaginal humano (RHVE). Os autores concluíram com este estudo que 19% das infecções vaginais foram causadas por *C. albicans*, e uma elevada proporção das cepas carregavam genes que codificam proteínas envolvidas na adesão ao epitélio. Portanto, os genes ALSs e HWP1 foram expressos em RHVE, sugerindo que as proteínas de ALSs e Hwp1 desempenham papel importante na patogenicidade da infecção.

Em 2014, Alves et al.² realizaram um estudo com o objetivo de analisar *in vitro* a coinfeção de um epitélio vaginal humano reconstituído (RHVE) por *C. albicans* e *C. glabrata*. Para isso, a capacidade de invadir e colonizar o RHVE de ambas as espécies foi analisada através da hibridização de sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) específico para cada espécie, microscopia confocal (CLSM) e um novo protocolo de RT-qPCR para a

quantificação de *Candida* nos tecidos infectados. O dano de RHVE foi avaliado pela medição da atividade de lactato desidrogenase (LDH), e a expressão gênica dos genes de virulência HWP1, ALSs, EPA, PLBs, PLD e SAPs nas espécies de *Candida* foi avaliada pela técnica de qPCR. Para os genes testados, os autores indicaram o desenho dos *primers* bem como testes de especificidade usando o BLAST. Os autores observaram que ambas as espécies induziram danos ao RHVE, no entanto, foi significativamente menor para *C. glabrata*. Em contraste, houve um aumento significativo na colonização e invasividade de *C. glabrata* no RHVE quando essa espécie foi adicionada junto com *C. albicans* ao tecido. A extensão do dano causado no RHVE pelas duas espécies pareceu ser principalmente dependente do processo de invasão. Dos genes de virulência testados, os autores concluíram que os genes HWP1, PLD1 e ALS3 foram considerados mais associados à patogenicidade no modelo. Os autores encontraram que a expressão dos genes ALS1 e HWP1 foi induzida no modelo de co-infecção (com ambas as espécies), enquanto que o gene ALS3 teve expressão semelhante em ambos modelos de infecção. Os autores então concluíram que o modelo RHVE, juntamente com ferramentas específicas de análise, permite a avaliação da colonização e invasão de *Candida* com uma única espécie ou co-infecção. Com este modelo, os autores ainda concluíram que *C. albicans* é um colonizador do modelo RHVE muito mais invasiva em comparação com *C. glabrata*. No entanto, eles ressaltam que a co-infecção do sítio por *C. albicans* juntamente com *C. glabrata* aumentou a colonização e invasão de *C. glabrata*. Os resultados deste estudo sugerem que os genes de virulência HWP1, PLD1 e ALS3 desempenham um importante papel na patogenicidade das espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*.

Com o crescente número de cepas de *Candida* spp. resistentes a agentes antifúngicos, Freire et al.²⁹, realizaram em 2015 um estudo para avaliar os efeitos de um método terapêutico, a inativação fotodinâmica (PDI) nos biofilmes de *Candida albicans*, avaliando seus efeitos sobre a expressão das enzimas hidrolíticas através do gene SAP5, lipase com o gene LIP9 e fosfolipase pelo gene PLB2. Foram utilizadas 9 cepas clínicas de *C. albicans* isoladas dos pacientes portadores do vírus HIV, além de uma cepa padrão ATCC 18804. A quantificação da expressão gênica foi realizada através da técnica de RT-qPCR. Para o tratamento com a PDI, foi utilizado luz de baixa potência (vermelho visível, 660 nm) e o azul de metileno (300 µM) como fotossensibilizador. Foram avaliados dois grupos experimentais: PDI: sensibilização com azul de metileno e irradiação a laser; e o controle sem sensibilização com azul de metileno e ausência de luz. A PDI diminuiu a expressão do gene SAP5 em 60% enquanto observaram redução de 50% expressão dos genes LIP9 e PLB2. Quando os autores

compararam o perfil de expressão de cada gene entre os grupos, observaram diminuição na expressão gênica, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa.

No ano de 2015, Chen et al.¹⁶, ressaltando que *C. albicans* é um importante patógeno fúngico humano e que uma das características mais importantes da sua patogenicidade é a capacidade de formar biofilmes em superfícies mucosas e implantes médicos residentes, o grupo avaliou o papel do fator de transcrição Sfp1 na regulação da formação de biofilme. Para isso, cepas de *C. albicans* foram crescidas sobre meio suplementado, e o DNA das cepas foram manipulados para a deleção e reintegração dos genes SFP1, EFG1 e BCR1 de *C. albicans*. A expressão gênica foi avaliada através de RT-qPCR. A deleção do gene SFP1 aumentou a adesão celular e a formação de biofilmes em comparação com a cepa padrão. Os autores relataram com curiosidade que o mutante com deleção do SFP1 também exibiu um aumento na expressão dos genes ALS1, ALS3 e HWP1, os quais codificam adesinas. Ressaltaram que os fatores de transcrição Bcr1 e Efg1 são críticos para o controle da formação de biofilmes, em que o Efg1 também é necessário para o crescimento das hifas. A exclusão dos gene BCR1 ou EFG1 na cepa *sfp1-null* levou a redução da expressão dos genes de adesina. Como resultado, os mutantes de deleção dupla *bcr1/sfp1* ou *efg1/sfp1* exibiram uma formação de biofilme significativamente reduzida. Os resultados indicaram que o Sfp1 regula negativamente a formação do biofilme, principalmente dos genes de adesina ALS1, ALS3 e HWP1, e que a repressão desses genes é mediada pela inibição de Bcr1 e Efg1. Os autores concluíram que a formação de biofilme envolve processos complexos em *C. albicans*, incluindo adesão celular, crescimento filamentosos, secreção de matriz extracelular e dispersão celular.

Um estudo com o objetivo de desvendar os mecanismos que medeiam a adaptação de *C. albicans* ao estresse oxidativo, através do sistema antioxidante tioredoxina e a produção de NADPH pela via da pentose fosfato, foi realizado pelos autores Komalapriya et al.⁴⁰, no ano de 2015. Para que o fungo *C. albicans*, um patógeno oportunista da pele, cavidade oral e trato gastrointestinal e urogenital, invada o tecido humano causando infecção, ele desencadeia uma série de sistemas que faz com que esse patógeno evite o seu reconhecimento por parte das células imunitárias do hospedeiro, fazendo-o sobreviver aos ataques de fagócitos, que são programados para fagocitar e matar microrganismos invasores. Os fagócitos matam os microrganismos através de uma série de toxinas, incluindo as ROS. Portanto, segundo os autores, entender o sistema que leva *C. albicans* a sobreviver à exposição de ROS, é muito importante para entender a patogenicidade desse fungo. Neste

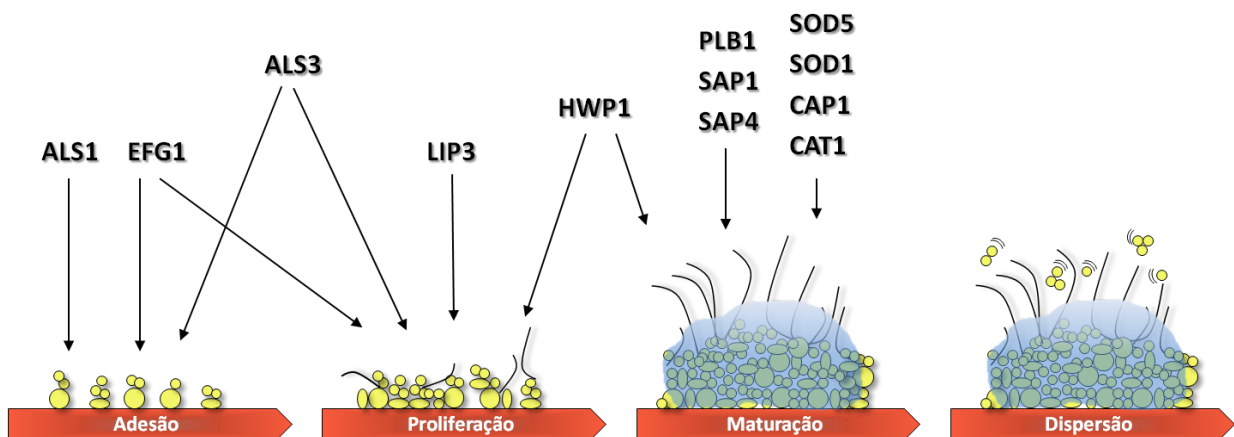
estudo, os autores fizeram o primeiro modelo representativo da resposta ao estresse oxidativo por um microrganismo clinicamente relevante. Este é um modelo quantitativo matemático que integra reações, descrevendo a desintoxicação de H_2O_2 mediada pela enzima catalase, pelos sistemas de glutathiona e de tioredoxina, e também pela produção de NADPH através da via de pentose fosfato. Especificamente, a via que envolve a catalase age na degradação de H_2O_2 em água e oxigênio (CAT1), sendo considerada pelos autores a maior contribuição a resistência ao estresse oxidativo. Já o sistema de glutathiona desempenha um papel com tripeptídeo em abundância na resposta ao estresse oxidativo, enquanto o sistema tioredoxina ajuda na desintoxicação de H_2O_2 além de agir também na reparação dos danos causados pelas proteínas expressas. Finalmente, a produção de NADPH através da via de pentose fosfato auxilia na desintoxicação de H_2O_2 . Este modelo permitiu que os autores observassem que: existem sistemas adicionais aos principais reguladores do estresse oxidativo Cap1 e Hog1; o papel da catalase como o principal sistema de desintoxicação nas condições estudadas; o papel dos sistemas da glutathiona e tioredoxina na manutenção do potencial redox celular e reparação de danos, respectivamente; o conjunto tempo e dose dependentes do resultado dos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo sob diferentes cenários de estresse; os efeitos das mutações sobre a capacidade das células de *C. albicans* em responder ao estresse oxidativo. Eles então concluíram, entre outras informações, que a ativação da via de sinalização CAP1 em resposta ao estresse oxidativo induz a transcrição de vários outros genes antioxidantes, entre eles: CAT1, TSA1, entre outros, contribuindo para a patogenicidade de *C. albicans*.

Araújo et al.³, em 2016 realizaram uma revisão de literatura com o objetivo de levantar estudos recentes que demonstraram avanço no entendimento da rede de genes reguladores da formação de biofilme nas diferentes espécies de *Candida*. Nesta revisão os autores caracterizam a formação de biofilme como peça chave na candidose oral. Ainda, detalharam a formação do biofilme como: fase de adesão; formação camada basal do biofilme; maturação do biofilme (diversas morfologias dos fungos e matriz extracelular); e por fim, a dispersão das células. A estrutura do biofilme consiste geralmente de duas camadas e de um depósito basal de blastoporos recobertos por uma matriz espessa formada com células no formato de hifa. Quando comparado o biofilme de *C. albicans* com as outras espécies, os autores concluíram: quando comparado com o de *C. parapsilosis*, estes são menos espessos, consistindo de blastoporos agregados com leveduras e pseudohifas; quando comparou-se o biofilme de *C. albicans* com o de *C. tropicalis*, estes, quando apresentam o biofilme maduro, são caracterizados por uma rede densa de células em forma de levedura com morfologias

filamentosas evidentes; *C. glabrata* por sua vez, forma um biofilme de monocamada compacto ou de múltiplas camadas mas apenas com blastoporos. Neste artigo os autores ainda citam os processos regulatórios por genes que são responsáveis pela formação do biofilme. Além de outros genes, eles fizeram uma revisão das funções dos genes ALS1, ALS3, HWP1 e EFG1, que estão envolvidos na formação de biofilme. Em *C. albicans*, por exemplo, a adesão é mediada pelas adesinas ALSs. O gene ALS1 é detectado tanto em levedura quanto na morfologia de hifa, enquanto que o gene ALS3 é expresso apenas na morfologia de hifa. O gene HWP1 codifica outra adesina, especificamente, uma proteína da parede celular do fungo que promove adesão dos microrganismos às células do hospedeiro, além de estar presente na formação de tubos germinativos e formação de hifas. O gene EFG1, por sua vez, é caracterizado como um gene regulador de transcrição, o qual é recrutado quando há a formação de biofilme das diferentes espécies de *Candida*. Com esta revisão, os autores puderam elucidar para a comunidade científica a rede de expressão gênica envolvida nas diferentes fases da formação de biofilme, e ainda ressaltam que esses genes são poucos estudados nas diferentes espécies de *Candida*, sendo necessário seu aprofundamento na formação de biofilme nas espécies não *albicans*.

Com base nas informações obtidas na literatura pertinente, a Figura 1 ilustra onde os genes de escolha estão envolvidos na formação do biofilme em *C. albicans*, e o Quadro 1 descreve as principais características dos genes propostos.

Figura 1 - Atuação dos genes na formação do biofilme



Fonte: Adaptado do estudo dirigido por Finkel JS e Mitchell²⁸ (2011), p. 18.

Quadro 1 - Genes de virulência de *C. albicans*

<i>Systematic Name*</i>	Gene	Descrição dos Genes
C1_13700W_A	ACT1	Actina. Transcrição regulada pela fase de crescimento na indução da morfogênese da hifa e supressão da formação do biofilme. Gene utilizado como padrão para controle interno nas reações RT-qPCR ^{2,40,60} .
C6_03700W_A	ALS1	<i>Agglutinin-Like Sequence 1</i> (Aglutinina). O gene ALS1 codifica proteínas de adesão necessárias para que aos fungos se adiram à parede celular durante a fase inicial de formação do biofilme. Tem papel complementar na formação de biofilme ^{28,62} .
CR_07070C_A	ALS3	<i>Agglutinin-Like Sequence 3</i> (Aglutinina). Esse gene codifica proteínas de adesão celular que atua como adesões complementares em etapas mais avançadas da formação do biofilme. Esse gene é expresso principalmente na forma de hifa dos fungos ^{28,62} .
C3_02220W_A	CAP1	Proteína adenilato ciclase. CAP1 é responsável pela ativação de genes em resposta ao stress oxidativo em <i>C. albicans</i> . A sua ativação induz a transcrição de vários genes antioxidantes ^{26,40} , ajudando na proteção dos microrganismos contra os mecanismos de defesa do hospedeiro.
C1_06810W_A	CAT1	Catalase. Atua como gene do estresse oxidativo. Ele caracteriza a via central de desintoxicação de H ₂ O ₂ pela enzima catalase. CAT1 é um dos vários fatores que contribuem significativamente para a virulência de <i>C. albicans</i> ^{40,83} .
CR_07890W_A	EFG1	EFG1 é um gene regulador de transcrição. Controla a formação de biofilme em <i>C. albicans</i> . Faz parte do circuito regulador de hifas ³⁵ .
C4_03570W_A	HWP1	Codifica uma proteína da parede de hifas envolvida na adesão de <i>C. albicans</i> a células epiteliais. Propicia a adesão de <i>C. albicans</i> a células epiteliais ao agir como um substrato para transglutaminase apresentando um papel importante na patogênese deste fungo ^{56,60} . HWP1 codifica uma proteína de adesão específica do fungo na forma de hifa ^{56,60} .
C1_09900W_A	LIP3	Lipase. Está associada ao crescimento do biofilme sobre superfícies mucosas ⁶⁰ .
C6_01990W_A	PLB1	Fosfolipase B promove a adesão e penetração do fungo na célula do hospedeiro, contribuindo para destruição tecidual ^{44,59} .
C6_03490C_A	SAP1	<i>Secreted Aspartyl Proteinase 1</i> . SAP1 é um gene que codifica a expressão de proteinase nas fases iniciais da adesão, refletindo na colonização e contribuindo para a lesão do tecido, pois degrada as proteínas ⁵⁹ .
C6_03500C_A	SAP4	<i>Secreted Aspartyl Proteinase 4</i> . SAP4 é um gene associado à expressão de proteinases que auxiliam a transição morfológica de levedura para hifas em <i>Candida albicans</i> , contribuindo para maior virulência do fungo ^{58,60} .
C4_02320C_A	SOD1	Superóxido dismutase. SOD1 é um gene que contribui para a virulência de <i>C. albicans</i> expressando proteínas para que o fungo supere o estresse oxidativo e sobreviva aos mecanismos de defesa do organismo ^{37,46} .
C2_00680C_A	SOD5	Superóxido dismutase. SOD5 é um gene que codifica proteínas para proteção do fungo contra o estresse oxidativo. Fatores de transcrição regulam a expressão de SOD5, que por sua vez, regula a transição de <i>C. albicans</i> de levedura para hifa propiciando maior virulência ao micro-organismo ⁴⁶ .

Características dos genes de virulência de *C. albicans* propostos neste estudo para análise da expressão gênica. * Da base de dados “*Candida Genome Database*”.

Fonte: Elaboração própria.

3 PROPOSIÇÃO

ESTUDO 1: 1) Analisar a especificidade dos *primers* da literatura para 12 genes de *C. albicans* (ACT1, ALS1, ALS3, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SAP4, SOD1 e SOD5) através de análises *in silico* e *in vitro*. 2) Delineamento e análise de *primers* para esses genes de *C. albicans* através do programa “*Beacon Designer*” quando os *primers* da literatura não apresentaram características próximas às ideias ou inespecificidade. 3) Padronização dos *primers* para sua utilização na técnica de RT-qPCR para examinar expressão de genes de *C. albicans* em amostras clínicas advindas de pacientes.

ESTUDO 2: Avaliar a expressão gênica dos genes de virulência de *C. albicans* ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SOD1 e ACT1 (controle interno) em isolados clínicos de pacientes submetidos a diferentes terapias: convencional com Nistatina e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Estudo 1: Análise e padronização de *primers* para utilização na técnica de RT - qPCR

Em suma, para determinar a especificidade dos genes de virulência de *C. albicans* (ACT1, ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1 e SOD1) para posterior utilização em isolados clínicos provenientes de dois tratamentos, Nistatina e aPDT, foi necessário:

- 1) Análise *in silico* e *in vitro* de *primers* da literatura específicos para os genes de escolha;
- 2) Delineamento, análise *in silico* e *in vitro* de novos *primers* delineados para os genes de interesse;
- 3) Análise *in vitro* dos *primers* que apresentaram melhores características. A análise *in vitro* para padronização dos *primers* consistiu em: extração de DNA; preparo dos *primers* liofilizados; especificidade dos *primers* pela técnica de PCR seguida de eletroforese em gel de agarose; determinação da concentração ótima de cada *primer*; confecção da curva padrão; e reação de qPCR para analisar a eficiência dos mesmos.

4.1.1 Análise *in silico* dos *primers*

Anterior à quantificação da expressão gênica dos genes de virulência de *C. albicans*, fez-se necessária a padronização dos *primers* para a técnica de qPCR. Quando os *primers* obtidos da literatura não apresentaram boas características *in vitro*, por apresentaram reação cruzada e/ou produtos inespecíficos, foi realizada uma nova busca pela literatura a procura de *primers* específicos. Além da busca na literatura por *primers* específicos, novos *primers* foram desenhados para a obtenção máxima de especificidade para os genes alvo. Em suma, todos os *primers* foram analisados através das etapas: 1-obtenção do gene no formato FASTA na base de dados “*Candida Genome Database*”; 2- análise de homologias através do *Blast*; 3- alinhamento das sequências com a ferramenta *ClustalW2*; 4- análise de estruturas secundárias através da ferramenta *Mfold* e, finalmente, 5- análise no programa *Beacon Designer*[™]. Essa busca, análise e desenho dos *primers* foram realizados de acordo com a metodologia descrita detalhadamente a seguir.

4.1.1.1 Busca por artigos com primers específicos para os Genes de Virulência

Inicialmente, pesquisas no PubMed foram realizadas para encontrar genes de virulência relacionados a *C. albicans* (Quadro 1), utilizando a combinação das palavras-chave: 1) *Candida albicans*, qPCR, expressão gênica; 2) *Candida albicans*, nome específico dos genes listados no Quadro 1. Os trabalhos foram selecionados quando os autores descreviam a especificidade dos *primers*.

4.1.1.2 Sequência do gene em formato FASTA

Utilizando o site *Candida Genome Database* (<http://www.candidagenome.org/>), as sequências dos genes foram obtidas no formato FASTA. Para a realização desta busca, o nome do gene foi colocado na lacuna “*search*” do site, a opção “*go*” foi clicada e uma nova página foi aberta para que o gene da espécie escolhida fosse selecionado. As características do respectivo gene alvo aparecem nessa nova página podendo ser consultadas. A sequência pôde ser visualizada em formato FASTA clicando na aba “*Homolog*” e “*Genomic (multi-FASTA format)*”. A sequência no formato FASTA foi analisada em documento do Word para que se tornasse mais fácil a verificação e análise. Os *primers*, tanto o *Forward* quando o *Reverse* foram encontrados na sequência e após esta etapa, o produto do PCR (Amplicon) pôde ser visualizado. Amplicon é o produto da amplificação, conta-se a partir da primeira letra do *Forward* e termina-se na última letra do *Reverse* (espelho), o amplicon então determina o tamanho do produto. O *Forward* é encontrado com a mesma sequência descrita enquanto o *Reverse* é encontrado em sua forma de espelho (Figura 2).

Figura 2 - Exemplificação dos *primers*: *Forward*, *Reverse* e seu espelho

	<i>Forward</i>	AACCAATAGTGATGTCAGCAGCAT
SAP1	<i>Reverse</i>	ACAAGCCCTCCCAGTTACTTTAAA
	Espelho	TTTAAAGTAACTGGGAGGGCTTGT

Fonte: Elaboração própria.

4.1.1.3 Basic Local Alignment Search Tool

Após os *primers* serem encontrados nas sequências dos genes, estes foram analisados no *Basic Local Alignment Search Tool (Blast)*. *Blast* é um programa de busca utilizado para checar se as sequências dos *primers* são homólogas a alguma sequência existente que não os genes alvos do estudo. Esse programa busca similaridade em todas as bases de dados (bactérias, fungos, entre outros), além disso, busca sequência dos *primers* escolhidos com outros genes da mesma espécie e com os genes de outras espécies. Esta análise é realizada através de uma interface da web redirecionada pelo site PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Após clicar no ícone BLAST, a página é redirecionada. Nesta nova página o campo “*nucleotide blast*” deve ser selecionado e uma nova página é aberta com os campos para colocarmos as sequências dos *primers* e as características que queremos que sejam analisadas. Depois de realizada essa busca, o resultado é apresentado em outra janela e as homologies encontradas são detalhadas.

4.1.1.4 Candida Genome Database

Nesta pesquisa, os *primers* também tiveram a homologia testada com outras espécies de fungos através da base de dados do site “*Candida Genome Database*” (<http://www.candidagenome.org/>). Este site possibilita essa análise, pois possui uma base de dados exclusiva para fungos, inclusive das espécies de *Candida*.

Para checar a homologia é necessário clicar na ferramenta “Tools” e “BLAST”. A seção é aberta e então os *primers* (*Forward* e *Reverse*-espelho) são copiados um de cada vez na lacuna da sequência em formato de FASTA o botão “Run Blast” deve ser clicado e uma página com as homologies é gerada.

4.1.1.5 Clustal análise – Alinhamento das sequências alvo

Clustal Omega é um programa de alinhamento de sequências múltiplas. Este programa alinha duas ou mais sequências genômicas de escolha com o objetivo de analisar se as sequências dos *primers* escolhidos são homólogas à(s) sequência(s) de outro(s) gene(s) ou espécie (s) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para que ocorra esse pareamento, as sequências devem ser copiadas juntamente com seu nome no campo “STEP 1 - Enter your

input sequences”, a opção “DNA” é escolhida e então, o campo “Submit” deve ser clicado. Essa página gerará o alinhamento das sequências de escolha. Os *primers* podem assim ser encontrados e a análise realizada. Com este programa também há a possibilidade de analisar a força de interação entre os nucleotídeos homólogos [A-T ligação mais fraca (duas pontes de hidrogênio) / G-C ligação mais forte (três pontes de hidrogênio)].

4.1.1.6 Mfold

Para analisar a existência de estruturas secundárias nos *primers* escolhidos e nos produtos de qPCR, o programa Mfold é o escolhido. Mfold é um programa gratuito disponível na internet através do site <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>. Este programa apresenta como principais vantagens a possibilidade de alterar as condições iônicas dos *primers* ($[Na^+]$ e $[Mg^{++}]$) e as temperaturas desejadas para o anelamento dos mesmos. A escolha dessas características permite melhor fidelidade dos resultados *in silico*, pois se assemelha mais as características da técnica *in vitro*. As características de escolha para a análise de estruturas secundárias nas sequências foram:

- Folding temperature: 60°C
- $[Na^+]$: 50 mM
- $[Mg^{++}]$: 3 mM

4.1.1.7 Beacon Designer™

Beacon Designer™ (Premier Biosoft) é um software desenvolvido para desenhar *primers* e sondas para ensaios de PCR. Além de desenhar *primers* novos com características pré-determinadas, essa ferramenta também analisa *primers* já desenhados. O diferencial desse programa é que todas as características podem ser alteradas de acordo com o *primer* desejado, como por exemplo, checar homologia, escolher T_m , o fluoróforo que será utilizado, entre outros. Com esta ferramenta, foi realizada a análise de todos os *primers* adicionais obtidos da literatura como também foram desenhados novos *primers* para os genes de interesse.

4.1.2 Extração de DNA para padronização dos *primers*

Previamente a realização da técnica de qPCR para analisar a expressão gênica dos fatores de virulência das amostras clínicas e anteriormente a análise *in vitro* da efetividade dos *primers* (para os genes ACT1, ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SAP4 e SOD1), cepas de *Candida albicans* (*Ca*) SC5314 obtidas do “Stanford Genome Technology Center” (SC) (Stanford University, USA), *Candida glabrata* (*Cg*) ATCC 2001, *Candida tropicalis* (*Ct*) (ATCC 4563) e *Candida krusei* (*Ck*) (ATCC 6258) obtidas do “American Type Culture Collection (ATCC) (University Boulevard, Manassas, USA), e *Candida dublinensis* (*Cd*) (CBS 7987) obtidas do “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS) (Utrecht, Netherlands) foram descongeladas e submetidas à extração de DNA. O DNA extraído das cepas foi usado como *template* na reação de PCR para testar a especificidade dos *primers* contra estas espécies. Posteriormente, para analisar integridade do material genético, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose.

4.1.2.1 Extração e isolamento do DNA

Para a extração do DNA, as cepas das espécies de *Candida* foram descongeladas e reativadas em placas de Petri contendo o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Acumedia, Neogen, Lansing, Michigan, USA). Estas foram mantidas por 48 horas em estufa a 37°C. Decorrido este período, de 5 a 10 colônias foram coletadas da placa e cultivadas em 10 mL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB) (Acumedia, Neogen, Lansing, Michigan, USA) *overnight* (16 horas) caracterizando o pré-inóculo. Em seguida, preparou-se os inóculos incubando 500 µL de cada suspensão do pré-inóculo em 9,5 mL de YNB (1:20) por aproximadamente 8 horas a 37° C, para que as células alcançassem o meio de sua fase exponencial de crescimento, o que proporcionaria maior quantidade de DNA íntegro. O crescimento dos microrganismos foi monitorado longitudinalmente por espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm para determinar a densidade óptica (DO). A DO de cada espécie correspondente ao meio da fase de crescimento exponencial foi: *C. albicans* DO_{540nm} 0,502; *C. dublinensis* DO_{540nm} 0,499; *C. glabrata* DO_{540nm} 0,565; *C. krusei* DO_{540nm} 0,543; *C. tropicalis* DO_{540nm} 0,512. Decorrido esse período a suspensão foi centrifugada durante 10 minutos a 4° C e rotação de 5,000 xg, o sobrenadante foi descartado e o pellet armazenado a -20° C até o momento de sua utilização.

Na sequência, o DNA dos microrganismos foi extraído com a utilização do kit de purificação *EPICENTRE MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (ILLUMINA, INC, San Diego, CA, USA) seguindo a metodologia descrita a seguir.

Para a realização do isolamento do DNA fúngico, os *pellets* dos diferentes microrganismos foram suspensos em 500 µL de Tris EDTA (TE) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), centrifugados por 10 min a 10,000 xg a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de cada amostra foi então ressuspenso em 100 µL de TE, adicionou-se 10,9 µL da enzima lizosima (100 mg/mL) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) e 5 µL de mutanolisina (5U/µL) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), e incubou-se a 37° C por 30 min.

O volume dos reagentes do Kit de purificação foi ajustado para aumentar a eficiência da extração do DNA total da seguinte forma:

- a) Alíquotas de 2 µL da enzima proteinase K (20 mg/mL) foram diluídas em 350 µL da Solução de Lise Celular e Tecidual (*Tissue and Cell Lysis Solution*) proveniente no kit;
- b) Alíquotas de 350 µL da Solução acima preparada foram adicionadas nas amostras de *Candida* separadamente, estas foram misturadas vigorosamente e incubadas a 65° C por 15 minutos;
- c) Decorrido esse período as amostras ficaram a 37° C, adicionou-se 2 µL da enzima RNase A (10 mg/mL) e incubou-se a 37° C por 30 min;
- d) As amostras foram colocadas no gelo por 5 min;
- e) Alíquotas de 150 µL do Reagente para Precipitação de Proteína (*MPC*) foi adicionado à amostra lisada e esta foi vortexada por 10 seg;
- f) Em seguida a amostra foi centrifugada por 10 min a 10,000 xg a 4° C, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o pellet descartado;
- g) Foram adicionados 750 µL de isopropanol, a solução foi homogeneizada e incubada *overnight*;
- h) A amostra foi novamente centrifugada por 10 min a 10,000 xg a 4° C, e o sobrenadante foi descartado;
- i) Para lavar a amostras, foram adicionados 200 µL de etanol 75% sobre o DNA (2 vezes) com o acréscimo de 1 lavagem com 200 µL de etanol 99% para melhor secagem do pellet, decorrida essas lavagens, as amostras foram centrifugadas por 1 min e o sobrenadante descartado;

- j) O DNA foi resuspenso em 35 μ L de tampão TE e quantificado em nanoespectrofotômetro (DO 260nm e razão DO 260/280) (NanoDrop DS-11, DeNovix, Wilmington, DE, USA). Estas foram mantidas em freezer -20°C.

4.1.2.2 Eletroforese em gel de agarose

Para checar a integridade do material genético, as amostras foram testadas com a técnica de Eletroforese em Gel de Agarose. Inicialmente, a solução tampão, 10x TAE Buffer (Life Technologies Brasil Com Ind Prod Bio LTDA, São Paulo, SP, Brasil), foi preparada para chegar à concentração de 1x. Para isso, 100 mL da solução tampão 10x TAE foi diluída em 900 mL de água miliQ. Este tampão foi utilizado para fazer o gel de agarose e para preenchimento da cuba de eletroforese. Como o DNA tem peso molecular alto, o gel de agarose foi feito na porcentagem de 1% nas seguintes concentrações:

- a) Em um béquer foi misturado 1 grama de agarose (1% agarose Life Technologies Corpor, Staley Road, New York, USA) para cada 100 mL da solução de 1x TAE (escala feita para um gel pequeno);
- b) A mistura foi colocada sobre uma placa pré-aquecida a 65 °C de um agitador magnético e após, foi colocado em micro-ondas até que a solução ficasse homogênea;
- c) Após a solução estar homogeneizada, esta foi colocada novamente sobre uma placa pré-aquecida a 65 °C de um agitador magnético e foi acrescentado 1,6 μ L de brometo de etídio (10 mg/mL);
- d) A solução foi colocada imediatamente em um suporte, anteriormente nivelado com a bancada e com os pentes em posição (para a confecção das canaletas para a inserção das amostras) para que o gel fosse solidificado.

Para correr o gel, foram adicionados 1 μ g de DNA por canaleta (dependendo da quantidade de DNA de cada amostra) homogeneizado com solução “*Loading Buffer*” (1 volume do buffer para cada 4 volumes da amostra de DNA). No primeiro slot de cada pente foram acrescentados 15 μ L de DNA *Ladder* (Invitrogen) e o gel com as amostras foi submetido à corrida horizontal em cuba da *Bio-Rad*[®] com potência de 70 V por 45 minutos. As imagens foram obtidas e analisadas através do *Bio-Rad Gel Doc System*[®] (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

4.1.3 Padronização dos *primers*

4.1.3.1 *Primer: diluição e armazenamento*

As sequências dos *primers* (*Forward* e *Reverse*) foram enviadas para síntese. Os *primers* para os genes ACT1, ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, PLB1, LIP3, SAP1 e SOD1 foram adquiridos liofilizados (Life Technologies Brasil Com Ind Prod Bio LTDA, São Paulo, SP, Brasil). Para seu preparo, os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 10,000 xg para que resquícios do pó não ficassem na tampa. Em seguida, estes foram suspensos em 0.1 mM (100 µM) de TE, pH 8,0, adicionando-se 10 µl de TE por nmol de *primer* (cada *primer* trazia a informação detalhada sobre a quantidade em nmol do mesmo, assim como seu peso molecular). Cada *primer* foi vortexado e deixado em temperatura ambiente por 15 minutos. Decorrido esse período, os *primers* foram quantificados em espectrofotômetro (*NanoDrop DS-11*, DeNovix). Essas soluções constituiriam a solução estoque de cada *primer forward* e *reverse*.

A concentração de cada solução estoque foi verificada colocando-se 1,25 µL da solução no espectrofotômetro. A concentração de 0,1mM da solução estoque deveria estar próxima a concentração esperada indicada pelo fabricante (podendo variar até 20% para mais ou para menos), e a razão A_{260}/A_{280} deveria estar entre 1,8 – 2,1. Para o preparo de soluções de trabalho, as soluções estoque foram diluídas em água de grau molecular (*Molecular Grade Water*, Ambion) a 1:10, para atingir a concentração de 10 µM (Ex: 100 µL de *primer forward* + 100 µL de *primer reverse* + 800 µL de H₂O = 1000 µL do *primer* na concentração de 10 µM). Alíquotas de 50 µL de cada solução trabalho foram armazenadas em freezer -20°C. Após, as soluções estoque a 100 µM foram armazenadas também em freezer -20°C.

4.1.3.2 *Análise in vitro e padronização dos primers*

Para verificar o tamanho do produto de PCR e se os *primers* eram detectados em outras espécies de *Candida*, os *primers* sintetizados foram testados contra um painel de DNA genômico das diferentes espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*), utilizando a técnica de PCR convencional seguida de eletroforese em gel de agarose. Foi realizado um controle negativo da expressão em água de grau molecular (*Molecular Grade Water*, Ambion). Em seguida, a concentração ótima de cada *primer* foi estabelecida e curvas padrão foram confeccionadas para cada gene a partir dos

produtos de PCR. A concentração ótima de cada *primer* bem como a confecção das curvas de concentração foram analisadas pela técnica de qPCR.

4.1.3.3 Especificidade dos primers por PCR seguido de eletroforese em gel de agarose

A técnica de PCR convencional foi realizada utilizando o kit *Taq DNA Polymerase, recombinant kit* (Life Technologies Corpor, Staley Road, New York, USA). Para uma reação de 50 μL , foi feito um master mix com os seguintes componentes para cada *primer* e para cada reação:

- 40,25 μL de água de grau molecular;
- 5 μL de iTaq Buffer 10X;
- 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM);
- 1 μL de dNTP mix (10 mM);
- 1 μL da solução trabalho do *primer* mix (10 μM – *Forward* e *Reverse*);
- 0,25 μL de iTaq DNA Polymerase.

Em tubos de 0,2 mL, foram pipetados 49 μL deste master mix e acrescentado 1 μL do DNA genômico de cada espécie de *Candida* na concentração de 200 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (*template*). O ciclo de amplificação do PCR foi:

Ciclo 1: 95°C por 3 minutos (ciclo de desnaturação inicial);

Ciclo 2: $\left\{ \begin{array}{l} 95^\circ\text{C por 15 segundos (desnaturação), \\ 50^\circ\text{C, } 55^\circ\text{C ou } 60^\circ\text{C por 30 segundos (temperatura de anelamento} \\ \text{que depende de cada } \textit{primer}); \\ 72^\circ\text{C por 30 segundos (ciclo de polimerização);} \end{array} \right.$

Repetir “Ciclo 2” por 39 vezes

Ciclo 3: 4°C por tempo infinito (∞ hold)

Os produtos de PCR então foram utilizados imediatamente para análise em gel de agarose a 2% e depois armazenados em freezer -20°C.

O Gel de Agarose foi confeccionado nas seguintes concentrações (escala feita para um gel grande):

- 150 mL de 1X TAE;
- 3 gramas de agarose;
- 1,2 μ L de brometo de etídio.

O gel foi corrido no aparelho horizontal *Bio-Rad* na potência de 60 V pelo tempo de 80 minutos. As imagens foram obtidas e analisadas através do *Bio-Rad Gel Doc System*[®] (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

4.1.3.4 Determinação da concentração ótima de cada primer

A concentração ótima de cada par de *primer* foi determinada utilizando a técnica de qPCR com o fluoróforo SYBR Green (Life Technologies Corpor, Staley Road, New York, USA) e DNA genômico de *C. albicans* na concentração de 10 η g/ μ L. Para se obter essa concentração, 5 μ L da amostra de DNA de *C. albicans* (200 η g/ μ L) obtido na extração do material genético (item 4.1.2) foi diluído em 95 μ L de água de grau molecular. Cada *primer* foi testado com diferentes concentrações de acordo com a característica de cada um. Os *primers* desenhados tiveram as concentrações testadas baseadas no resultado do gel de agarose corrido no teste de especificidade, que foi de 200 nM para os genes ACT1 b, ALS1, LIP3, HWPI b e PLB1, e 400 nM para os *primers* CAP1, CAT1 e EFG1 (pois apresentaram banda fraca quando testados com 200 nM). Para os *primers* da literatura, as concentrações foram baseadas na descrita pelos autores. As concentrações testadas estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 - Concentrações testadas para os diferentes *primers*

<i>Primers</i>	Concentrações testadas
<i>ACT1, ALS1, LIP3, HWPI b e PLB1</i>	200 nM; 250 nM; 300 nM; 350 nM
<i>CAP1, CAT1, EFG1 e SOD1</i>	300 nM; 350 nM; 400 nM; 450 nM
<i>SAPI</i>	400 nM; 450 nM; 500 nM; 550 nM; 600 nM; 650 nM
<i>HWPI (CT)</i>	400 nM; 450 nM; 500 nM; 550 nM

Fonte: Elaboração própria.

O volume dos reagentes utilizados para cada reação (volume final de 25 μ l) para teste da concentração de cada *primer* está descrito no Quadro 3. Os reagentes foram misturados formando um *Master Mix* (sem DNA) nas quantidades necessárias para que as reações ficassem em duplicatas na placa de qPCR. Os volumes que variam para cada concentração são os volumes da solução trabalho dos *primers* e da água.

Quadro 3 - Componentes do *Master Mix* para testar diferentes concentrações para os *primers*

	200 nM	250 nM	300 nM	350 nM	400 nM
Componente	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume
<i>DNA template</i>	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
2X SYBR Green Supermix	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l
10 μ M primer set	0,5 μ l	0,625 μ l	0,75 μ l	0,875 μ l	1 μ l
Água de grau molecular	11,5 μ l	11,375 μ l	11,25 μ l	11,125 μ l	11 μ l
Total	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l
	450 nM	500 nM	550 nM	600 nM	650 nM
Componente	Volume	Volume	Volume	Volume	Volume
<i>DNA template</i>	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
2X SYBR Green Supermix	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l	12,5 μ l
10 μ M primer set	1,125 μ l	1,25 μ l	1,375 μ l	1,5 μ l	1,625 μ l
Água de grau molecular	10,875 μ l	10,75 μ l	10,625 μ l	10,5 μ l	10,375 μ l
Total	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l

Note que os volumes que alteram são o volume da água e do *primer*.

Fonte: Elaboração própria.

Todos os volumes (de cada concentração para o Master Mix) foram multiplicados por 5,6 para plaqueamento em duplicata na placa de qPCR. Após a preparação do Master Mix, 61,25 μ L foram transferidos para tubos menores (0,65 mL) contendo alíquotas de 1,25 μ L do DNA *template* de *C. albicans*, ou 1,25 μ L de H₂O de grau molecular. O tubo foi vortexado gentilmente e 25 μ L do master mix com o DNA *template* ou H₂O de grau molecular (controle) foram plaqueados em duplicata na placa de qPCR. Foi realizada a análise de *Amplification Plots* (gráficos que mostram o padrão de amplificação exponencial de produtos de PCR) e valores de *C_q* ou *Quantification Cycle* (anteriormente chamado de *C_t* ou *Threshold Cycle*) obtidos durante a reação de qPCR para determinação da concentração ótima de cada *primer*. Considera-se a concentração ótima do *primer* aquela que apresentar menor *C_q*. Ciclo do qPCR:

Ciclo 1: 95°C por 10 minutos (ciclo de desnaturação inicial);

Ciclo 2: $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C por 15 segundos (desnatura\c{c}\tilde{a}\tilde{o}), \\ 50^{\circ}\text{C, } 55^{\circ}\text{C ou } 60^{\circ}\text{C por 30 segundos (temperatura de anelamento \\ que depende de cada } primer); \\ 60^{\circ}\text{C por 15 segundos (ciclo de polimeriza\c{c}\tilde{a}\tilde{o}); \end{array} \right.$

Repetir o “Ciclo 2” por 39 vezes

Melt Curve: $\left\{ \begin{array}{l} 55^{\circ}\text{C por 5 segundos} \\ 95^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$

4.1.3.5 Confecco de Curvas Padrão para Análise da Expressão Gênica

A curva padrão de cada *primer* foi confeccionada baseada no Produto de PCR dos *primers* para o DNA genômico de *C. albicans* (resultados da reação de PCR convencional com a concentração ideal de cada *primer* já determinada). Foi realizado PCR convencional com um total de 7 reações para cada gene para aumentar a eficiência do PCR. Mais precisamente, foi feito um master mix para cada par de *primer* com os componentes nos seguintes volumes para cada reação:

- 40,25 μL de água de grau molecular;
- 5 μL de iTaq Buffer 10X;
- 1,5 μL de MgCl_2 (50 mM);
- 1 μL de dNTP mix (10 mM);
- 1 μL da solução trabalho do *primer* mix (10 μM – Forward e Reverse);
- 0,25 μL de iTaq DNA Polymerase

Os volumes de água de grau molecular (40,25 μL) e solução trabalho do *primer* (1 μL) foram alterados de acordo com a concentração ótima de cada *primer*. Os volumes acima detalhados foram para a concentração ótima do *primer* de 200 nM. Por exemplo, o *primer* ALS1 teve sua concentração ótima avaliada em 300 nM, portanto, a quantidade de água de grau molecular foi alterada para 39,75 μL , enquanto para o *primer*, o volume foi alterado para 1,5 μL para chegar na concentração desejada.

Todos esses componentes foram misturados em tubos de 1,5 mL, vortexados e pipetou-se 49 μ L do master mix em tubos de 0,2 mL onde já estavam aliquotados 1 μ L do DNA genômico de *C. albicans* ou água de grau molecular. Os tubos foram levados à máquina de PCR com o mesmo ciclo citado no item 4.1.3.3., alterando a temperatura de anelamento de acordo com cada *primer*.

Posteriormente, os produtos de PCR obtidos das 7 reações (7 tubos) para cada *primer* com o DNA de *C. albicans* foram combinados e foi corrido um gel de agarose a 2% para checar a integridade do produto de PCR.

Após verificada a integridade, seguiu-se o protocolo de purificação do produto de PCR com o kit *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os volumes aqui estabelecidos foram contados para 7 reações de PCR convencional como mencionadas anteriormente. O protocolo para purificação dos produtos de PCR foi realizado da seguinte forma:

- a) Os produtos de PCR combinados de 7 reações foram diluídos com 1,700 μ L de Buffer PB;
- b) Em uma coluna de purificação *QIAquick* (*Qiagen*), instalada em um tubo coletor de 2 ml, foram colocados 700 μ L da amostra “a” para que houvesse a união do DNA (i.e., produto de PCR) à membrana da coluna de purificação e esta coluna foi centrifugada por 60 segundos a 14,000 xg;
- c) O líquido que ficou no tubo coletor foi descartado e mais 700 μ L da amostra da etapa “a” foram colocados na coluna;
- d) Os passos “b” e “c” foram realizados até que toda a amostra com os produtos de PCR fossem passadas pela coluna de purificação;
- e) A coluna então foi lavada com 750 μ L de Buffer PE e esta foi centrifugada novamente por 60 segundos a 14,000 xg;
- f) O líquido do tubo coletor foi descartado. A coluna foi colocada no mesmo tubo e esta foi centrifugada mais uma vez por 1 minuto para que a membrana de purificação secasse;
- g) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL com tampa;
- h) Para eluir o DNA e retirá-lo da membrana, foi acrescentado 50 μ L de Buffer EB no centro da membrana e esta foi centrifugada por 1 minuto com a mesma rotação;
- i) O eluente então consiste no Produto de PCR purificado. Estes foram armazenados em freezer -20°C.

Após purificação, os produtos de PCR foram quantificados em espectrofotômetro e assim foi possível calcular o rendimento do produto de PCR e o número de cópias que cada *primer* proporcionou com a técnica. Através da técnica de eletroforese em gel de agarose 2% verificou-se a integridade e o tamanho dos produtos de PCR purificados. O gel foi corrido com a quantidade de 250 ng de cada produto de PCR por canaleta.

O valor da concentração do produto de PCR foi utilizado para calcular o número de cópias de cada gene, utilizando a equação descrita por Yin et al.⁸⁵:

$$\text{Cópias/mL} = \frac{(6,023 \times 10^{23})(\text{concentração do produto de PCR em g/ml})}{(\text{Tamanho do produto de PCR em pb})(6,58 \times 10^2)}$$

Após o cálculo, os produtos foram diluídos em H₂O de grau molecular para 2×10^{10} cópias/mL, e em seguida foi realizada uma diluição seriada de 10 vezes (10 µL do produto de PCR + 90 µL água) até chegar a concentração de 2×10^2 cópias/mL. Com esta etapa, portanto, obteve-se a diluição seriada dos Produtos de PCR purificados.

4.1.3.6 Reação de qPCR para verificar a eficiência de cada primer

Após a realização da diluição seriada, a técnica de qPCR foi realizada para avaliar a eficiência e observar a qualidade da diluição dos produtos de PCR perante as Curvas de Concentração de cada gene específico. A concentração de cada *primer* para a realização do qPCR foi de acordo com aquela ótima estabelecida.

O *Master Mix* foi preparado [*Template*, 2x SYBR Green, *primer* (10 µM) e água de grau molecular] atentando-se para a utilização da quantidade de *primer* e H₂O específicos para a concentração de cada gene. O *Master Mix* foi realizado em quantidade adequada para fazer a reação em duplicata na placa de qPCR. Ao invés do DNA genômico de *C. albicans*, nesta etapa o *template* foi o próprio produto de PCR purificado de cada gene específico ou a H₂O de grau molecular para o *NTC* (controle - *No template control*). O ciclo de qPCR foi determinado de acordo com a temperatura de cada *primer* e os resultados avaliados no programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software* (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

Para todos os genes testados, o coeficiente de correlação foi de $\cong 1$ e a eficiência de reação de 90-110%, com slope de $\cong -3.3$. Após a definição das melhores concentrações para

cada *primer*, a otimização das reações de qPCR e a confecção das curvas padrão para qPCR para cada gene, esses *primers* estavam padronizados e poderiam ser utilizados para avaliar a expressão gênica de *C. albicans* em amostras clínicas.

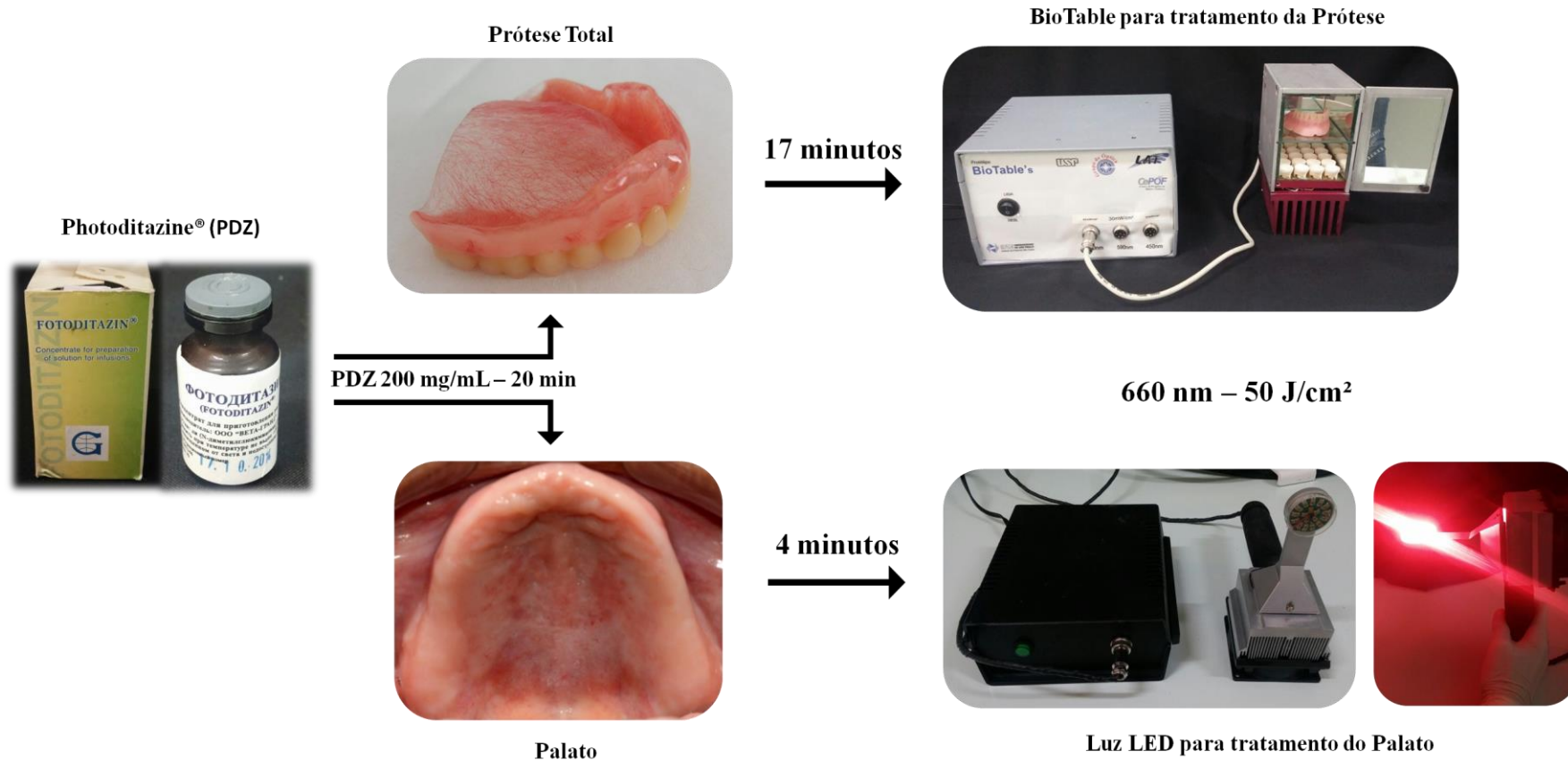
4.2 Estudo 2: Expressão gênica dos genes de virulência em isolados clínicos de pacientes submetidos à Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e Nistatina

4.2.1 Preparo das amostras

4.2.1.1 Tratamento dos pacientes

Previamente ao início dos experimentos, o projeto de pesquisa no qual as amostras foram obtidas, foi submetido ao “Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos” (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, o qual autorizou a execução do trabalho (ANEXO A). As amostras providas de pacientes foram coletadas no estudo da aluna de doutorado Fernanda Alves (Processo FAPESP 2014/01262-1). Nesta pesquisa, pacientes usuários de próteses totais superiores, com estomatite protética foram selecionados e aleatoriamente distribuídos em 2 grupos (n=30): Grupo A - aPDT (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana); e grupo B - NIS (Nistatina). No grupo aPDT os pacientes foram submetidos a aPDT: tanto a prótese total superior quanto o palato dos pacientes foram fotossensibilizados e tratados com o fotossensibilizador (FS) Photodithazine® (PDZ) (Rússia, Moscou) durante 20 minutos na concentração de 200 mg/mL e, posteriormente, iluminados com luz LED (660 nm – 50 J/cm²). O tratamento aPDT está ilustrado na Figura 3. Esse tratamento foi realizado três vezes por semana durante 15 dias, totalizando 6 sessões. No grupo B (NIS) os pacientes foram tratados com antifúngico Nistatina suspensão oral (100.000 UI/mL), 4 vezes ao dia, por 15 dias, sendo orientados a fazerem bochechos durante 1 minuto com a medicação. Os pacientes foram acompanhados por até 60 dias após o início dos tratamentos.

Figura 3 - Exemplificação do tratamento aPDT



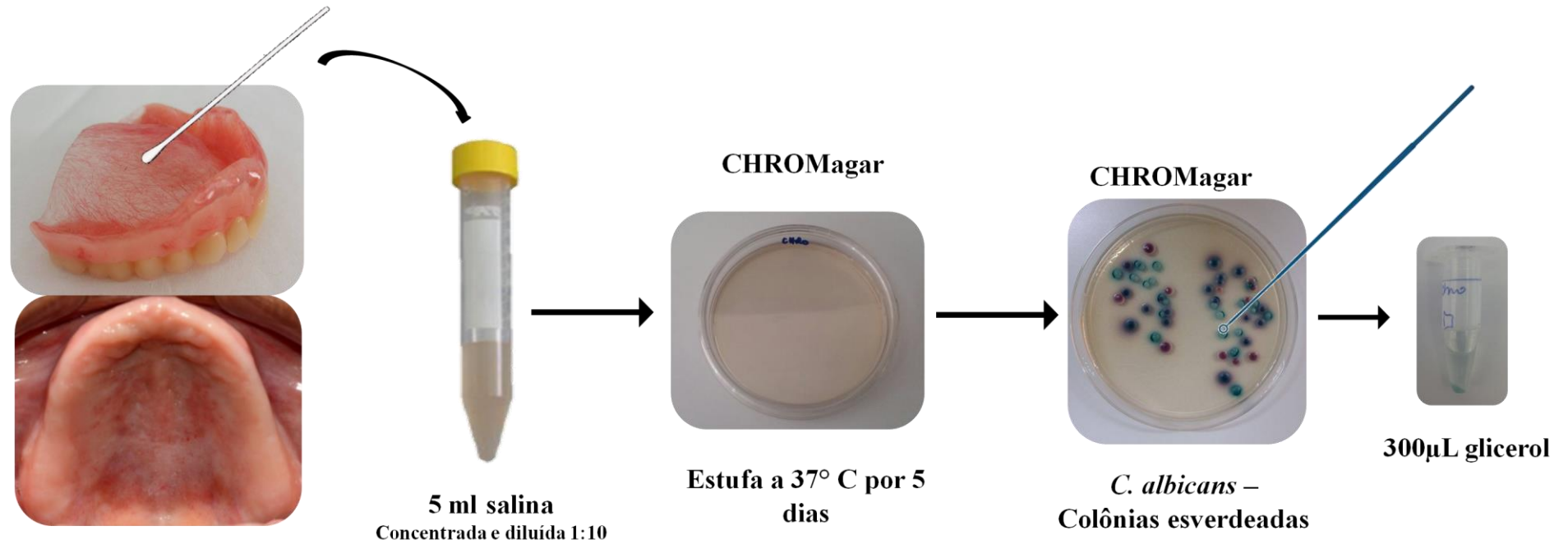
Inicialmente o Photoditazine® era preparado em gel de natrosol para que atingisse a concentração de 200 mg/mL. Posteriormente era aplicado sobre a prótese total superior e o palato dos pacientes, os quais foram fotossensibilizados por 20 minutos. Decorrido este período, a prótese foi submetida ao tratamento com luz LED por 17 minutos no aparelho Biotable (CEPOF/UFSCAR) enquanto que o palato era irradiado com luz LED (660nm) em um dispositivo oral por 4 minutos para que ambos atingissem dose de luz de 50 J/cm².

Fonte: Elaboração própria.

4.2.1.2 Coleta e armazenamento das amostras

Coletas microbiológicas do palato e da prótese dos pacientes foram realizadas com o auxílio de *swabs* (Absorve, Cral, Cotia, São Paulo, Brasil), com movimentos de remoção das células microbianas (raspagem) por 60 segundos, nos seguintes períodos: pré-tratamento, pós-tratamento e nos períodos de acompanhamento (30, 45 e 60 dias após o início do tratamento). Estes *swabs* foram colocados em tubos falcon contendo 5 mL de solução salina estéril. Os tubos foram então vortexados durante 60 segundos para que houvesse o desprendimento das células. A amostra inicial, armazenada em salina, foi diluída 1:10 (100 µL da amostra em 900 µL de salina) para fazer o plaqueamento. A amostra original e diluída 1:10 foram plaqueadas em duplicata em placas com meio *CHROmagar Candida Medium* (BD, Difco, New Jersey, USA). Este meio é um método preliminar utilizado no isolamento de fungos para diferenciação presuntiva de *Candida* spp. De 3 a 5 colônias verdes (presuntivamente *C. albicans*/*C. dubliniensis*) que cresceram neste meio foram armazenadas em 300 µL de glicerol (50%) (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e congeladas em freezer -80°C. As amostras com as colônias verdes (*C. albicans*) armazenadas em glicerol foram submetidas a extração de RNA (Figura 4).

Figura 4 - Exemplificação da coleta das amostras



Coletas do palato e da prótese foram realizadas com o auxílio de swabs. Estes swabs foram colocados em tubos falcon contendo 5 mL de solução salina estéril e homogeneizados por 1 minuto. A amostra concentrada e diluída 1:10 foram plaqueadas em duplicata em placa contendo meio CHROMagar *Candida* e foram armazenadas em estufa a 37 °C por 5 dias. De 3 a 5 colônias verdes (presuntivamente *C. albicans*) foram armazenadas individualmente em 300 µL de glicerol (50%) e congeladas em freezer -80°C.

Fonte: Elaboração própria.

4.2.2 Análise da expressão gênica

4.2.2.1 Extração de RNA dos isolados clínicos

Para a extração do RNA dos isolados clínicos, os tubos contendo as colônias citadas foram descongelados e o protocolo para Extração de RNA “fenol – clorofórmio” descrito por Cury et al.¹⁹ foi realizado com algumas modificações:

- a) Adição de 300 μ L de 1x PBS gelado nos microtubos contendo os isolados clínicos e centrifugação dos mesmos a 10,000 xg por 15 minutos a 4°C para que houvesse a formação do pellet e conseqüente descarte do sobrenadante para remoção do glicerol;
- b) Lavagem do *pellet* com 600 μ L de 1x PBS gelado;
- c) Este tubo foi novamente lavado com 1 x PBS e centrifugado nas mesmas condições para que fosse realizada a segunda lavagem das células;
- d) 750 μ L de NAES (833 μ L de Acetato de Sódio 3M na concentração de 50 mM + 1 mL de 0,5 M EDTA, na concentração de 10 mM + 5 mL de Solução SDS a 10% na concentração final de 1% + 43,167 ml de água de grau molecular) foram adicionados à solução e o *pellet* foi ressuspensionado e vortexado por 30 segundos até formar uma suspensão homogênea;
- e) Foram adicionados 750 μ L de Ácido Fenol (5:1, pH 4,5, Ambion) em cada tubo e esta solução foi homogeneizada;
- f) A mistura foi transferida para um tubo de 2 mL contendo 0,8 g de bolinhas de vidro (0,1 mm) e este, depois de misturado, foi colocado no aparelho de ruptura mecânica das células (*BeadBeater*) por 1 minuto;
- g) Após esse processo, as amostras foram colocadas em gelo por 1 minuto;
Observação: os passos “f” e “g” foram repetidos mais 4 vezes;
- h) Estes tubos foram centrifugados a 10,000 xg por 5 minutos a 4°C e a parte aquosa da solução (onde se encontra o material genético) foi recuperada o máximo possível para um novo microtubo, o restante da reação (solução oleosa correspondente ao fenol e proteínas) foi descartado;
- i) Em cada amostra foram adicionados mais 750 de fenol ácido. O tubo foi invertido gentilmente, e estes foram deixados em temperatura ambiente por 1 minuto (para que o fenol tivesse maior efetividade) e os tubos foram novamente centrifugados a 12,000 rcf por 5 minutos a 4°C;

- j) O tratamento com Fenol ácido (passo “i”) foi repetido mais uma vez;
- k) A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 750 μL de solução 24:1 de clorofórmio:álcool Isoamílico (CHLO: 48 mL de Clorofórmio + 2 mL de álcool isoamílico);
- l) Este tubo foi invertido gentilmente e novamente centrifugado a 14.000 xg por 5 minutos a 4°C;
- m) Após centrifugação a parte aquosa foi novamente removida para um novo tubo e esta já é caracterizada como o RNA bruto;
- n) Foram adicionados 60 μL de acetato de sódio 3M, pH 5, homogeneizados com o RNA bruto e posteriormente adicionados 600 μL de isopropanol gelado;
- o) As amostras ficaram incubadas *overnight* em freezer -80°C;
- p) Decorrido o tempo de incubação, o pellet do RNA foi recuperado por centrifugação dos tubos a 12,000 xg por 30 minutos a 4°C;
- q) O pellet foi lavado 3 vezes com 500 μL de Álcool 75%, com centrifugações de 5 minutos nos intervalos das lavagens, e uma lavagem extra com álcool 99% foi realizada no final para melhor secagem do *pellet*;
- r) O excesso do álcool foi removido e os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente sobre lenços de papel para que os *pellets* secassem;
- s) Cada *pellet* seco foi então ressuspendido em 100 μL de H₂O de grau molecular e deixados em gelo por 1 hora para hidratação. A concentração do RNA bruto foi quantificada em nanoespectrofotômetro (1,25 μL da amostra).

As amostras de RNA bruto (250 ηg do RNA por *slot*) foram analisadas via eletroforese em gel de agarose (2%) para analisar integridade do RNA antes de passar para a fase de Purificação do RNA.

4.2.2.2 Purificação do RNA

A purificação das amostras de RNA foi realizada após quantificação das amostras de RNA bruto, pois o mesmo ainda podia apresentar contaminação com DNA. Para isso, utilizou-se o kit de purificação “*Qiagen Rneasy MinElute Protocol*” (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo metodologia proposta por Cury et al.¹⁹. Este protocolo contém 3 passos incluindo duas fase de tratamento da amostra com DNase I (um tratamento em coluna e outro em solução) e a limpeza das amostras de RNA.

4.2.2.3 Primeira etapa da Purificação (tratamento com DNase I em coluna)

Antes de começar a purificação, foi preparado uma solução contendo 10 μL de β -mercaptoetanol para cada 1 mL do Buffer RLT (foram preparados inicialmente 50 mL). Assim iniciou-se o protocolo com os seguintes passos:

- a) As amostras foram ajustadas para o volume de 100 μL utilizando água de grau molecular;
- b) Adicionou-se alíquotas de 350 μL do Buffer RLT contendo o β -mercaptoethanol e as amostras foram vortexadas;
- c) Em seguida, foram adicionados 250 μL de álcool 99% e a amostra foi misturada pela técnica de pipetagem (“*up and down*”);
- d) 700 μL de cada amostra foram colocados em colunas individuais com membranas de purificação do kit *RNeasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 ml. Estas foram centrifugadas a 12.000 xg por 15 segundos e o sobrenadante do tubo coletor foi descartado;

Algumas amostras tiveram que ter mais de três colônias unidas, aumentando consequentemente o volume da reação. Quando isto ocorreu, os reagentes dos passos “a – d” foram recalculados e a etapa “d” foi repetida.

- e) Foi preparado um *master mix* com os componentes: 50 μL de H_2O de grau molecular; 175 μL de Buffer RLT contendo β -mercaptoethanol; e 125 μL de álcool 99% para cada amostra. Este *master mix* foi colocado sobre a membrana de purificação e esta foi novamente centrifugada em velocidade máxima por 15 segundos. O volume no tubo coletor foi descartado;
- f) Posteriormente, foram adicionados 350 μL de Buffer RW1 à coluna e esta foi novamente centrifugada em máxima velocidade por 15 segundos. O volume no tubo coletor foi descartado e um novo tubo coletor foi colocado sob a coluna de purificação;
- g) Uma mistura de 60 μL de DNase I solução estoque com 70 μL de Buffer RDD foi colocada sobre a coluna de purificação (com a amostra) e esta foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente;
- h) Decorrido este período, foram adicionados 500 μL de Buffer RPE sobre a coluna de purificação e as amostras foram centrifugadas por 15 segundos em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;
- i) Foram adicionados 500 μL de Álcool 75 % sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação e esta foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;

- j) O volume no tubo coletor foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos em velocidade máxima para que a membrana de purificação fosse seca;
- k) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;
- l) Foram adicionados 20 μL de H_2O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA resultando da primeira etapa de purificação;
- m) A quantidade de RNA e a pureza da amostra foram analisadas por nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280) utilizando 1,25 μL da amostra. Leitura em duplicata.

O protocolo “*Micro kit*” é indicado para ser utilizado em amostras nas quais o rendimento do RNA esteve entre 1 e 45 μg . Nas amostras onde o rendimento foi maior que 45 μg , utilizou-se o mesmo protocolo com algumas alterações (*Mini kit*). As diferenças entre os protocolos são: 1) As colunas de purificação da primeira etapa são diferentes (*RNeasy MinElute column* para *Micro kit* e *RNeasy column* para *Mini kit*); 2) Adição de 500 μL de Buffer RPE ao invés de álcool 75% (item “i”); e 3) No item “l” foram adicionados 30 μL ao invés de 20 μL utilizado no *Micro kit*.

4.2.2.4 Segunda etapa da Purificação (Tratamento com DNase I em solução)

As amostras no volume de 100 μL foram incubadas com a enzima Turbo DNase (Ambion) com o equivalente a 2 μL da enzima para cada 10 μg de RNA. A incubação foi realizada em banho seco na temperatura de 37° C por 30 minutos. Após este tratamento, as amostras foram imediatamente submetidas à terceira etapa da purificação que consiste na remoção dessa enzima através de colunas do kit de purificação *RNeasy MinElute clean-up kit* (Qiagen).

4.2.2.5 Terceira etapa da Purificação

- a) À cada amostra, adicionou-se alíquotas de 350 μL do Buffer RLT contendo o β -mercaptoethanol e as amostras foram vortexadas;
- b) Em seguida, foram adicionados 250 μL de álcool 99% e a amostra foi misturada pela técnica de pipetagem (“*up and down*”);

- c) 700 μL da amostra foram colocados nas membranas de purificação do kit *RNeasy MinElute* instaladas em tubos coletores de 2 mL. Estas foram centrifugadas em velocidade máxima por 15 segundos e o volume no tubo coletor foi descartado;
- d) Foram adicionados 500 μL de Buffer RPE sobre a coluna de purificação e as amostras foram centrifugadas por 15 segundos em velocidade máxima. O volume no tubo coletor foi descartado;
- e) Foram adicionados 500 μL de etanol 75% sobre a amostra fixada na membrana da coluna de purificação e esta foi centrifugada por 2 minutos em velocidade máxima para secar a membrana de purificação;
- f) O volume no tubo coletor foi descartado e a amostra foi novamente centrifugada por 5 minutos em velocidade máxima para que a membrana de purificação fosse seca;
- g) O tubo coletor foi descartado e a coluna de purificação foi transferida para um microtubo novo;
- h) Foram adicionados 20 μL de H_2O de grau molecular sobre o centro da coluna de purificação (atentando-se para que a água recobrisse toda a membrana) e as amostras foram novamente centrifugadas por 60 segundos em velocidade máxima. O eluente foi então armazenado com o RNA puro;
- i) A quantidade de RNA e a pureza da amostra foram analisadas por nanoespectrofotômetro (DO 260 nm e Razão DO 260/280) utilizando 1,25 μL da amostra. Leitura em duplicata.
- j) As amostras foram submetidas a técnica de eletroforese em gel de agarose (2%) para analisar integridade e ausência de DNA. Foi utilizado 0,250 μg do total do RNA para cada canaleta.

4.2.2.6 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA (DNA complementar obtido a partir de uma alíquota de mRNA), foi realizada através do kit *Bio-Rad iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA). Em um tubo estéril, os seguintes componentes foram misturados para que a reação final ficasse com 20 μL :

- 1 μg de RNA
- 5 X iScript Rxn mix - 4 μL
- Reverse Transcriptase - 1 μL
- Água de grau molecular – o volume dependeu do volume do RNA

Os volumes dos reagentes do Master Mix foram adequados para a realização do cDNA em duplicata (+RT, cDNA I e cDNA II). Um controle negativo (-RT) também foi realizado onde ao invés do volume da enzima Transcriptase Reversa, foi colocado a mesma quantidade em volume de água de grau molecular. Se a amostra estivesse contaminada com DNA, apareceria amplificação de produto de PCR no controle negativo. O ciclo para conversão do RNA em cDNA foi realizado usando a *Bio-Rad PCR Machine (CFX96)* nas seguintes condições:

- 5 min a 25°C;
- 30 minutos a 42°C;
- 5 minutos a 85°C;
- ∞ hold a 4°C.

4.2.2.7 Expressão gênica via qPCR

Após a síntese do cDNA, realizou-se qPCR para quantificação da expressão gênica (sem diluição das amostras de cDNA). Para o qPCR, utilizou-se as curvas padrão confeccionadas com os produtos de PCR de cada gene nas diferentes diluições. Cada placa continha a curva de concentração do gene específico em duplicata e as amostras dos pacientes dos dois grupos também em duplicata. Foi realizada uma placa para o cDNA I e uma para o cDNA II.

Os reagentes utilizados para uma reação de 25 µL de qPCR foram: SYBR Green (12,5 µL); *primer* (volume foi dependente da concentração ótima de cada um) e H₂O (dependente do volume do *primer* para que atingisse o volume de 25 µL).

Foram aliquotados 61,25 µL desse *master mix* em tubinhos contendo 1,25 µL do *template* [cDNA I, II ou H₂O (NTC - controle negativo)] e esta solução foi distribuída em duplicata na placa para qPCR. O ciclo térmico da máquina de qPCR foi:

Ciclo 1: 95°C por 10 minutos (ciclo de desnaturação inicial);

Ciclo 2: $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C por 15 segundos (desnatura\c{c}\tilde{a}\tilde{o}), \\ 55^{\circ}\text{C por 30 segundos (temperatura de anelamento} \\ \text{dependente de cada } \textit{primer}); \\ 60^{\circ}\text{C por 15 segundos (ciclo de polimeriza\c{c}\tilde{a}\tilde{o}); \end{array} \right.$

Repetir o “Ciclo 2” por 39 vezes

Melt Curve: $\left\{ \begin{array}{l} 55^{\circ}\text{C por 5 segundos} \\ 95^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$

O resultado foi analisado no programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software* (Bio-Rad Laboratories, Alfred Nobel Drive, Hercules, CA, USA).

4.3 Análise Estatística

Os dados obtidos a partir do RT-qPCR para os genes objetivos do estudo foram tratados estatisticamente para avaliar a expressão gênica longitudinal entre as coletas dos pacientes (nos diferentes tempos) e entre os diferentes grupos (aPDT e NIS). Para isso, utilizou-se o *software SPSS Statistics* (IBM, USA). Os dados foram submetidos à Análise de Variância de Medidas Repetidas Mista, seguido de pós-teste de Bonferroni para comparação entre grupos ($\alpha = 0,05$) (Apêndice A). Os pressupostos avaliados foram: normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk; homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene; e esfericidade através do teste de Mauchly.

5 RESULTADO

5.1 Estudo 1: Análise e padronização de *primers* para utilização na técnica de RT - qPCR

5.1.1 Análise in silico – *Primers* da literatura

Os *primers* da literatura para os genes ACT1, HWP1, PLB1, LIP3, SAP1, SAP4, SOD1, SOD5, ALS1, ALS3, CAP1, CAT1 e EFG1 foram submetidos a uma abordagem in silico passo a passo, como descrito na metodologia. Os resultados dessa análise estão descritos no Quadro 4.

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continua)

Gene	Primers (F: Forward; R: Reverse)	Vantagens	Desvantagens	Referência
<i>ACT1</i>	F - ACCACCGGTATTGTTTTGGA R - AGCGTAAATTGGAACAACGT G	- CG% apropriada para F (45%) e R (42,9%) - GC Clamp no F e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp (F e R) - Tamanho do produto pequeno (60 pb) - Alta Tm para F e R (63,8°C) - Hairpin no F (-1,5 kcal/mol) e R (-1,9 kcal/mol) - Self Dimer no F (-7,3 kcal/mol) e R (-3,4 kcal/mol)	Komalapriya et al. ⁴⁰
	F - TGCTGAACGTATGCAAAAGG R - TGAACAATGGATGGACCAGA	- Tamanho do produto apropriado (186pb) - CG% apropriada para F e R (45%) -GC Clamp no F e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Alta Tm (63°C) - Hairpin no F (-2,0 kcal/mol) e R (-1,5 kcal/mol) - Self Dimer no F (-3,5 kcal/mol) e R (-1,5 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,2 kcal/mol)	Alves et al. ²
	F: TTTCATCTTCTGTATCAGAGG AACTTATTT R: ATGGGATGAATCATCAAACA AGAG		- Estes <i>primers</i> não foram encontrados na sequência do gene ACT1 – <i>C. albicans</i> a partir do <i>Candida Genome Database</i> e PubMed - Homologia com as espécies de <i>Candida</i> (F e R) - Homologia com o gene DAD1 - Inadequada porcentagem de GC no F (30%) e R (37,5%) - Alta Tm no F (64,9°C) e R (63,3°C) - Hairpins no F (-2,5 kcal/mol) e R (-2.2 kcal/mol) - Self Dimers no F (-2,5 kcal/mol) e R (-3,5 kcal/mol) - GC Clamp no F e R (3 kcal/mol) -Cross Dimer (-4,7 kcal / mol)	Nailis et al. ⁶⁰

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continuação)

ALS1	F – GACTAGTGAACCAACAAATA CCAGA R – CCAGAAGAACAGCAGGTGA	- Ausência de hairpins no F e R - CG% apropriada para F (40%) e R (50%) - Baixa porcentagem de homologia do F e R com os genes da família ALS quando analisados em Clustal -GC Clamp no F e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto grande (318 pb) - Alta Tm para F (64,7°C) e R (64,1°C) - Self Dimer no F (-4,6 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,5 kcal/mol)	Green et al. ³³
	F – CAAGTTACCTCATCCTCACCT TCA R – GATAATAGAACCAGAGCCAT CGTATG	- CG% apropriada para F (45,8%) e R (42,3%) -GC Clamp no F e R (1 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto pequeno (72 pb) - Alta Tm para F (66,1°C) e R (65°C) - Harpin no F e R (-0,6 kcal/mol) - Self Dimer no F e R (-0,6 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,0 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia do F e R com o gene ALS3 quando analisado em Clustal	Chen et al. ¹⁶
	F – CCCAACTTGGAATGCTGTTT R – TTTCAAAGCGTCGTTTCACAG	- CG% apropriada para F e R (45%) -GC Clamp no F e R (1 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto grande (223 pb) - Alta Tm para F (63,2°C) e R (63,4°C) - Self Dimer no F (-2,7 kcal/mol) e R (-0,2 kcal/mol) - Cross Dimer (-2,6 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia do F e R com os genes da família ALS quando analisado em Clustal	Alves et al. ²
ALS3	F – CTGCTCAAACAAATCCAAGTG TTC R – CCATTTCCGTGTTCCTTTAG TAG	- CG% apropriada para F (41,7%) e R (40%) -GC Clamp no F e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto pequeno (76 pb) - Alta Tm para F (65,1°C) e R (64,2°C) - Harpin no F (-2,2 kcal/mol) - Self Dimer (-4,5 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia do F e R com o gene ALS1 quando analisado em Clustal	Chen et al. ¹⁶

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continuação)

	F – CTGGACCACCAGGAAACACT R - GGTGGAGCGGTGACAGTAGT	- CG% apropriada para F (55%) e R (60%) -GC Clamp no F (1 kcal/mol) e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto grande (226 pb) - Alta Tm para F (66°C) e R (67,9°C) - Hairpin no F (-3,1 kcal/mol) - Self Dimer (-5,2 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia do F e R com os genes da família ALS quando analisado em Clustal	Alves et al. ²
CAP1	F- ACCTGAAAAACAAGAGAAAG GTAAAT R - GGTGGAGCGGTGACAGTAGT	- Tamanho do produto apropriado (96 pb) - CG% apropriada para R (55,6%)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Alta Tm para F (63,6°C) e R (64,6°C) - GC% inapropriado para F (30,8%) - Hairpin no F (-2,8 kcal/mol) - Self Dimer no F (-2,8 kcal/mol) e R (-9,2 kcal/mol) - Cross Dimer (-2,1 kcal/mol)	Komalapriya et al. ⁴⁰
	F – ACCGTGAACGTAAAGAACG R - GCTACCACCAGTATATTTAGC C	- Tamanho do produto apropriado (152 pb) - CG% apropriada para F (47,4%) e R (45,5%)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Alta Tm para F and R (62,2°C) -GC Clamp no F (2 kcal/mol) e R (3 kcal/mol) - Self Dimer no F (-3,4 kcal/mol) e R (-2,5 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,3 kcal/mol)	Dai et al. ²⁰
CAT1	F – TGGTTTTATTCTCCGACAGAG G R - TGACCAGAGTAACCATTTCATT TCT	- CG% apropriado para F (45,5%) -GC Clamp no F (2 kcal/mol) e R (1 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - GC% inapropriado para F (37,5%) - Tamanho do produto pequeno (64 pb) - Alta Tm para F (64°C) e R (63,9°C) - Hairpin no F (-1,0 kcal/mol) e R (-0,9 kcal/mol) - Self Dimer no F (-1,0 kcal/mol) e R (-0,9 kcal/mol) - Cross Dimer (-4,1 kcal/mol)	Komalapriya et al. ⁴⁰
EFG1	F – CATCACAACCAGGTTCTACAA CCAAT R - CTACTATTAGCAGCACCACCC	- Tamanho do produto apropriado (103 pb) - CG% apropriada para F (42,3%) e R (52,4%) -GC Clamp no F (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Alta Tm para F (67,6°C) e R (64,1°C) - Harpin no F (-2,7 kcal/mol) e R (-0,1 kcal/mol) -GC Clamp no R (3 kcal/mol) - Self Dimer no F (-2,7 kcal/mol) e R (-0,1 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,5 kcal/mol)	Hnisz et al. ³⁵

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continuação)

HWPI	F – GAAACCTCACCAATTGCTCCA G R - GTAGAGACGACAGCACTAGA TTCC	- Tamanho do produto apropriado (92 pb) - CG% apropriada para F e R (50%) -GC Clamp no F e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Alta Tm para F (65,9°C) e R (66,1°C) - Hairpin no R (-0,1 kcal/mol) - Self Dimer no F (-4,6 kcal/mol) e R (-1,7 kcal/mol) - Cross Dimer (-3,3 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com o gene HWP2 quando analisado em Clustal	Hnisz et al. ³⁵
	F - GACCGTCTACCTGTGGGACAG T R - GCTCAACTTATTGCTATCGCT TATTACA		- Estes <i>primers</i> não foram encontrados na sequência do gene HWP1 – <i>C. albicans</i> a partir do <i>Candida Genome Database</i> e PubMed - Homologia com as species de <i>Candida</i> . (F e R) - Homologia com o gene DAD1 - Inadequada porcentagem de GC% no F (35,7%) e R (59,15%) - Alta Tm no F (69,6°C) e R (65,9°C) - Hairpins no F (-2,6 kcal/mol) e R (-0,7 kcal/mol) - Self Dimers no F (-2,6 kcal/mol) e R (-0,7 kcal/mol) -Cross Dimer (-1,0 kcal / mol)	Nailis et al. ⁶⁰
	F – TCTACTGCTCCAGCCACTGA R - CCAGCAGGAATTGTTCCAT	- CG% apropriada para F (55%) e R (45%) -GC Clamp no F (1 kcal/mol) e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto grande (248 pb) - Alta Tm para F (66,8°C) e R (62,7°C) - Self Dimer no F (-1,8 kcal/mol) e R (-2,5 kcal/mol) - Cross Dimer (-4,8 kcal/mol)	Alves et al. ²
LIP3	F – TCTCACCGAGATTGTTGTTGG A R - GTTGGCCATCAAATCTTGCA	- CG% apropriada para F (45,5%) e R (45%) -GC Clamp no F e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto pequeno (68 pb) - Alta Tm para F (65,8°C) e R (63,6°C) - Hairpin no F (-2,3 kcal/mol) e R (-0,8 kcal/mol) - Self Dimer no F (-2,3 kcal/mol) e R (-0,8 kcal/mol) - Cross Dimer (-2,9 kcal/mol)	Nailis et al. ⁶⁰

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continuação)

PLBI	F – CCTATTGCCAAACAAGCATTG TC R – CCAAGCTACTGATTTACCTG CTCC	- CG% apropriada para F (43,5%) e R (52%) -GC Clamp no F (1 kcal/mol) e R (2 kcal/mol) - Tamanho do produto adequado (163 pb)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Alta Tm para F (65°C) e R (69,5°C) - Hairpin no F (-2,2 kcal/mol) e R (-1,8 kcal/mol) - Self Dimer no F (-2,2 kcal/mol) e R (-3,1 kcal/mol) - Cross Dimer (-3,3 kcal/mol)	Naglik et al. ⁵⁹
	F – GGTGGAGAAGATGGCCAAAA R - AGCACTTACGTTACGATGCAA CA	- CG% apropriada para F (50%) e R (43,5%) - GC Clamp no F (1 kcal/mol) e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto pequeno (60 pb) - Alta Tm para F (64,5°C) e R (67,1°C) - Hairpin no F (-1,5 kcal/mol) e R (-2,0 kcal/mol) - Self Dimer no F (-7,3 kcal/mol) e R (-3,5 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,3 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com os genes da família PLB quando analisado em Clustal	Nailis et al. ⁶⁰
	F – GCTCTTTTCAACGAAGCGGTG T R - GCCATCTTCTCCACCGTCAAC T	- CG% apropriada para F (50%) e R (54,5%) - GC Clamp no F (1 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) -Tamanho do produto grande (213 pb) - Alta Tm para F (68,2°C) e R (68,8°C) - Hairpin no F (-1,8 kcal/mol) - GC Clamp on R (3 kcal/mol) - Self Dimer no F (-1,8 kcal/mol) - Cross Dimer (-5,6 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com os genes da família PLB quando analisado em Clustal	Alves et al. ²
SAPI	F – TCAATCAATTTACTCTTCCATT TCTAACA R - CCAGTAGCATTAAACAGGAGTT TTAATGACA	- Tamanho do produto apropriado (161 pb) - Baixa porcentagem de homologia com os genes SAPs quando analisados em Clustal -GC Clamp no F (1 kcal/mol) e R (2 kcal/mol)	- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - CG% inapropriada para F (27,6%) e R (36,7%) - Alta Tm para F (63,7°C) e R (67,6°C) - Hairpin no R (-3,6 kcal/mol) - Self Dimer no F (-1,1 kcal/mol) e R (-3,6 kcal/mol) - Cross Dimer (-2,5 kcal/mol)	Naglik et al. ⁵⁹

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continuação)

	<p>F - CAATGCTGCCACTGGACAAAT C R - CAATTCAGCTTGGGAAGGCATC A</p>	<p>- CG% apropriada para F (50%) e R (45,5%) -GC Clamp no F (1 kcal/mol) e R (1 kcal/mol)</p>	<p>- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) -Tamanho do produto grande (238 pb) - Alta Tm para F (66,8°C) e R (65,7°C) - Hairpin no R (-0,7 kcal/mol) - Self Dimer no F (-1,5 kcal/mol) e R (-3,1 kcal/mol) - Cross Dimer (-3,9 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com oos genes da família SAP quando analisado em Clustal</p>	Alves et al. ²
	<p>F - AACCAATAGTGATGTCAGCA GCAT R - ACAAGCCCTCCCAGTTACTTT AAA</p>		<p>- Homologia com <i>Candida</i> spp. - Estes <i>primers</i> não foram encontrados nas sequências de SAP1 para <i>C. albicans</i> nas sequências do <i>Candida</i> Genome Database e PubMed</p>	Nailis et al. ⁶⁰
SAP4	<p>F - TTATTTTTAGATATTGAGCCC ACAGAAA R - GCCAGTGTCAACAATAACGCT AAGTT</p>	<p>- Tamanho do produto apropriado (171 pb) - GC% apropriada para R (42,3%) -GC Clamp no F (1 kcal/mol)</p>	<p>- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - CG% inapropriado para F (28,6%) - Alta Tm para F (63,6°C) e R (68,2°C) - Hairpin no F (-0,2 kcal/mol) e R (-0,7 kcal/mol) -GC Clamp no R (3 kcal/mol) - Self Dimer no F (-0,6 kcal/mol) e R (-1,0 kcal/mol) - Cross Dimer (-2,5 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com todos os genes da família SAP, principalmente SAP6 quando analisados em Clustal.</p>	Naglik et al. ⁵⁹

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (continuação)

	<p>F – GTCAATGTCAACGCTGGTGTC C R – ATTCCGAAGCAGGAACGGAA AT</p>	<p>- Appropriate CG% for F (54,5%) and R (45,5%) -GC Clamp no F (2 kcal/mol) e R (2 kcal/mol)</p>	<p>- Homologia com <i>Candida</i> spp., SAP4 e SAP6 (F e R) - Tamanho do produto grande (211 pb) - Alta Tm para F (68,3°C) e R (66,8°C) - Hairpin no R (-4,9 kcal/mol) - Self Dimer no R (-4,9 kcal/mol) - Cross Dimer (-1,8 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com todos os genes da família SAP, principalmente SAP4 e SAP6 quando analisados em Clustal.</p>	Alves et al. ²
	<p>F – AAACGGCATTGGAATCTGGAA R - CAAAAAGCTTAGCGTTATTGTT GACACT</p>		<p>- Estes <i>primers</i> não foram encontrados na sequência do gene SAP4 – <i>C. albicans</i> a partir do <i>Candida Genome Database</i> e PubMed - Homologia com as espécies de <i>Candida</i> (F e R) - Inadequada porcentagem de GC% no F (38,1%) e R (33,3%) - Alta Tm no F (63°C) e R (65,2°C) - Hairpins no F (-0,2kcal/mol) e R (-0,7 kcal/mol) - Self Dimers no F (-0,2 kcal/mol) e R (-1,0 kcal/mol) -Cross Dimer (-3,1 kcal / mol)</p>	Nailis et al. ⁶⁰
SOD1	<p>F - TCCAGAAGATGATGAAAGAC ATG R – GTCTAGCACCAGCATGACCAG</p>	<p>- GC% apropriada para F (39,1%) e R (57,1%) -GC Clamp no F e R (1 kcal/mol)</p>	<p>- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F and R) - Tamanho do produto grande (212 pb) - Alta Tm para F (62,4°C) e R (67°C) - Hairpin no F (-0,6 kcal/mol) e R (-1,2 kcal/mol) - Self Dimer no F e R (-2,3 kcal/mol) - Cross Dimer (-2,5 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com os genes da família SOD, principalmente o SOD6 quando analisado em Clustal - Usado para <i>Northern Blot</i></p>	Martchenko et al. ⁴⁶

Quadro 4 - Resultado da pesquisa in silico dos *primers* publicados na literatura (conclusão)

	<p>F - TTGAACAAGAATCCGAATCC R - AGCCAATGACACCACAAGCA G</p>	<p>- CG% apropriado para F (40%) e R (52,4%) - Ausência de Hairpins - Tm apropriada para F (59,9°C) - GC Clamp no F (2 kcal/mol)</p>	<p>- Homologia com <i>Candida</i> spp. (F e R) - Tamanho do produto grande (396 pb) - Alta Tm para R (67,7°C) - GC Clamp no R (3 kcal/mol) - Self Dimer no F (-0,7 kcal/mol) - Cross Dimer (-0,7 kcal/mol) - Alta porcentagem de homologia com os genes da família SOD, principalmente o SOD6 quando analisado em Clustal</p>	Zhu et al. ⁸⁶
<i>SOD5</i>	<p>F - GGAGCAGTAGAAGCCATACT A R - ATGGGCGAGTCCTACAAAAC</p>		<p>- Estes <i>primers</i> não foram encontrados nas sequências de SOD5 para <i>C. albicans</i> das bases de dados da <i>Candida</i> Genome Database e PubMed - Usado para <i>Northern Blot</i></p>	Martchenko et al. ⁴⁶

Fonte: Elaboração própria

Após todas as análises, os *primers* para os genes ACT1 (Alves et al.²), SAP1 (Naglik et al.⁵⁹), HWP1 (Alves et al.²) e SOD1 (Zhu et al.⁸⁶) com as características mais próximas das ideais foram selecionados para a realização do teste in vitro. Os *primers* para os genes ACT1, HWP1, PLB1, LIP3, SAP1 e SAP4 descritos por Nailis et al.⁶⁰, também foram selecionados para testes in vitro.

Embora os *primers* da literatura para os genes ACT1, HWP1, LIP3 e PLB1 tenham sido escolhidos para análise in vitro, estes também tiveram *primers* delineados com o intuito de procurar características ainda melhores para os mesmos e verificar na análise in vitro qual demonstrava melhor especificidade.

Para os genes ALS1, ALS3, CAP1, CAT1, EFG1, LIP3, PLB1, SAP4 e SOD5 não foram encontrados *primers* na literatura com boas características para estudos em amostras clínicas. Portanto, *primers* para esses genes foram desenhados através do programa *Beacon Designer*TM, o qual desenha o *primer* especificamente para o fluoróforo SYBR Green[®] (Life Technologies, CA, USA) garantindo sequências específicas. O programa é muito indicado por sua eficiência uma vez que analisa automaticamente homologies transversais através da interpretação de resultados de pesquisa *BLAST*, assegurando alto rendimento e evitando estruturas secundárias. Mesmo diante das características que o programa oferece, os *primers* desenhados pelo *Beacon Designer*TM também foram analisados nas ferramentas *BLAST*, *Clustal* e *Mfold*, para garantir sua especificidade.

5.1.2 Análise in silico - *Primers* delineados

Apesar do *primer* desenhado para o gene ACT1 apresentar uma pequena estrutura secundária no Forward, através da ferramenta *Mfold*, e mostrar homologia com outras espécies de *Candida* diante da ferramenta *Blast*, este *primer* também foi o escolhido para teste para este gene. Apresentou temperatura de anelamento adequada (F: 55,6°C e R: 55,5°C), adequada porcentagem de GC% (F: 38,9% e R: 35%), tamanho do produto adequado (167 pares de base) e *primers* com quantidade adequada de pares de base (F: 18 pb e R: 20 pb).

O *primer* desenhado para o gene ALS1 foi o de escolha pois apresentou boas características na análise *in silico*. Este *primer* não mostrou *hairpins* através da análise via *Mfold*, apresentou apropriado tamanho de produto de PCR (117 bp), apropriado tamanho do *primer* (F e R: 18bp), apropriada porcentagem de CG% para F (38,9%) e R (44,4%), apropriada Tm para F (55,9°C) e R (56°C). No entanto, este *primer* também apresentou

homologia com outras espécies de *Candida* através da análise via *Blast*. O teste in vitro foi então indicado para checar especificidade.

O par de *primers* desenhados para o gene *CAP1* mostrou homologia com outras espécies de *Candida* através da análise via *Blast*, porém foi escolhido por apresentar outras boas características *in silico*: não apresentou *hairpin* através da ferramenta *Mfold*; mostrou tamanho do produto apropriado (87 bp); tamanho dos *primers* adequados (F: 19 bp e R: 18 bp); porcentagem de GC% apropriada para F (31,6%) e R (38,9%); e Tm apropriada para F (55°C) e R (55,2°C).

Os *primers* de escolha para o gene *CAT1* foram os desenhados, pois, mesmo apresentando alta homologia in silico com outras espécies de *Candida*, não apresentaram *hairpins* sobre os *primers* (F e R), e, através da ferramenta *Mfold*, apresentou comprimento adequado do produto (117 bp), comprimento adequado dos F: 18 e R: 19 bp, porcentagem de GC adequada tanto para F% (38,9%) quanto para R (31,6%), e Tm apropriada para F (55,1°C) e R (55,1°C).

Para o gene *EFG1*, os *primers* escolhidos para análise in vitro também foram os desenhados. Estes, embora exibindo homologia com espécies de *Candida*, apresentaram boas características *in silico*, como: não há *hairpin* expressivo através da análise via *Mfold*; mostrou comprimento adequado do produto (89 pb); comprimento dos *primers* apropriados (F e R: 18 bp); porcentagem de GC apropriada para F e R (38,9%); e Tm apropriada para F (56,5°C) e R (56,2°C).

Para o gene *HWP1*, além do *primer* descrito por Alves et al.², o par de *primers* delineado também foi escolhido para teste in vitro. Estes apresentaram boas características perante a análise pelo programa *Beacon Designer*, entre elas: comprimento adequado do produto (114 pb); comprimento dos *primers* adequado (F e R: 18 pb); e Tm adequada para F (56,8°C) e R (57°C). Embora as características tenham sido positivas, foi detectado um *hairpin* através da ferramenta *Mfold*. Diante desta característica, ambos os *primers* foram os escolhidos para analisar sua eficiência no teste in vitro.

Os *primers* desenhados para o gene *LIP3* apresentaram homologia com espécies de *Candida* (*Blast*), mas foi o de escolha, pois exibiu: ausência de *hairpin* via *Mfold* análise; comprimento do produto apropriado (136 pb); comprimento dos *primers* adequados (F e R: 19 pb); GC% apropriada para F (31,6%) e R (36,8%); Tm apropriada para F (54,9°C) e R (55°C) com ausência de *hairpin* ou dímeros.

Para o gene PLB1, também foram desenhados *primers* para teste *in vitro*. Mesmo apresentando homologia com outras espécies de *Candida* na análise *in silico*, estes *primers* não apresentaram *hairpins* no F e R através da análise via *Mfold*, apresentaram tamanho do produto adequado (124 pb), quantidade apropriada de pares de base nos *primers* (F: 18 e R: 20 pb), porcentagem de GC% adequada para F (38,9%) e R (35%), e Tm para F (55,1°C) and R (55,4°C) próximas às ideais.

Com base nos resultados da análise *in silico* dos *primers* delineados e da literatura, os genes ALS3, SAP4 e SOD5 foram excluídos da análise *in vitro*, uma vez que não foram encontrados *primers* com boas características para proporcionar resultados fidedignos à expressão gênica. Após todas as análises *in silico*, dez *primers* da literatura e oito *primers* desenhados foram selecionados para a realização do teste *in vitro* para a análise da especificidade e posterior padronização. Os *primers* selecionados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Genes escolhidos para realização do teste in vitro

Gene	Primers	Tm (°C)	CG (%)	Tamanho produto	Referência	
ACT1	F - TTTCATCTTCTGTATCAGAGGAACTTATTT R - ATGGGATGAATCATCAAACAAGAG	66,9 66,3	41,7 41,7	ND	Nailis et al. ⁶⁰	
	F - TGCTGAACGTATGCAAAAGG R - TGAACAATGGATGGACCAGA	63,3 62,9	45 45	186		Alves et al. ²
	F - ATTCGGTGAGTAATCCTA R - GTATAGTCCAGATAACAACA	55,6 55,5	38,9 35	167		
	F - CATCATTGACTCAGTTGT R - CAGTGGAAAGTAGATTGTG	55,9 56	38,9 44,4	117		
CAP1	F - AGTCAATTCAATGTTCAAG R - AATGGTAATGTCCTCAAG	55 55,2	31,6 38,9	87	Este estudo (Beacon Designer)	
	F - GACTGCTTACATTCAAAC R - AACTTACCAAATCTTCTCA	55,1 55,1	38,9 31,6	117		
EFG1	F - ACGAGTAACAACACTACCAT R - TATCTGCTCTTCTGACAA	56,5 56,2	38,9 38,9	89		
	F - CTCCAAAATCATCAGCTC R - CACTAGCCAAAACAGAAG	56,8 57	44,4 44,4	114		
HWP1	F - TCTACTGCTCCAGCCACTGA R - CCAGCAGGAATTGTTTCCAT	66,8 62,7	55 45	248	Alves et al. ²	
	F - GACCGTCTACCTGTGGGACAGT R - GCTCAACTTATTGCTATCGCTTATTACA	69,6 65,9	59 35,7	ND		Nailis et al. ⁶⁰
LIP3	F - TCTCACCAGAGATTGTTGTTGGA R - GTTGGCCATCAAATCTTGCA	65,8 63,6	45,5 45	68	Este estudo (Beacon Designer)	
	F - AGAGAATGTATGAAGTTGT R - CCCTGTTCAAAGTATCTAT	54,9 55	31,6 36,8	136		
	F - GGCATTGAACATCCTATA R - GGTAACCTAATAGTCTTCCA	55 55,4	38,9 35	124		
SAP1	F - GGTGGAGAAGATGGCCAAAA R - AGCACTTACGTTACGATGCAACA	64,5 67,1	50 43,5	60	Nailis et al. ⁶⁰	
	F - AACCAATAGTGATGTCAGCAGCAT R - ACAAGCCCTCCCAGTTACTTTAAA	66,9 66,3	41,7 41,7	ND		
	F - TCAATCAATTTACTCTTCCATTTCTAACA R - CCAGTAGCATTAAACAGGAGTTTTAATGACA	63,7 67,6	27,6 36,7	161	Naglik et al. ⁵⁹	
	F - AAACGGCATTGGAATCTGGAA R - CAAAACTTAGCGTTATTGTTGACACT	63 65,2	38,1 33,3	ND		Nailis et al. ⁶⁰
SOD1	F - TTGAACAAGAATCCGAATCC R - AGCCAATGACACCACAAGCAG	59,9 67,7	40 52,4	396	Zhu et al. ⁸⁶	

Temperatura de anelamento (Tm), (Porcentagem dos pares de base C e G) CG % e Tamanho do produto detalhados. ND: Não disponível.

Fonte: Elaboração própria

5.1.3 Justificativa para a escolha dos *primers*

Os *primers* descritos na Tabela 1 foram escolhidos de acordo com características particulares. Os *primers* descritos por Nailis et al.⁶⁰ foram escolhidos para teste *in vitro*, pois inicialmente eram os eleitos para a execução da metodologia.

Embora o par de *primers* para o gene ACT1, descrito por Alves et al.², tenha apresentado estruturas secundárias e alta temperatura de anelamento, este foi escolhido para teste *in vitro*, pois não demonstrou presença de *hairpins* nos *primers* (tanto no *Forward* quanto no *Reverse*) através da ferramenta *Mfold*, mostrou tamanho do produto apropriado (186 bp), apropriado tamanho do *primer* (F e R: 20 bp) e apropriada porcentagem de CG% para o F e o R (45%). Nenhum *primer* desenhado apresentou melhores características quando comparados ao descrito por Alves et al.².

O *primer* desenhado para o gene ALS1 foi o de escolha pois apresentou boas características na análise *in silico*. Este *primer* não mostrou *hairpins* através da análise via *Mfold*, apresentou apropriado tamanho de produto (117 bp), apropriado tamanho do *primer* (F e R: 18 bp), apropriada porcentagem de CG% para F (38,9%) e R (44,4%), apropriada Tm para F (55,9°C) e R (56°C). No entanto, este *primer* também apresentou homologia com outras espécies de *Candida* através da análise via *Blast*. O teste *in vitro* foi então indicado para checar especificidade.

O par de *primers* desenhados para o gene CAP1 mostrou homologia com outras espécies de *Candida* através da análise via *Blast*, porém foi escolhido por apresentar outras boas características *in silico*: Não apresentou *hairpins* através da ferramenta *Mfold*; mostrou tamanho do produto apropriado (87 pb); tamanho dos *primers* adequados (F: 19 bp e R: 18 bp); porcentagem de GC% apropriada para F (31,6%) e R (38,9%); e Tm apropriada para F (55°C) e R (55,2°C).

Os *primers* para o gene CAT1 de escolha foram os desenhados, pois, apesar deles apresentarem homologia com outras espécies de *Candida*, não mostraram *hairpins* sobre os *primers* (F e R), através da ferramenta *Mfold*, apresentaram comprimento adequado do produto (117 bp), comprimento adequado das sequências F: 18 e R: 19 bp, porcentagem de GC adequada tanto para F (38,9%) quanto para R (31,6%), e Tm apropriada para F (55,1°C) e R (55,1°C).

Para o gene EFG1, os *primers* escolhidos para análise *in vitro* também foram os desenhados. Estes, embora apresentassem homologia com espécies de *Candida*, apresentaram

boas características *in silico*, como: Não há *hairpins* significativo através da análise via *Mfold*; mostraram comprimento adequado do produto (89 pb); comprimento dos *primers* apropriados (F e R: 18 pb); porcentagem de GC apropriada para F e R (38,9%); e Tm apropriada para F (56,5°C) e R (56,2°C).

Para o teste *in vitro* dos *primers* para o gene HWP1, dois pares foram escolhidos. O primeiro descrito por Alves et al.², e o segundo, um par de *primers* desenhados. Ambos foram escolhidos, pois nenhum mostrou características *in silico* mais apropriadas. O primeiro apresentou inadequado tamanho do produto (248 pb), alta Tm para F (66,8°C) e R (62,7°C), no entanto, não apresentou *hairpins* nos *primers* (F e R) pelo programa *Mfold*, apresentou comprimento adequado tanto do F quanto do R (20 pb), e porcentagem de GC adequada para F (55%) e R (45%). O segundo, por sua vez, apresentou boas características perante a análise pelo programa *Beacon Designer*: comprimento adequado do produto (114 pb), comprimento dos *primers* adequado (F e R: 18 pb), Tm adequada para F (56,8°C) e R (57°C), no entanto, há um *hairpin* analisado através da ferramenta *Mfold*.

Os *primers* desenhados para o gene LIP3 mostraram homologia com espécies de *Candida (Blast)*, mas foi o de escolha pois apresentou: ausência de *hairpins* via análise com *Mfold*; comprimento do produto apropriado (136 pb); comprimento dos *primers* adequados (F e R: 19 pb); GC% apropriada para F (31,6%) e R (36,8%); Tm apropriada para F (54,9°C) e R (55°C) com ausência de *hairpin* ou dímeros.

Para o gene PLB1, também foram desenhados *primers* para teste *in vitro*. Mesmo apresentando homologia com outras espécies de *Candida* na análise *in silico*, estes *primers* não apresentaram *hairpins* no F e R, através da análise via *Mfold*, apresentaram tamanho do produto adequado (124 bp), quantidade apropriada de pares de base nos *primers* (F: 18 e R: 20 bp), porcentagem de GC% adequada para F (38,9%) e R (35%), e Tm para F (55,1°C) and R (55,4°C) próximas às ideais.

O par de *primers* para o gene SAP1, descrito por Naglik et al.⁵⁹, foi o de escolha para análise *in vitro*, porque nenhum dos desenhados apresentou melhores características. Embora os *primers* apresentem temperatura de anelamento muito altas e diferentes entre si (F: 63,7°C e R: 67,6°C) e muitos pares de base (F: 29 e R: 30 pb), estes *primers* não apresentaram *hairpins*, tanto no F quanto no R (*Mfold*), resultam em comprimento adequado do produto de PCR (161 pb) e possuem porcentagem de GC ótimas para F e R (45%).

Zhu et al.⁸⁶, descreveram pares de *primers* para o gene SOD1. Estes foram os escolhidos para serem testado *in vitro*, porque, mesmo que eles tenham temperaturas

diferentes entre o F e o R (F: 59,9 ° C e R: 67,7 ° C) e comprimento de produto grande (396 pb), apresentam tamanho dos *primers* adequados, sendo o F com 20 pb e o R com 21 pb. Através da análise via *Mfold* foi possível detectar que não há presença de *hairpins* (no F e R). Os *primers* apresentaram boa porcentagem de GC (F: 40% e R: 52,4%), e baixa homologia com outros genes da mesma família SODs por análise no *Clustal*. *Primers* desenhados pelo programa *Beacon Designer*TM não apresentaram melhores características.

Em suma, estes *primers* foram adquiridos (*Invitrogen*TM) e testados *in vitro* com a técnica de PCR convencional seguido de eletrofores em gel de agarose a 2%, conforme metodologia descrita em 4.1.3.3. Neste teste de especificidade, os *primers* foram testados contra um painel de DNA genômico das diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, e *C. dubliniensis*. Este teste permitiu identificar o tamanho do produto amplificado além de possível detecção dos genes nas diferentes espécies de *Candida*.

5.1.2 Análise *in vitro* para padronização dos *primers* desenhados e da literatura

5.1.2.1 Extração de DNA para padronização dos primers da literatura e desenhados

Foi realizada a extração do DNA de cepas padrão das diferentes espécies de *Candida*, seguindo a metodologia descrita no item 4.1.2. A extração do DNA das cepas foi realizada em duplicata. Após leitura em espectrofotômetro, as concentrações de DNA das diferentes espécies de *Candida* foram analisadas assim como a razão 260/280 (Tabela 2).

Todas as duplicatas de número 1 foram diluídas em tampão TE Buffer para se obter a concentração de 200 ng/μL. Após quantificação do DNA, realizou-se o teste de eletroforese em gel de agarose com um total de 1 μg de DNA em cada canaleta, (conforme a metodologia descrita em 4.1.2.2.) para cada espécie avaliada para verificar a integridade do DNA das espécies. O resultado é mostrado na Figura 5. Como pode ser observado, o DNA genômico das espécies de *Candida* estavam íntegros. Estas amostras, portanto, puderam ser utilizadas como *template* no teste de especificidade dos *primers*.

Tabela 2 - Concentrações das espécies de *Candida* após extração de DNA

Espécie de <i>Candida</i>	Média das leituras ($\eta\text{g}/\mu\text{L}$)	Razão 260/280
<i>C. albicans</i> 1	203,97	1,96
<i>C. albicans</i> 2	208,14	1,95
<i>C. dubliniensis</i> 1	440,10	1,96
<i>C. dubliniensis</i> 2	462,72	1,99
<i>C. glabrata</i> 1	1.118,31	2,05
<i>C. glabrata</i> 2	632,70	1,98
<i>C. krusei</i> 1	224,31	1,96
<i>C. krusei</i> 2	144,38	2,23
<i>C. tropicalis</i> 1	201,33	1,99
<i>C. tropicalis</i> 2	154,80	2,23

Fonte: Elaboração própria.

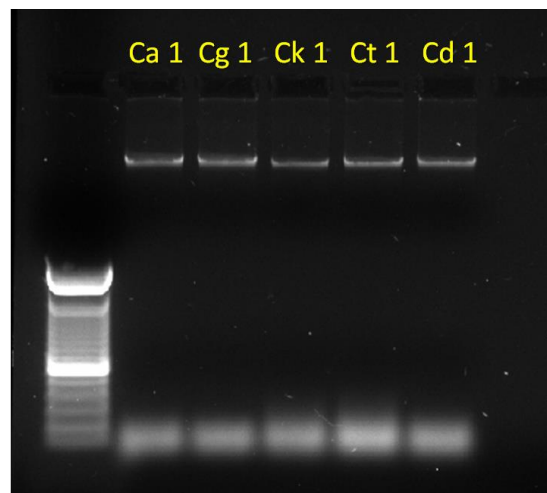
Figura 5 - DNA das espécies de *Candida* visualizados em gel de agarose

Imagem obtida no equipamento *BIO RAD Molecular Image Gel DocTM XR+* com o *softaware Image Lab*, após eletroforese em gel de agarose, mostrando integridade do DNA de cada espécie avaliada. Ca1: DNA genômico de *C. albicans*; Cg 1: DNA genômico de *C. glabrata*; Ck 1: DNA genômico de *C. tropicalis*; Cd 1: DNA genômico de *C. dubliniensis*.

Fonte: Elaboração própria

5.1.2.2 Preparo dos primers e estoque.

Diante de todos os resultados anteriormente descritos, *primers* da literatura para os genes ACT1, HWP1, PLB1, LIP3, SAP1, SAP4 e SOD1 foram adquiridos e testados in vitro pela técnica de PCR convencional seguida de eletroforese em gel de agarose segundo a metodologia deste projeto descrita em 4.1.3.3. *Primers* desenhados para os genes ACT1, ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3 e PLB1 também foram adquiridos para teste in vitro. Após preparo dos *primers*, a concentração foi checada em espectrofotômetro (*Nanodrop*) (dados descritos nas Tabelas 3 - 5).

Foram testados 2 *primers* da literatura para o gene HWP1, um descrito por Nailis et al.⁶⁰ e outro por Alves et al.². Para o gene SAP1 também foram testados 2 *primers*, um descrito por Nailis et al.⁶⁰ e outro por Naglik et al.⁵⁹. Para teste do *primer* ACT1 também foram selecionados dois: um descrito por Alves et al.², e outro desenhado por Nailis, et al.⁶⁰.

Tabela 3 - Médias das concentrações dos *primers* descritos por Nailis et al.⁶⁰ (2010)

Gene	Primer	Média das leituras (ng/μL)	Primer	Média das leituras (ng/μL)
ACT1	Forward	964,50	Reverse	783,38
HWP1	Forward	710,84	Reverse	894,76
LIP3	Forward	711,34	Reverse	641,50
PLB1	Forward	658,70	Reverse	739,06
SAP1	Forward	776,08	Reverse	763,18
SAP4	Forward	681,82	Reverse	869,94

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 4 - Médias das concentrações dos *primers* da literatura descritos por Alves et al.² (2014), Naglik et al.⁵⁹ (2003) e Zhu et al.⁸⁶ (2011)

Gene	Primer	Média das leituras (ng/μL)	Primer	Média das leituras (ng/μL)
ACT1	Forward	736,175	Reverse	785,875
HWP1	Forward	699,215	Reverse	703,765
SAP1	Forward	928,41	Reverse	1.010,06
SOD1	Forward	691,38	Reverse	739,86

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 5 - Médias das concentrações dos *primers* delineados

Gene	Primer	Média das leituras (ng/μL)	Primer	Média das leituras (ng/μL)
<i>ACT1</i>	<i>Forward</i>	574,735	<i>Reverse</i>	678,855
<i>ALS1</i>	<i>Forward</i>	630,94	<i>Reverse</i>	663,94
<i>CAP1</i>	<i>Forward</i>	669,28	<i>Reverse</i>	573,615
<i>CAT1</i>	<i>Forward</i>	461,41	<i>Reverse</i>	528,98
<i>EFG1</i>	<i>Forward</i>	422,065	<i>Reverse</i>	373,105
<i>HWPI</i>	<i>Forward</i>	616,88	<i>Reverse</i>	686,24
<i>LIP3</i>	<i>Forward</i>	760,18	<i>Reverse</i>	684,91
<i>PLB1</i>	<i>Forward</i>	649,66	<i>Reverse</i>	674,51

Fonte: Elaboração própria.

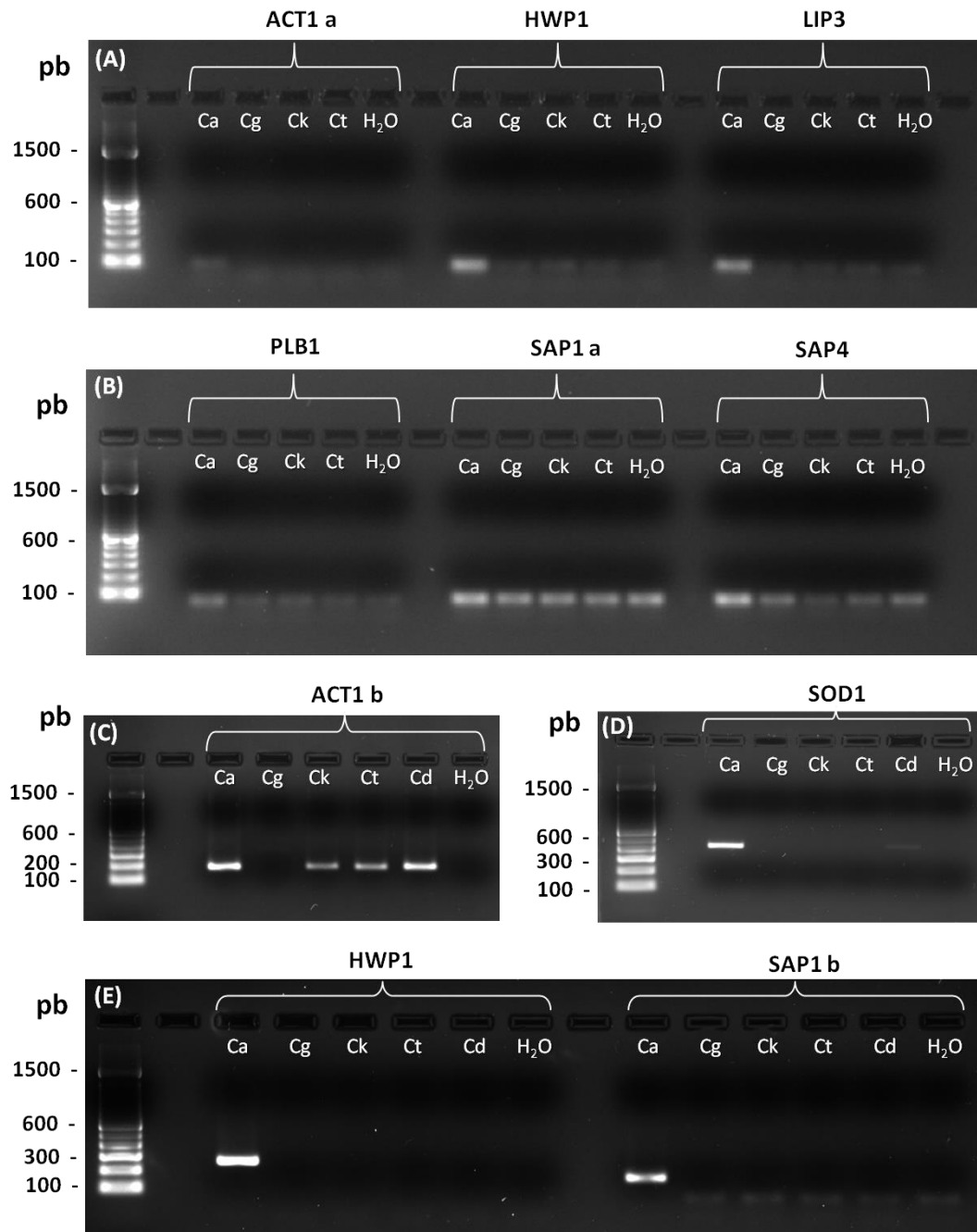
É importante ressaltar que essas concentrações estavam de acordo com o peso molecular de cada *primer*, não excedendo 20% em todos eles, exceto para os *primers*: ACT1 Reverse (Alves et al.²); EFG1 Forward e Reverse delineados; e LIP3 Forward delineado. Estes *primers* estavam acima da concentração esperada. Então, os mesmos foram novamente colocados em banho seco a 65° C por 10 minutos para solubilização dos mesmos, pois parte poderia não estar totalmente diluída.

Decorrido este período, todos tiveram sua concentração novamente checada. Após esse tempo, todos os *primers* atingiram a concentração ideal (com tolerância de 20% para cima ou para baixo), exceto o Reverse do *primer* EFG1. Este então foi calculado e visto que a concentração estoque não estava a 100 μM e sim a 69,173 μM. A solução estoque de todos os outros *primers* estava na concentração de 100 μM. Assim, para o preparo de solução de trabalho, o volume desse *primer* foi ajustado para atingir a concentração desejada de 10 μM.

5.1.2.3 Especificidade dos primers

Após os *primers* e o DNA genômico estarem preparados, foi realizada a amplificação do DNA para analisar a especificidade dos *primers* segundo a metodologia descrita em 4.1.3.3. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 6 e 7.

Figura 6 - Produtos de PCR dos *primers* da literatura visualizados em gel de agarose



Em A e B, pode-se observar falta de especificidade dos *primers* para os genes ACT1 a, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1 a e SAP4 descritos por Nailis et al.⁶⁰ (2010) em espécies de *Candida*. Em C, as imagens mostram uma falta de especificidade do par de *primers* para o gene ACT1 b descrito por Alves et al.² (2014) em espécies de *Candida*. Em D, observa-se a detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis* do *primer* para o gene SOD1 descrito por Zhu et al.⁸⁶ (2011). A baixa intensidade da banda do *primer* para o gene SOD1 em *C. dubliniensis* não desqualifica a detecção do mesmo nesta espécie. Em E, a imagem mostra a especificidade do par de *primers* para *C. albicans* para o gene HWP1 descrito por Alves et al.² (2014) e para o gene SAP1 b descrito por Naglik et al.⁵⁹ (2003) (*Ca*: *Candida albicans*, *Cg*: *Candida glabrata*, *Ck*: *Candida krusei*, *Ct*: *Candida tropicalis*, *C. dubliniensis*, *H₂O*: água de grau molecular). Imagens adquiridas após eletroforese em gel de agarose por um equipamento Gel Doc XR + System via Image Lab Software.

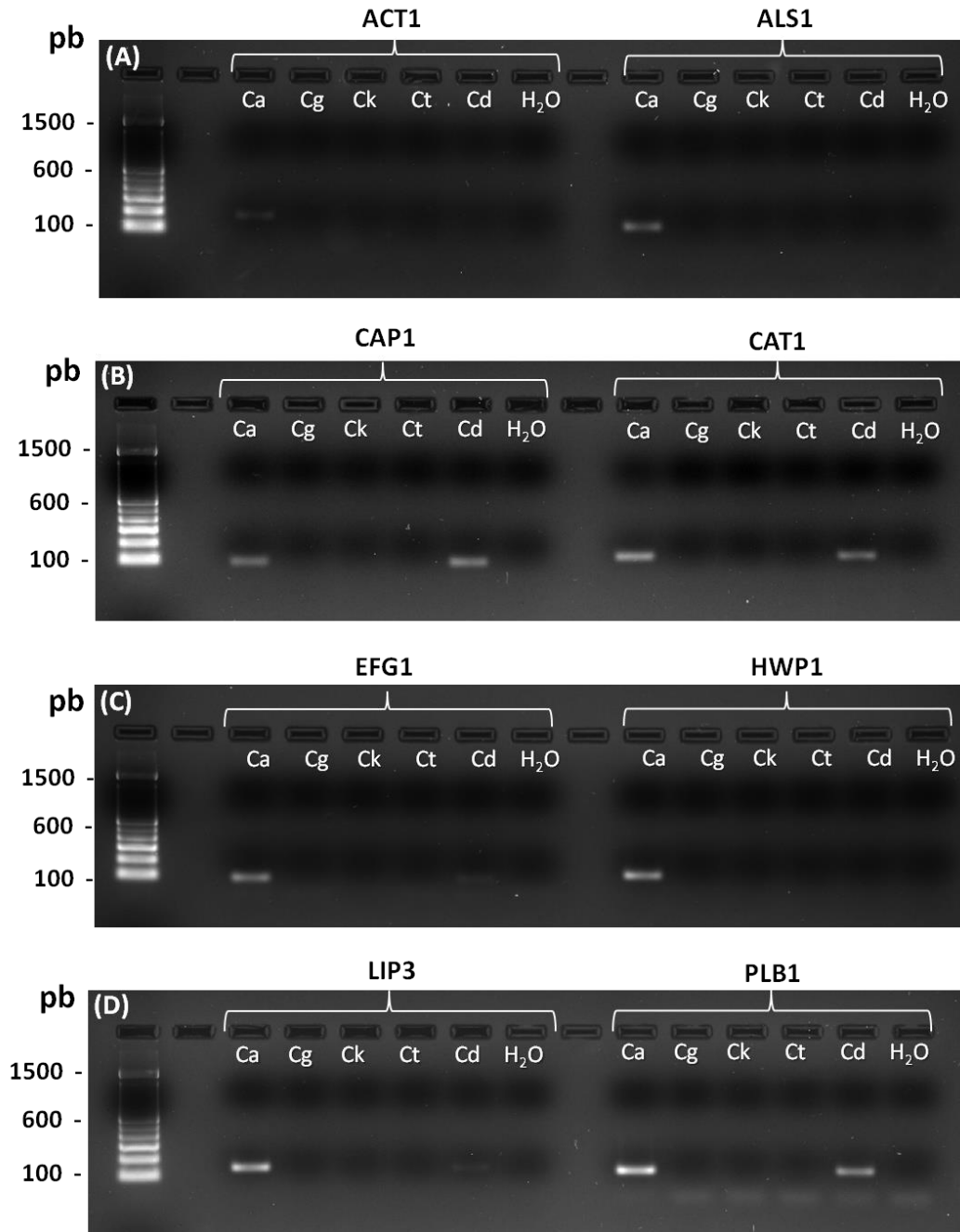
Fonte: Elaboração própria.

Conforme ilustrado na Figura 6, os *primers* para avaliar a expressão dos genes ACT1a, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1a e SAP4 descritos por Nailis et al.⁶⁰ (Figura 6A e B) não apresentaram especificidade para *C. albicans*, apresentando reação cruzada entre todas as espécies de *Candida* avaliadas; e no controle negativo da reação em que o template foi água de grau molecular provavelmente ocorreu formação de produtos inespecíficos. A detecção do *primer* no controle negativo foi verificada duas vezes e pode ser o resultado das características inadequadas do *primer*.

Na Figura 6C, o *primer* ACT1b descrito por Alves et al.² (2014) foi detectado em *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Na Figura 6E, o *primer* para o gene SAP1 de Naglik et al.⁵⁹ (2003), mostrou especificidade para *C. albicans* assim como o *primer* para o gene HWP1 de Alves et al.² (2014). O par de *primer* para o gene SOD1 de Zhu et al.⁸⁶ (2011) mostrou detecção em *C. dubliniensis* e *C. albicans* (Figura 6D).

Como pode ser observado na Figura 7, os *primers* para os genes ACT1 e ALS1 (Figura 7A) e HWP1 (Figura 7C), mostraram especificidade para *C. albicans*, enquanto os *primers* para os genes LIP3 e PLB1 (Figura 7D), CAT1 e CAP1 (Figura 7B), e EFG1 (Figura 7C) mostraram bandas de produtos de PCR detectadas na espécie *C. dubliniensis*.

Figura 7 - Produtos de PCR dos *primers* delineados visualizados em gel de agarose



Produtos de PCR visualizados em gel de agarose dos *primers* desenhados. Em A, a imagem mostra a especificidade para *C. albicans* dos *primers* para os genes ACT1 e ALS1 contra as espécies de *Candida*. A imagem B apresenta a detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis* dos *primers* para os genes CAP1 e CAT1. Em C, é observada especificidade do par de *primer* para o gene HWP1 para *C. albicans* e a detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis* para o *primer* EFG1. Em D, os *primers* para os genes LIP3 e PLB1 mostraram especificidade para *C. albicans* e *C. dubliniensis*. (Ca: *Candida albicans*, Cg: *Candida glabrata*, Ck: *Candida krusei*, Ct: *Candida tropicalis*, C. dubliniensis, H₂O: água de grau molecular). Imagem obtida no equipamento *Gel Doc XR+* (Bio-Rad) e editada no software *Image Lab*.

Fonte: Elaboração própria.

5.1.2.4 Determinação da Concentração Ótima de cada primer

Seguindo a metodologia descrita em 4.1.3.4., os *primers* foram analisados quanto a sua concentração ideal. Considera-se a concentração ótima aquela que apresentar menor *C_q*. As concentrações ótimas encontradas para cada *primer* estão citadas na Tabela 6. A Figura 8 mostra dois gráficos com exemplos da análise de *C_q*.

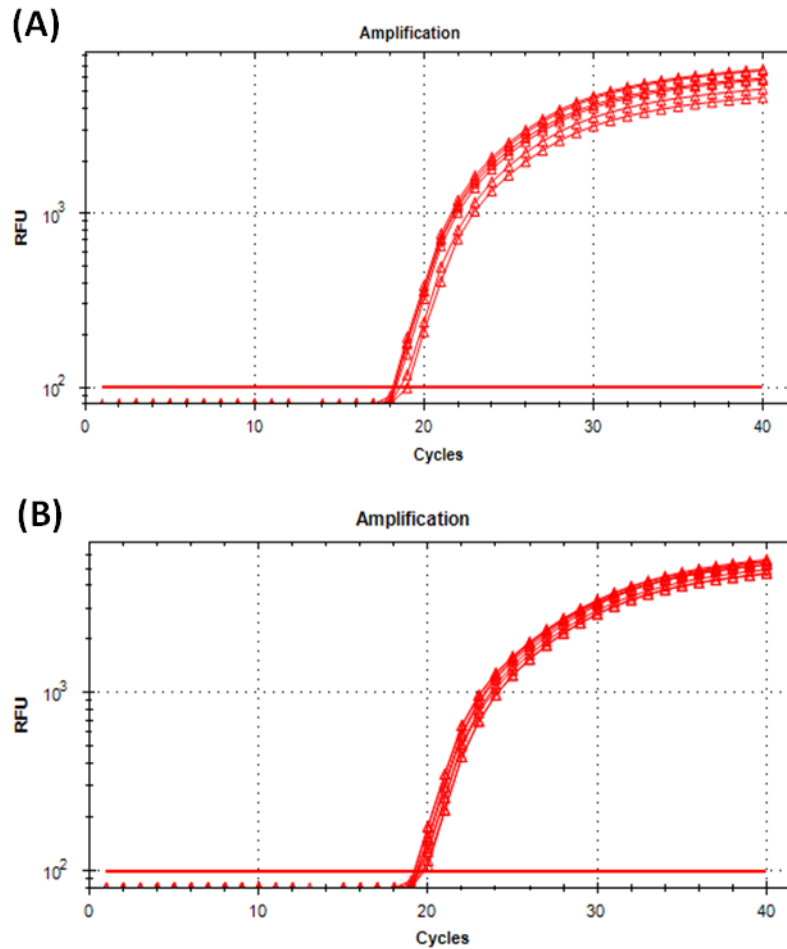
Tabela 6 - Características dos *primers* analisados

Gene	Primers	T _m (°C) Ciclo qPCR	Tamanho do produto	[] ótima (nM)
<i>ACT1</i>	F - ATTCGGTGAGTAATCCTA R - GTATAGTCCAGATAACAACA	55	167	350
<i>ALSI</i>	F - CATCATTGACTCAGTTGT R - CAGTGGAAAGTAGATTGTG	55	117	300
<i>CAPI</i>	F - AGTCAATTCAATGTTCAAG R - AATGGTAATGTCCTCAAG	50	87	400
<i>CATI</i>	F - GACTGCTTACATTCAAAC R - AACTTACCAAATCTTCTCA	50	117	350
<i>EFG1</i>	F - ACGAGTAACAACACTACCAT R - TATCTGCTCTTCTGACAA	50	89	350
<i>HWPI b</i>	F - CTCCAAAATCATCAGCTC R - CACTAGCCAAAACAGAAG	55	114	300
<i>HWPI CT</i>	F - TCTACTGCTCCAGCCACTGA R - CCAGCAGGAATTGTTTCCAT	60	248	450
<i>LIP3</i>	F - AGAGAATGTATGAAGTTGT R - CCCTGTTCAAAGTATCTAT	55	136	300
<i>PLB1</i>	F - GGCATTGAACATCCTATA R - GGTAACCTTAATAGTCTTCCA	55	124	300
<i>SAPI</i>	F - TCAATCAATTTACTCTTCCATTCTAACA R - CCAGTAGCATTAAACAGGAGTTTTAATGACA	60	161	500
<i>SOD1</i>	F - TTGAACAAGAATCCGAATCC R - AGCCAATGACACCACAAGCAG	60	396	400

T_m: Temperatura de anelamento. [] ótima: Concentração ótima do *primer*.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Exemplos de gráficos de *amplification plot*



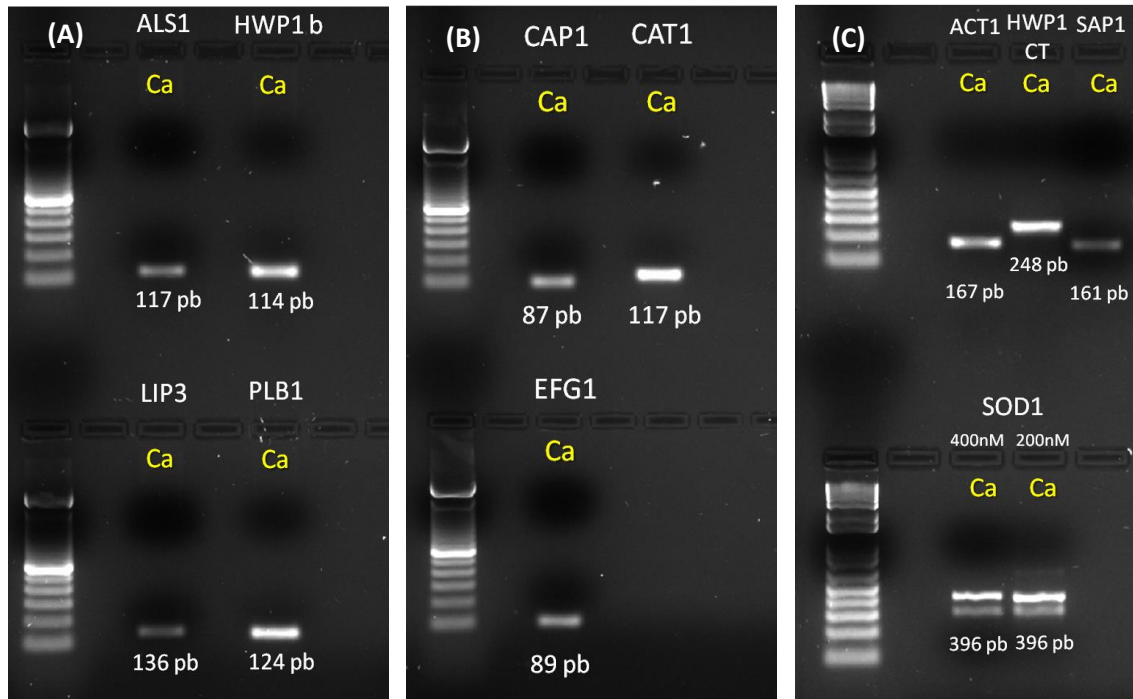
Estes gráficos foram obtidos durante a determinação da concentração ótima dos *primers* testados. Considera-se a concentração ótima aquela que apresentar menor C_q (*quantification cycle*). Em A está o gráfico obtido para o gene *ACT1* (desenhado pelo Beacon Designer™), para o qual a concentração ótima é de 350 nM, pois os valores médios de C_q obtidos foram: 19,83 para 200 nM; 19,56 para 250 nM; 19,35 para 300 nM; e 19,15 para 350 nM. Em B está o gráfico obtido para o gene *LIP3*, que apresentou concentração ótima de 300 nM, pois os valores médios de C_q obtidos foram 18,86 para 200 nM; 18,24 para 250 nM; 18,15 para 300 nM. *Observação: para aqueles primers testados em que os valores de C_q foram próximos nas distintas concentrações de primer, as concentrações escolhidas foram aquelas com o menor valor.* Gráficos gerados pelo *Bio-Rad CFX Manager™ Software*.
Fonte: Elaboração própria.

5.1.2.5 Confeção da curva padrão para cada primer

Os produtos de PCR dos *primers* foram obtidos através da metodologia do PCR convencional, quantificados e checados quanto à integridade e tamanho com eletroforese em

gel de agarose. A Figura 9 mostra a integridade dos produtos de PCR dos *primers* testados após a purificação.

Figura 9 - Produtos de PCR purificados visualizados em gel de agarose a 2%



Em A estão os produtos de PCR purificados dos *primers* para os genes ALS1, HWP1b, LIP3 e PLB1. Em B estão os produtos e PCR purificados dos *primers* para os genes CAP1, CAT1 e EFG1. Em C estão os produtos e PCR purificados dos *primers* para os genes ACT1 b, HWP1 CT, SAP1 e SOD1. As quantidades de pares de base de cada produto de PCR estão informadas abaixo da banda detectada em cada gene (Peso de padrão molecular de 1kb). *Observação: o produto de PCR para o gene SOD1 foi testado e purificado na concentração de 400 nM e 200 nM para analisar se em alguma concentração não eram detectadas duas bandas.*

Fonte: Elaboração própria.

Mesmo com a detecção de duas bandas no teste da especificidade do *primer* SOD1, o teste para analisar a eficiência, via qPCR foi realizado. Neste teste, a *Melt Curve* foi avaliada e o *primer* poderia ser usado mesmo aparecendo as duas bandas no gel de agarose, considerando que foi observado apenas um pico na *Melt Curve* simbolizando que não haviam dois genes sendo detectados.

O valor da concentração do produto de PCR foi utilizado para calcular o número de cópias do gene utilizando a equação descrita na seção 4.1.3.5. A Tabela 7 mostra os valores das cópias dos produtos de PCR.

Tabela 7 - Número de cópias de cada produto de PCR, obtidos a partir da equação de Yin et al.⁸⁵

Produto de PCR	Média da concentração (µg/mL)	Tamanho do Produto (bp)	Cópias/mL (a partir da fórmula descrita)	Cópias/µL	Diluição para 2 x 10 ¹⁰ cópias/mL volume final 50 µL	
					Volume Prod.PCR	Volume H ₂ O
<i>ACT1</i>	41,60	167	2,28E+14	2,28E+11	4,39 µL	45,61 µL
<i>ALSI</i>	11,29	117	8,83E+13	8,83E+10	11,32 µL	38,68 µL
<i>CAPI</i>	11,28	87	1,19E+14	1,19E+11	8,43 µL	41,57 µL
<i>CATI</i>	23,44	117	1,83E+14	1,83E+11	5,45 µL	44,55 µL
<i>EFG1</i>	11,37	89	1,17E+14	1,17E+11	8,55 µL	41,45 µL
<i>HWPI b</i>	32,55	114	2,61E+14	2,61E+11	3,83 µL	46,17 µL
<i>HWPI CT</i>	23,32	248	8,61E+13	8,61E+10	11,62 µL	38,38 µL
<i>LIP3</i>	12,88	136	8,67E+13	8,67E+10	11,54 µL	38,46 µL
<i>PLBI</i>	23,82	124	1,76E+14	1,76E+11	5,69 µL	44,31 µL
<i>SAPI</i>	13,22	161	7,52E+13	7,52E+10	14,45 µL	35,55 µL
<i>SOD1 200uM</i>	58,86	396	1,36E+14	1,36E+11	7,49 µL	42,51 µL

Número de cópias de cada produto de PCR, obtidos a partir da equação de Yin et al.⁸⁵ e volumes de água de grau molecular e produto de PCR para diluição dos mesmos para se obter a concentração de 2x 10¹⁰ cópias/µL para posterior diluição seriada.

Fonte: Elaboração própria.

Após a quantidade de cópias serem calculadas, os produtos de PCR foram diluídos em água de grau molecular para que chegassem a concentração de 2 x 10¹⁰ cópias/µL (volume final de 50 µL). A partir dessa diluição, foi realizada diluição seriada de 10 vezes, a qual foram misturados 10 µL do produto de PCR + 90 µL de água de grau molecular até chegar à concentração de 2 x 10² cópias/µL. Essas diluições foram usadas como *template* nas reações de qPCR para obter a curva de concentração de cada gene específico para analisar a eficiência dos mesmos utilizando a concentração determinada como ótima para cada *primer* específico.

5.1.2.6 Reação de qPCR para analisar a curva padrão e a eficiência de cada primer

A técnica de qPCR foi realizada para analisar a eficiência de cada *primer* através da análise de sua curva de concentração. Utilizou-se uma alíquota de 0,5 µL das diluições seriadas de 2 x 10⁷ a 2 x 10² cópias/µL ou de água de grau molecular como *template* por reação em um volume final de 25 µL. Os *templates* foram amplificados com um volume do *primer*

que correspondia à concentração ótima de cada a partir da solução trabalho na concentração de 10 mM (forward e reverse), 12,5 µL de 2X SYBR Green Supermix (*Bio-Rad*), e água de grau molecular.

O *amplification plot* mostra a equidistância entre os pontos na curva de concentração, sendo a primeira curva de amplificação (em duplicata) (detectada próxima ao ciclo 10) a diluição do produto de PCR em 2×10^7 cópias/µL; a segunda (em duplicata), detectadas na metade entre o ciclo 10 e o ciclo 20, a diluição dos produtos de PCR em 2×10^6 cópias/µL; e assim por diante, até a última curva (em duplicata) próxima ao ciclo 30, que corresponde a diluição do produto de PCR em 2×10^2 cópias/µL. Outra forma de analisar a diluição é através do coeficiente R^2 (dados mostrados abaixo da *Standard Curve*), que deve sempre estar próximo de 1,000. O coeficiente E, também situado abaixo da *Standard Curve*, caracteriza a eficiência do *primer* testado na reação de qPCR. Este valor é adequado quando se encontra entre 90 a 110%, sendo melhor estar entre 95 e 105%. O *melt peak* também foi analisado. A presença de apenas um pico na reação apresenta a não contaminação do material genético, bem como a não formação de produtos inespecíficos pelo *primer*, sendo, portanto, a característica ideal, apresentar apenas um pico expressivo. Todos os *primers* ficaram padronizados nessas características e apresentarem coeficiente de correlação de $\cong 1$ e eficiência de reação de 90-110%, com *slope* de $\cong -3.3$. Exemplos do *Amplification plot*, *Melt peak* e *Standard Curve* estão representados nas Figuras 10 e 11.

Com a determinação da concentração ótima dos *primers*, a otimização das reações de qPCR e a confecção da Curva de Concentração, esses *primers* estão padronizados e podem ser utilizados seguramente para avaliar a expressão gênica de *C. albicans* em amostras de pacientes submetidos a diferentes tratamentos.

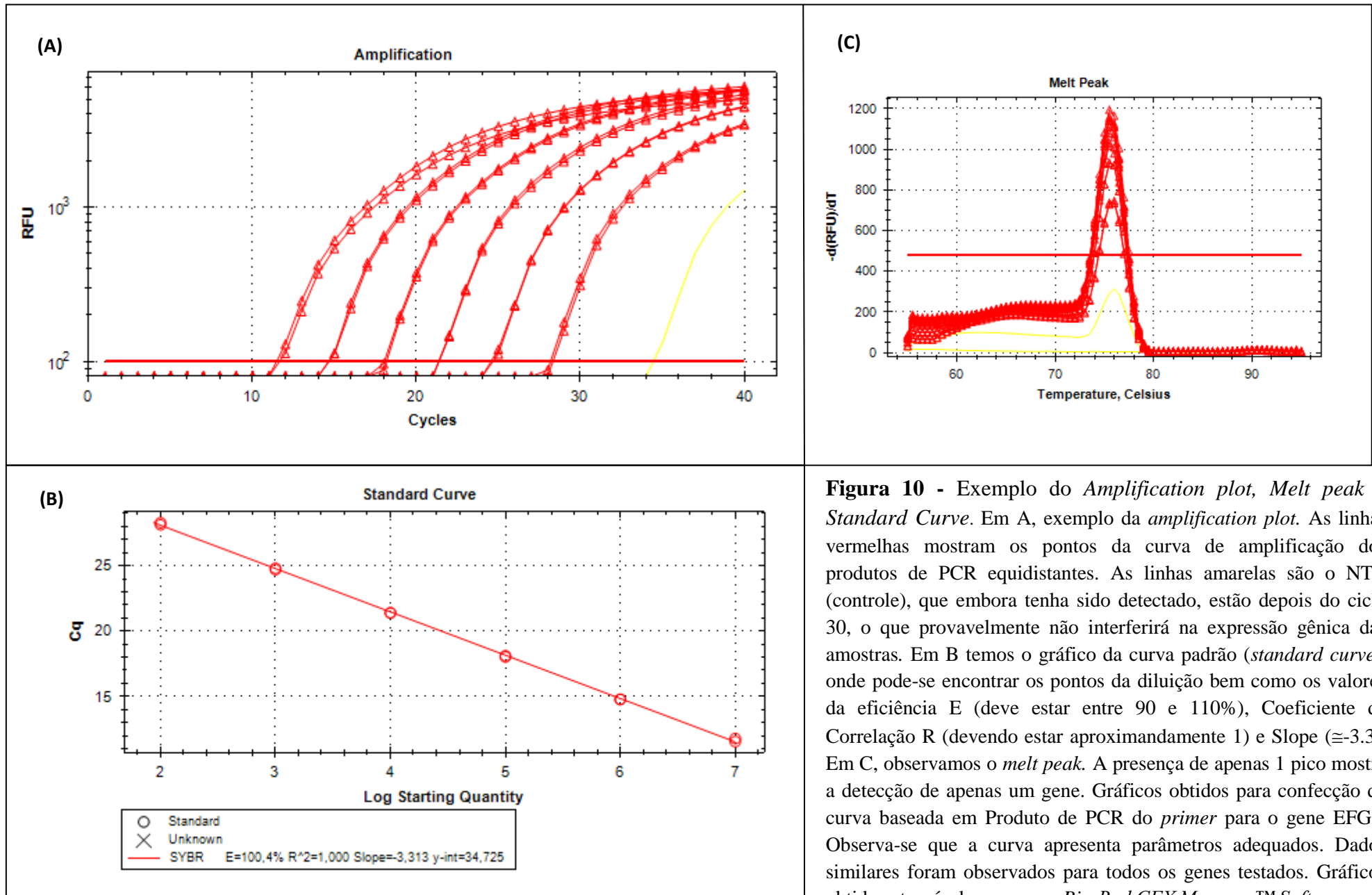
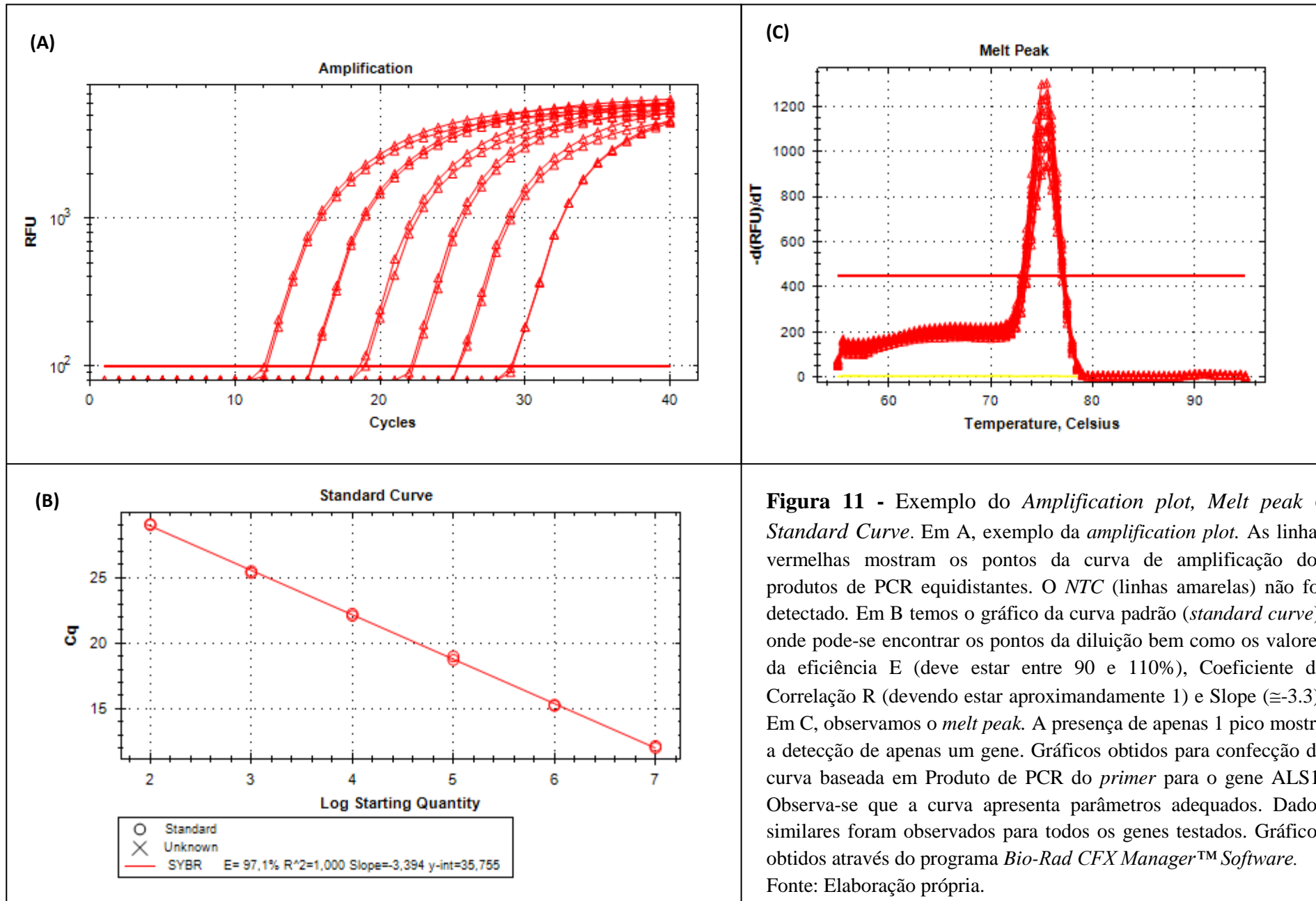


Figura 10 - Exemplo do *Amplification plot*, *Melt peak* e *Standard Curve*. Em A, exemplo da *amplification plot*. As linhas vermelhas mostram os pontos da curva de amplificação dos produtos de PCR equidistantes. As linhas amarelas são o NTC (controle), que embora tenha sido detectado, estão depois do ciclo 30, o que provavelmente não interferirá na expressão gênica das amostras. Em B temos o gráfico da curva padrão (*standard curve*), onde pode-se encontrar os pontos da diluição bem como os valores da eficiência E (deve estar entre 90 e 110%), Coeficiente de Correlação R (devendo estar aproximadamente 1) e Slope ($\cong -3.3$). Em C, observamos o *melt peak*. A presença de apenas 1 pico mostra a detecção de apenas um gene. Gráficos obtidos para confecção da curva baseada em Produto de PCR do *primer* para o gene EFG1. Observa-se que a curva apresenta parâmetros adequados. Dados similares foram observados para todos os genes testados. Gráficos obtidos através do programa *Bio-Rad CFX Manager™ Software*.
 Fonte: Elaboração própria.



5.2 Estudo 2: Análise da expressão gênica em isolados clínicos de pacientes submetidos à aPDT ou NIS

Das colônias congeladas, 5 pacientes de cada grupo foram submetidos a avaliação da expressão gênica. Estes foram selecionados por conveniência. Esse total de pacientes foi decorrente do crescimento de colônias de *C. albicans* em todos os períodos avaliados e da quantidade e qualidade do material genético (quando submetidos à extração de RNA). Seis pacientes foram excluídos da pesquisa por degradação do material genético.

5.2.1 Análise da expressão gênica

5.2.1.1 Extração de RNA – Isolados Clínicos

Os isolados clínicos obtidos a partir das amostras clínicas dos pacientes que foram submetidos à terapia Nistatina (tratamento B) e aPDT (tratamento A) foram armazenadas segundo metodologia descrita em 4.2.1. Devido a grande dificuldade em recuperar RNA da espécie *C. albicans*, a extração de RNA foi realizada em todas as colônias presuntivas de *C. albicans* armazenadas individualmente de cada paciente para posterior análise e possível união das mesmas, quando o rendimento (quantidade de RNA recuperado) era menor do que o necessário para realização de gel de agarose e quantificação de expressão gênica por qPCR. Essa etapa foi um passo muito importante, pois foi possível observar cada colônia individualmente. Se alguma colônia estivesse com RNA degradado, esta então não era unida com outras do mesmo paciente. Se não houvesse degradação, era realizada a união de todas as colônias após a purificação para aumentar o rendimento do RNA. Essas amostras não foram divididas em prótese (PT) e palato (PA), pois poucos pacientes apresentaram crescimento das espécies de *Candida* nas placas *CHROMagar* quando as amostras eram recuperadas do palato.

Um total de 155 isolados clínicos foi submetido à extração do RNA. Dentre eles: 81 colônias entre três coletas de 10 pacientes do grupo aPDT; enquanto que 74 colônias entre três coletas de 9 pacientes do grupo NIS. Os pacientes foram excluídos da pesquisa quando: 1) Após a extração do RNA, o material genético estava degradado em alguma das coletas, impossibilitando a análise, uma vez que o estudo é longitudinal; 2) Quando houve crescimento de poucas colônias em *CHROMagar*, fazendo com que não houvesse RNA suficiente; e/ou 3) Quando não houve crescimento de *C. albicans* em alguma das coletas estudadas.

Ao final, as análises de qPCR foram realizadas em 10 pacientes, sendo 5 de cada grupo (aPDT e NIS) em 3 diferentes coletas. Os tempos estudados na análise da expressão gênica foram: Inicial (1ª coleta – pré-tratamento); Final (2ª coleta – pós-tratamento) e Controle posterior de 60 dias após o início dos tratamentos (5ª coleta). A coleta de 60 dias foi a de escolha por possibilitar melhor análise do comportamento da expressão gênica dos genes de virulência em médio prazo.

Seguindo a metodologia proposta, o RNA das amostras foi isolado e denominado como RNA bruto. A quantificação de RNA das colônias está representada nas Tabelas 8 e 9. Os pacientes que apresentaram RNA degradado ou em pouca quantidade e que foram excluídos do estudo não estão descritos nas tabelas.

Tabela 8 - Dados do rendimento e integridade do RNA bruto após extração das colônias do grupo aPDT

Amostra	Colônias	aPDT								
		1ª Coleta			2ª Coleta			5ª Coleta		
		Média das leituras (ηg/μL)	Rendimento (μg)	Integridade gel de agarose*	Média das leituras (ηg/μL)	Rendimento (μg)	Integridade gel de agarose*	Média das leituras (ηg/μL)	Rendimento (μg)	Integridade gel de agarose*
1	I	41,05	1,95	Ok	243,495	11,57	Ok	230,015	10,93	Ok
	II	11,705	5,31	Ok	192,33	8,90	Ok	213,16	10,13	Ok
	III	101,925	4,84	Ok	351,92	16,28	Ok	149,935	7,12	Ok
	IV	85,62	4,07	Ok	246,6	11,71	Ok			
2	I	374,695	17,80	Ok	96,65	4,56	Ok	80,08	3,80	Ok
	II	184,705	8,77	Ok	156,285	7,42	Ok	90,88	4,32	Ok
	III	47,36	2,25	Ok	179,875	8,54	Ok	91,56	4,38	Ok
3	I	117,74	5,45	Ok	487,18	22,53	Ok	169,35	7,83	Ok
	II	76,08	3,61	Ok				318,85	15,15	Ok
	III	99,55	4,60	Ok						
	IV	121,615	5,81	Ok						
4	I	121,11	5,75	Ok	109,68	5,21	Ok	118,97	5,50	-
	II	10,14	0,48	Ok	81,7	3,88	Ok	166,135	7,89	-
	III	145,255	6,90	Ok	156,135	7,46	Ok	99,235	4,71	Ok
	IV				222,91	10,66	Ok	376,37	17,88	Ok
	V							59,18	2,81	Ok
	VI							245,245	11,65	Ok
5	I	187,77	8,92	Ok	131,805	6,26	Ok	14,865	0,69	Ok
	II	193,42	9,19	Ok	203,495	9,67	Ok	33,395	1,59	Ok
	III	202,405	9,61	Ok	111,655	5,30	Ok	18,26	0,87	Ok
	IV							98,01	4,66	Ok
	V							95,525	4,54	Ok
	VI							298,63	14,27	Ok

(-): Degradação do material genético. (Ok): Integridade do material genético. * Imagens dos géis não mostradas.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 9 - Dados do rendimento e integridade do RNA bruto após extração das colônias do grupo NIS

Amostra	Colônias	NIS								
		1ª Coleta			2ª Coleta			5ª Coleta		
		Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Integridade gel de agarose*	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Integridade gel de agarose*	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Integridade gel de agarose*
1	I	176,45	8,38	Ok	149,555	7,10	Ok	103,29	4,91	Ok
	II	89,26	4,24	Ok	159,51	7,57	Ok	100,45	4,77	Ok
	III	197,05	9,36	Ok	215,355	9,96	Ok	89,255	4,24	-
	IV	126,03	5,99	Ok			Ok	362,33	16,76	Ok
2	I	76,9	3,65	Ok	271,675	12,90	Ok	122,99	5,84	Ok
	II	110,375	5,24	Ok	418,605	19,88	Ok	115,155	5,47	Ok
	III	108,14	5,14	Ok	206,215	9,80	Ok	161,75	7,68	Ok
	IV				294,84	14,00	Ok			
3	I	159,545	7,58	Ok	184,545	8,77	Ok	118,74	5,64	Ok
	II	328,885	15,62	Ok	183,075	8,70	Ok	286,59	13,25	Ok
	III	252,835	12,01	Ok	108,26	5,14	Ok	197,615	9,39	Ok
4	I	356,67	16,94	Ok	204,54	9,72	Ok	639,34	30,37	Ok
	II	362,47	17,22	Ok	134,41	6,38	Ok			
	III	442,96	21,04	Ok						
5	I	97,1	4,61	Ok	312,175	14,83	Ok	375,29	17,83	Ok
	II	214,19	10,17	Ok	155,61	7,39	Ok	301,205	14,31	Ok
	III	126,79	6,02	Ok				308,61	14,66	Ok

(-): Degradação do material genético. (Ok): Integridade do material genético. * Imagens dos géis não mostradas.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.1.2 Purificação do RNA

Todas as colônias (com RNA íntegro) de cada paciente em cada coleta foram unidas para que tivesse um maior rendimento do RNA, para assim, perder menos material genético durante a purificação das amostras. As colônias que apresentavam degradação foram descartadas. A purificação foi realizada seguindo a metodologia descrita neste estudo. Para as amostras 1 aPDT 2ª coleta, 2 NIS 2ª coleta e 4 NIS 1ª coleta, o protocolo de purificação foi o *Mini kit*. Os resultados estão descritos nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Dados do rendimento do RNA após 1ª etapa de purificação (DNase I) do grupo aPDT

Amostra	aPDT					
	1ª Coleta		2ª Coleta		5ª Coleta	
	1ª etapa purificação		1ª etapa purificação		1ª etapa purificação	
	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)
1	312,13	5,46	678,58	18,66	640,73	11,21
2	738,35	12,92	462,14	8,09	240,64	4,21
3	369,77	6,47	520,87	9,12	411,61	7,20
4	124,39	2,18	335,87	5,88	674,22	11,80
5	491,74	8,61	313,52	5,49	296,07	5,18

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 11 - Dados do rendimento do RNA após 1ª etapa de purificação (DNase I) do grupo NIS

Amostra	NIS					
	1ª Coleta		2ª Coleta		5ª Coleta	
	1ª etapa purificação		1ª etapa purificação		1ª etapa purificação	
	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)
1	689,69	12,07	599,45	10,49	688,21	12,04
2	297,3	5,20	919,555	24,37	383,05	6,70
3	685,88	12,00	405,8	7,10	548,99	9,61
4	1013,86	26,87	207,29	3,63	636,29	11,14
5	316,41	5,54	368,48	6,45	1116,7	19,54

Fonte: Elaboração própria.

Após a 1ª etapa da purificação do material genético observou-se rendimento suficiente para prosseguir com o experimento. As amostras, portanto, foram submetidas ao tratamento com Turbo DNase (Ambion) e posteriormente submetidas à terceira etapa de purificação com o kit *RNeasy MinElute clean-up* (Qiagen). Os dados de rendimento final de RNA total purificado estão nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Dados do rendimento do RNA total purificado do grupo aPDT

Amostra	aPDT					
	1ª Coleta		2ª Coleta		5ª Coleta	
	RNA purificado		RNA purificado		RNA purificado	
	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)
1	239,84	4,32	730,94	13,16	479,21	8,63
2	618,81	11,14	400,28	7,21	175,54	3,16
3	315,68	5,68	407,09	7,33	443,66	7,99
4	122,44	2,20	261,28	4,70	592,91	10,67
5	427,67	7,70	274,17	4,94	261,69	4,71

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 13 - Dados do rendimento do RNA total purificado do grupo NIS

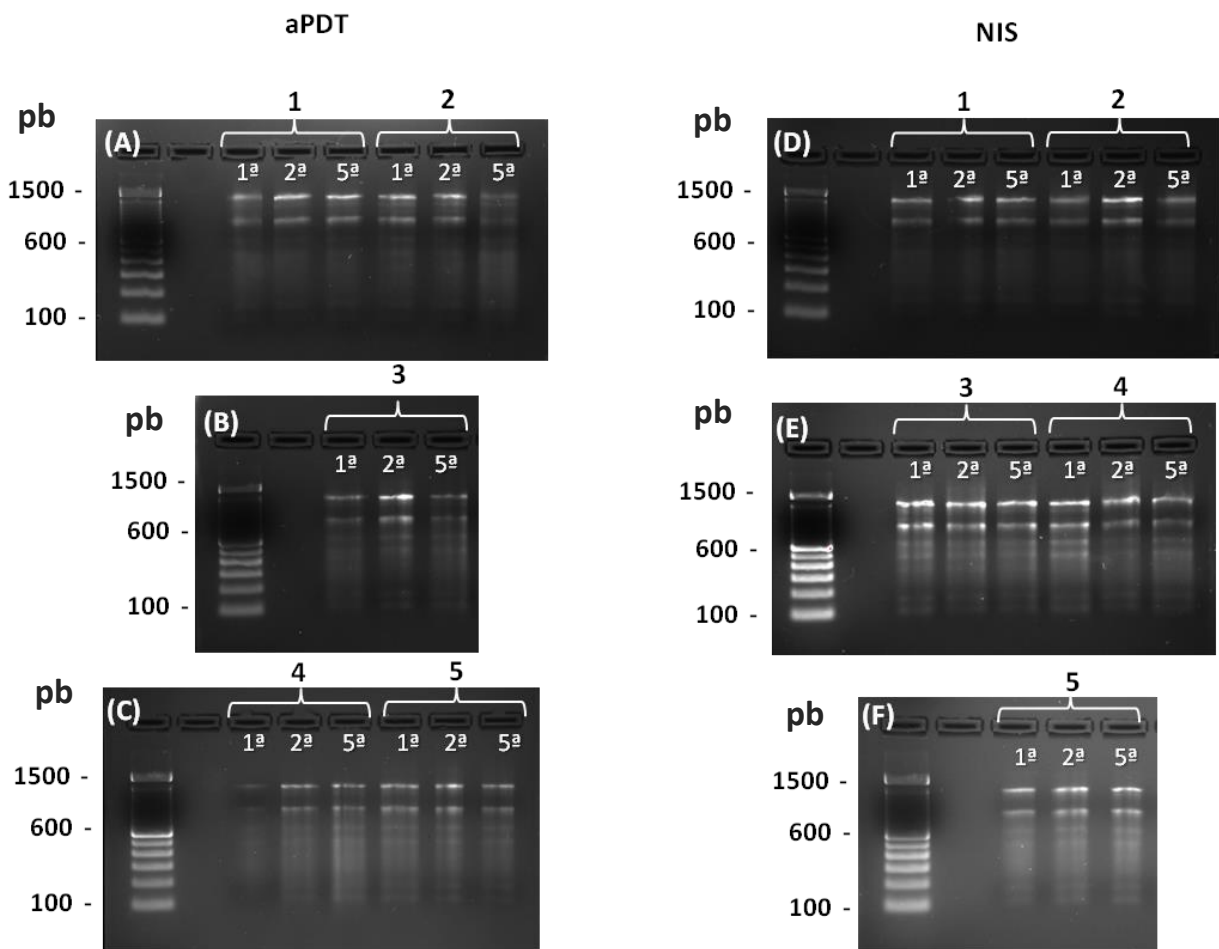
Amostra	NIS					
	1ª Coleta		2ª Coleta		5ª Coleta	
	RNA purificado		RNA purificado		RNA purificado	
	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (μg)	Média das leituras (ng/μL)	Rendimento (ug)
1	582,58	10,49	460,96	8,30	559,85	10,08
2	240,79	4,33	1069,42	19,25	307,25	5,53
3	558,4	10,05	317,31	5,71	455,97	8,21
4	1176,08	21,17	169,05	3,04	501,59	9,03
5	234,8	4,23	324,54	5,84	945,93	17,03

Fonte: Elaboração própria.

O RNA purificado foi testado através da técnica de eletroforese em gel de agarose para analisar integridade do material genético. Pode-se observar na Figura 12 a integridade do

RNA de todos os pacientes em todas as coletas, pois pode-se observar bandas de RNA ribossomal 28S rRNA (banda superior) e 18S rRNA (banda inferior). Observa-se nessa imagem que não há a presença de DNA, afirmando assim, a efetividade dos tratamentos com DNase e a integridade do mesmo. Os géis foram realizados com 0,250 µg do material genético em cada poço.

Figura 12 - Imagem do material genético (RNA) purificado através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2%



Os números superiores ditam as amostras. As coletas são demonstradas com os símbolos: 1^a para 1^a coleta; 2^a para 2^a coleta e 5^a para 5^a coleta. Nota-se integridade das bandas correspondentes à RNA ribossomal para todas as amostras em todas as coletas avaliadas. Observa-se também ausência de DNA.

Fonte: Elaboração própria.

5.2.1.3 Síntese do cDNA – Isolados clínicos

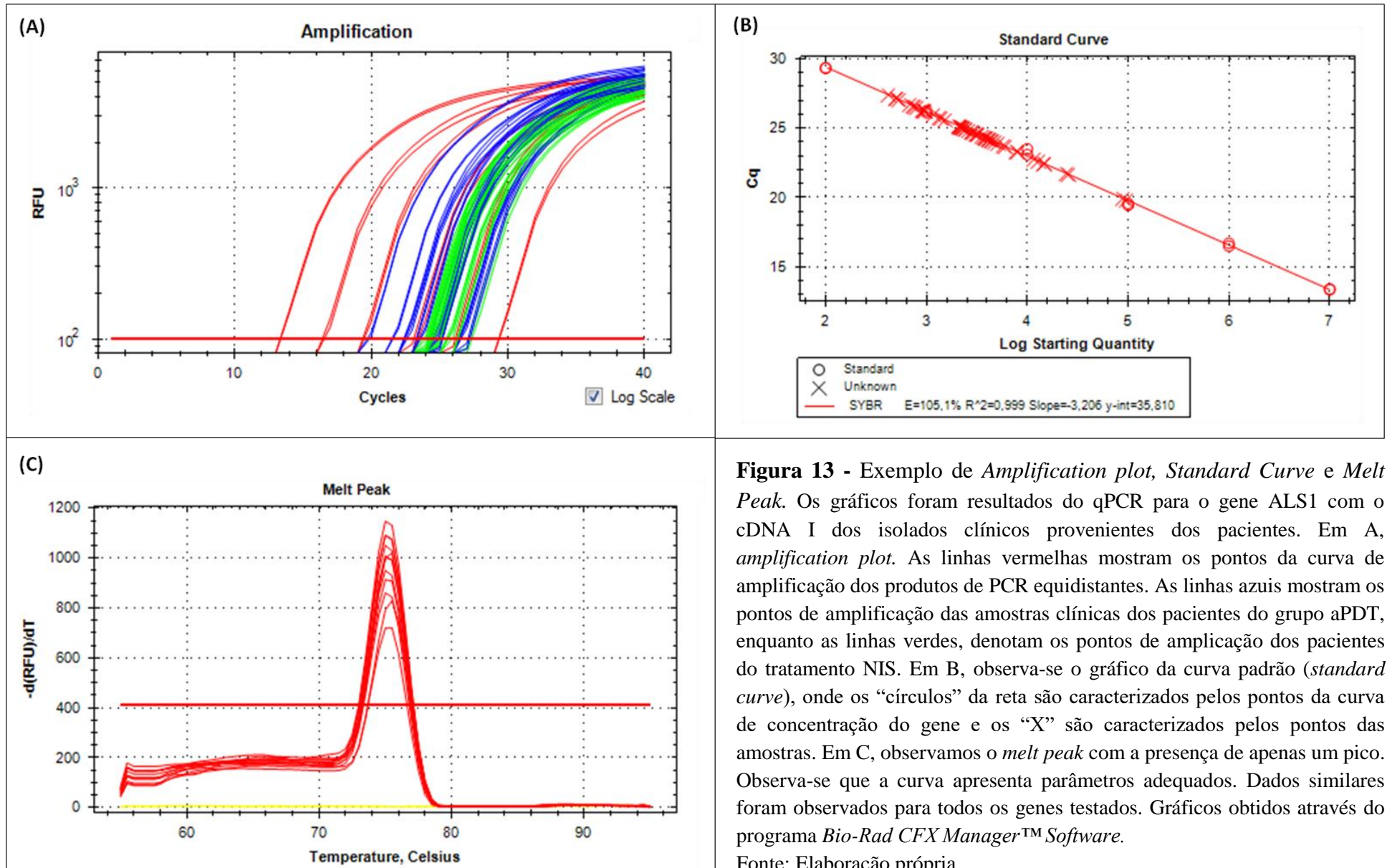
As amostras de RNA foram diluídas para que chegasse a concentração de 100 ng/μL. Então, o cDNA foi confeccionado com 1μg de RNA seguindo a metodologia proposta em 4.2.2.6. Foram confeccionados dois cDNAs +RT para cada amostra de cada coleta e um cDNA –RT (amostra em que não é colocada a enzima Transcriptase Reversa, a qual não deve apresentar expressão gênica se o material genético não estiver contaminado). Para as amostras 4 NIS 2ª, 4 aPDT 1ª e 2 aPDT 5ª foi confeccionado apenas 1 +RT devido a baixa quantidade do material genético.

5.2.1.4 qPCR Quantitativo para avaliação de expressão gênica em Isolados Clínicos de *C. albicans*

Para a técnica de qPCR, utilizou-se a reação descrita na metodologia 4.2.2.7. Cada placa continha a curva de concentração do gene de interesse bem como o cDNA das amostras dos isolados clínicos de ambos os grupos. Foi realizada uma placa para o cDNA I e outra para o cDNA II. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Todas as reações de qPCR foram analisadas e apresentaram *Melt Curves* ideais (com apenas 1 pico), coeficiente de correlação $\cong 1$ e eficiência da reação entre 90 – 110%, com slope de $\cong -3.3$. (Figura 13). O *Threshold* foi estabelecido em 100 para todos os genes. Uma placa com a curva de concentração do ACT1 e o cDNA –RT foi submetida ao ciclo do qPCR e não houve amplificação dos produtos de PCR dos controles negativos (-RT) de todas as amostras entre os pontos da curva garantindo pureza do RNA (ausência de DNA).

Para os genes SOD1 e SAP1, o tempo do “ciclo de polimerização” (Ciclo 2/*Step* 4), foi alterado para 30 segundos ao invés de 15. Esse ciclo representa o tempo de extensão do produto de PCR. Quando a reação aconteceu com os 15 segundos do tempo de extensão, a eficiência ficou baixa. Quando o tempo foi alterado, os parâmetros ficaram ideais. O tamanho dos produtos de PCR desses *primers* (SOD1: 396 pb e 161 pb para SAP1) podem explicar a necessidade do aumento desse ciclo, pois possivelmente, não estava ocorrendo extensão efetiva de todo o *amplicon* com o tempo de 15 segundos. Não houve expressão gênica de todos os genes alvo na amostra 4 do grupo aPDT na 1ª coleta. Como todos os cDNAs foram confeccionados da mesma forma e na mesma ocasião, possivelmente ocorreu um erro para tal problema, resultando na exclusão do paciente da pesquisa para não gerar resultados falsos negativos.

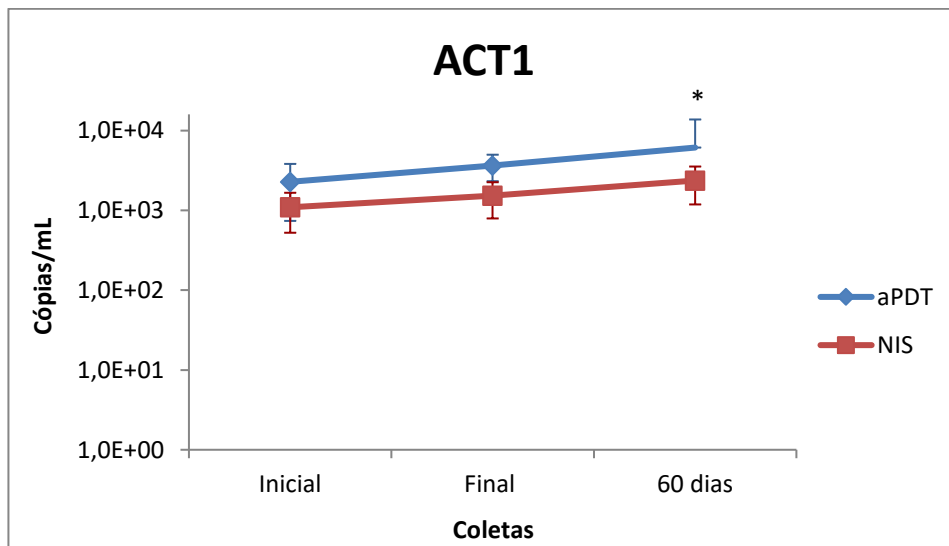
As médias dos dados *Start Quantify* “*SQ mean*” foram submetidas à análise estatística para analisar se os diferentes tratamentos influenciaram, longitudinalmente (3 coletas) a expressão gênica dos genes de virulência objetivos desse estudo. Os dados da expressão gênica para os genes ACT1, CAP1, CAT1, LIP3 e PLB1 passaram no pressuposto de normalidade ($p < 0,05$) enquanto que no teste de homogeneidade, os dados para os genes CAP1, CAT1, EFG1 e LIP3 foram considerados homogêneos ($p > 0,05$). Os genes não citados não aceitaram a normalidade e homogeneidade ($p < 0,05$). Um detalhe a ser observado é que este teste estatístico, para amostras pareadas, necessita de outro teste como pressuposto, o teste de esfericidade. Para aqueles dados que passaram nesse pressuposto (CAP1, EFG1, LIP3, PLB1 e SOD1), assumiu-se a esfericidade ($p > 0,05$) para a consulta do resultado da Análise de Variância para Medidas Repetidas Mista. Para aqueles que não passaram na esfericidade ($p < 0,05$) (ACT1, ALS1, CAT1, HWP1 e SAP1), os dados foram normalizados com a correção de Greenhouse – Geisser (para amostras com “n” pequeno). Devido à robustez do teste e a possibilidade de correção da esfericidade (pressuposto mais importante para dados pareados), esse teste é passível de aceitar inexactidões dos pressupostos. Assim, apesar da importância dos pressupostos, os genes que não os aceitaram foram mantidos e o teste foi realizado para todos os genes. Um teste não paramétrico não era uma opção para este estudo devido às características dos dados e devido a presença de variável dependente e independente. O fator “*Coletas*” foi considerado como a origem das medidas repetidas e o fator “*Tratamento*” como independente.



Como observado nas características listadas dos genes de interesse no Quadro 1 deste estudo, o gene ACT1, usado na maioria dos trabalhos para normalização dos dados como controle interno, também tem influência na transição da morfologia de *C. albicans* de levedura para hifa, agindo também na formação do biofilme. Diante dessa característica, os dados da expressão do gene ACT1, cujo *primer* foi delineado neste estudo, foram submetidos à análise estatística individual para posterior análise se os dados da expressão gênica seriam normalizados por ele ou não. Como pode ser observado no perfil do gráfico (Figura 14), o gene ACT1 não apresentou expressão constante nas diferentes coletas e nos diferentes grupos (perfil esperado para um gene normalizador). Dessa forma, optou-se por analisar os dados da expressão gênica dos genes alvos sem submetê-los a normalização pelo gene ACT1.

Os dados apresentaram diferença estatística entre os tratamentos aPDT e NIS ($p = 0,046$), onde a expressão do gene ACT1 foi superior no grupo aPDT independente das coletas. As diferentes coletas não apresentaram diferença estatística entre si ($p = 0,080$). De acordo com este resultado, os autores optaram por não normalizar os genes de virulência pelo gene ACT1.

Figura 14 - Expressão do gene ACT1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)

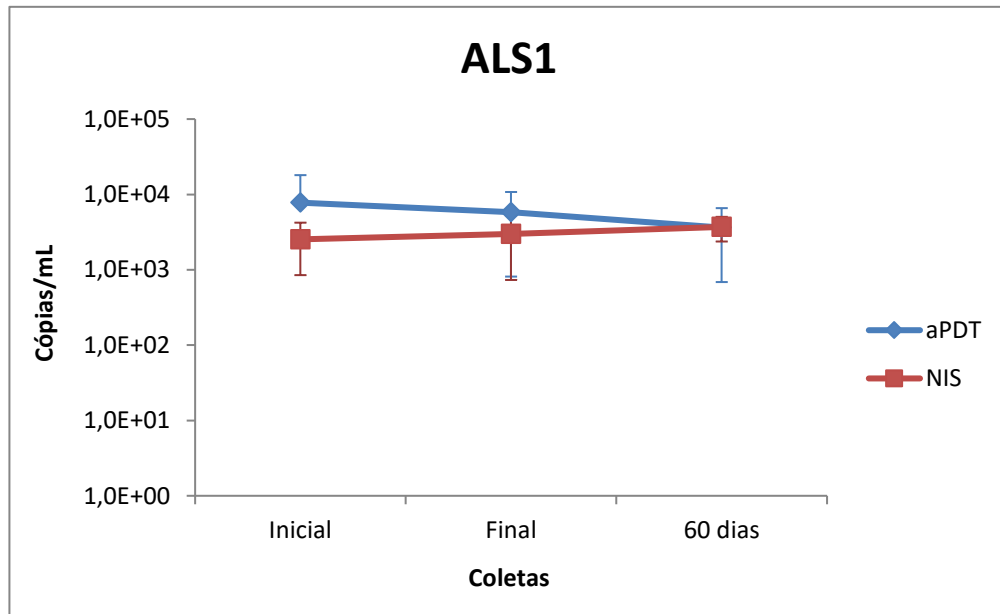


Média e desvio padrão da expressão do gene ACT1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O asterisco (*) denota diferença estatística entre os tratamentos independente da coleta ($p < 0,05$). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 15, não houve diferença estatística significativa na expressão do gene ALS1 (*primer* delineado) nas diferentes coletas ($p = 0,311$) e terapias utilizadas ($p = 0,088$).

Figura 15 - Expressão do gene ALS1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)



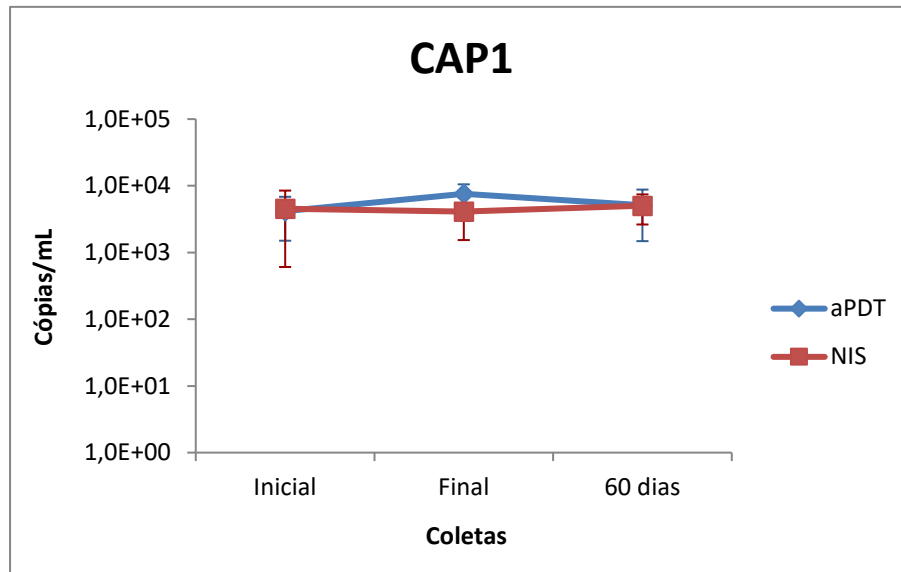
Média e desvio padrão da expressão do gene ALS1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

O gene CAP1, o qual também teve o *primer* delineado neste estudo, não apresentou diferença estatística significativa na expressão gênica nas diferentes coletas ($p = 0,480$). Os diferentes tratamentos também não influenciaram sua expressão ($p = 0,265$) (Figura 16).

Os tratamentos não influenciaram a expressão gênica do gene CAT1 (*primer* delineado) ($p = 0,155$) (Figura 17). No entanto, há diferença estatística significativa na expressão do gene CAT1 entre as coletas ($p = 0,019$) a qual foi identificada, através do pós-teste de Bonferroni, nas coletas Inicial e Final ($p = 0,041$) independente do tratamento sendo a expressão no grupo aPDT mais pronunciada que no grupo NIS.

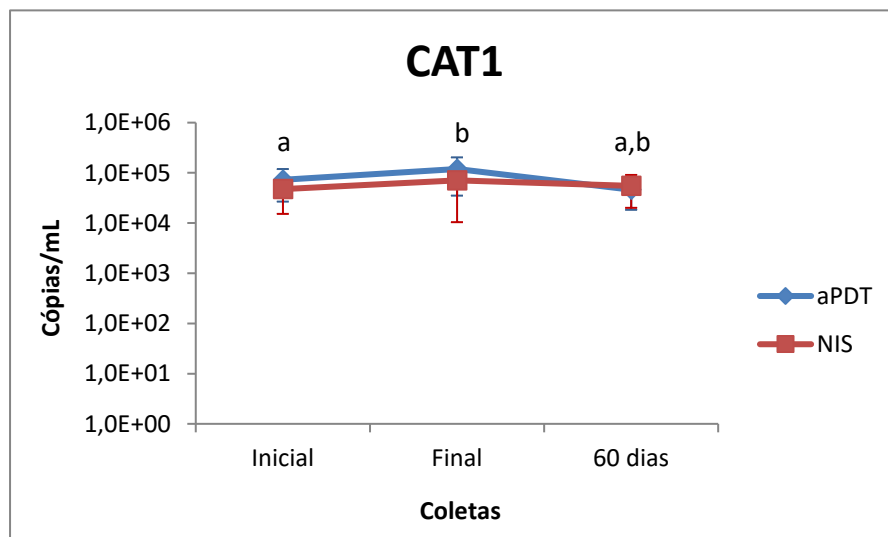
Figura 16 - Expressão do gene CAP1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)



Média e desvio padrão da expressão do gene CAP1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 17 - Expressão do gene CAT1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)

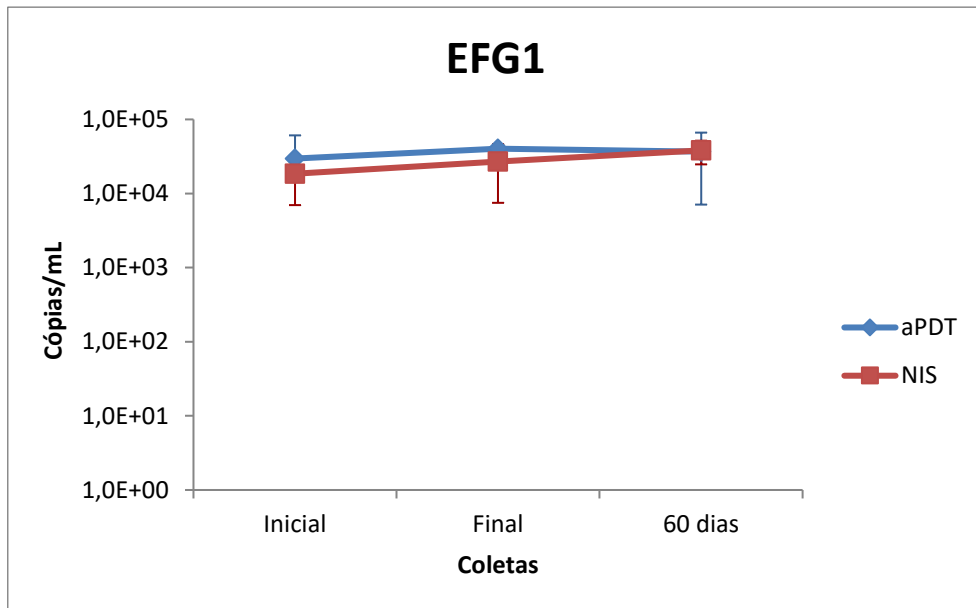


Média e desvio padrão da expressão do gene CAT1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Letras minúsculas iguais sobrescritas denotam diferença estatística entre as coletas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Com relação ao gene EFG1 (*primer* delineado neste estudo), não houve diferença estatística significativa na expressão desse gene nas diferentes coletas ($p = 0,249$) e nas duas terapias utilizadas ($p = 0,235$) (Figura 18).

Figura 18 - Expressão do gene EFG1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)

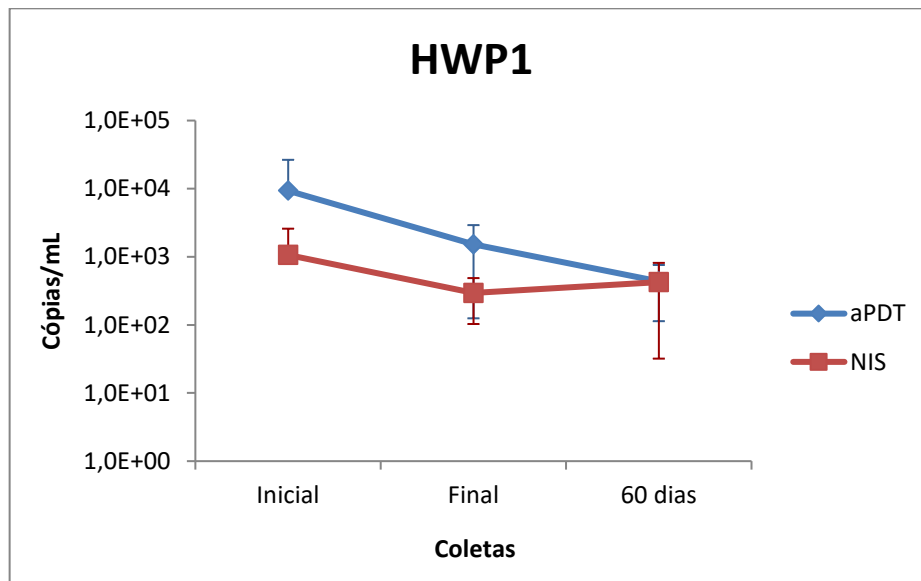


Média e desvio padrão da expressão do gene EFG1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Para o gene HWP1 (expressão analisada através do *primer* delineado) pode ser observado que os resultados não apresentaram diferença estatística significativa na expressão gênica nas três diferentes coletas ($p = 0,283$) e nas terapias aPDT e NIS ($p = 0,274$) (Figura 19). Houve diferença estatisticamente significativa na expressão do gene LIP3 (*primer* delineado) nas diferentes coletas ($p = 0,021$). O pós-teste (Bonferroni) identificou esta diferença entre as coletas Inicial e Final ($p = 0,039$) independente do tratamento, sendo a expressão no grupo aPDT maior que no grupo NIS. Assim, os diferentes tratamentos não influenciaram a expressão de tal gene ($p = 0,079$) (Figura 20).

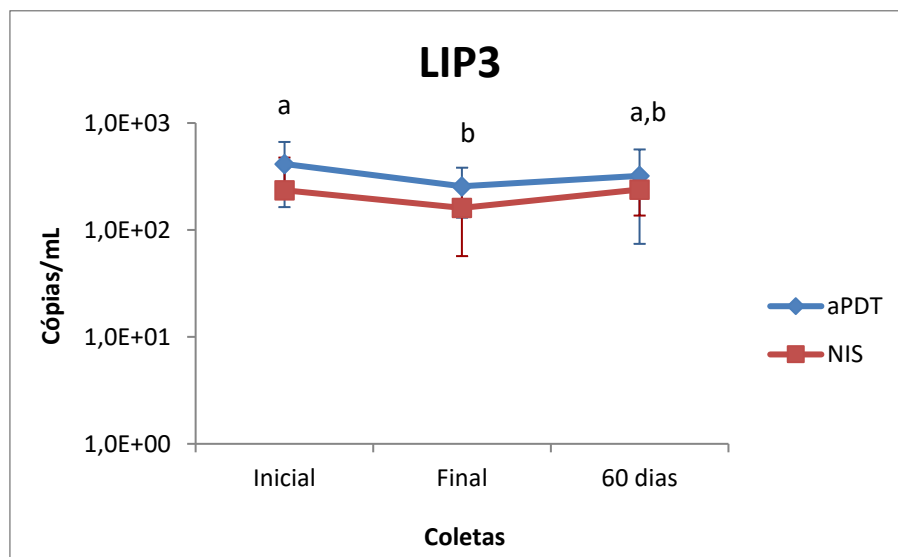
Figura 19 - Expressão do gene HWP1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)



Média e desvio padrão da expressão do gene HWP1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 20 - Expressão do gene LIP3 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)

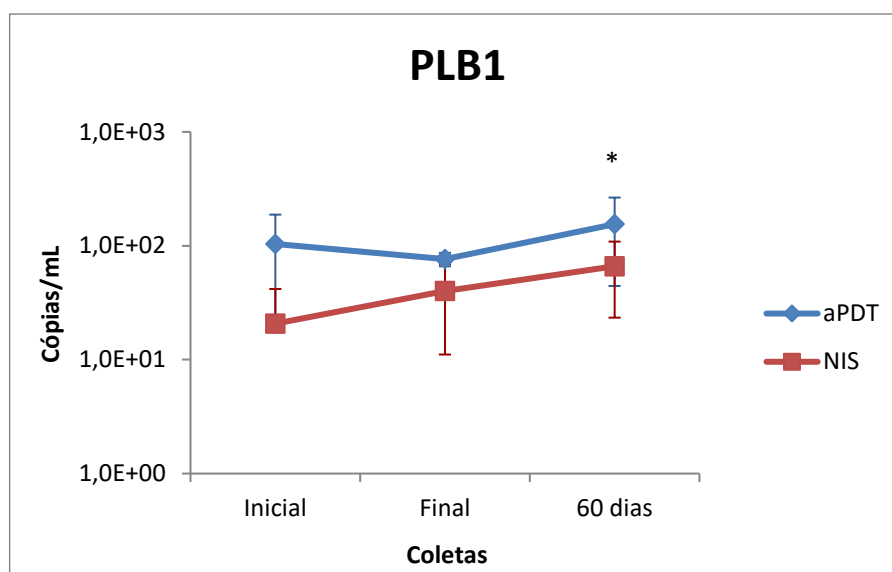


Média e desvio padrão da expressão do gene LIP3 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados. Letras minúsculas iguais sobrescritas denotam diferença estatística entre as coletas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Em relação ao gene PLB1 (*primer* delineado) pode ser observado na Figura 21 que os dados demonstraram diferença estatística significativa na expressão gênica entre os diferentes tratamentos ($p < 0,001$), onde a expressão do gene PLB1 na terapia aPDT é superior a NIS nos 3 tempos de coleta. Não há diferença estatística entre as 3 coletas ($p = 0,053$).

Figura 21 - Expressão do gene PLB1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)

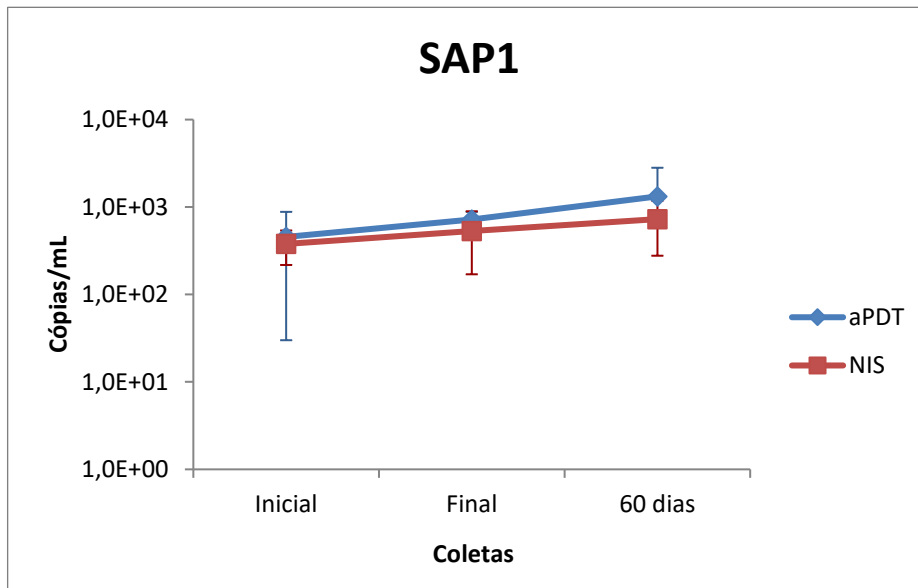


Média e desvio padrão da expressão do gene PLB1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O asterisco (*) denota diferença estatística entre os tratamentos independente da coleta ($p < 0,01$). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na Figura 22, não houve diferença estatística significativa na expressão do gene SAP1 (*primer* descrito por Naglik et al.⁵⁹) nas diferentes coletas ($p = 0,062$) e terapias utilizadas ($p = 0,130$). Em relação ao gene SOD1 (*primer* descrito por Zhu et al.⁸⁶) (Figura 23), o teste de Análise de Variância para Medidas Repetidas Mista permitiu visualizar que houve diferença estatística significativa na expressão do gene SOD1 nas diferentes coletas ($p = 0,021$). No entanto, o pós-teste Bonferroni não conseguiu identificar tal diferença ($p > 0,05$). Os diferentes tratamentos não influenciaram a expressão de tal gene ($p = 0,079$). O fato do pós-teste não ter conseguido detectar a diferença estatística pode ser explicado, pois, além do pós-teste ser muito conservador, a amostra tem um n pequeno e os dados não passaram nos testes de normalidade e homogeneidade.

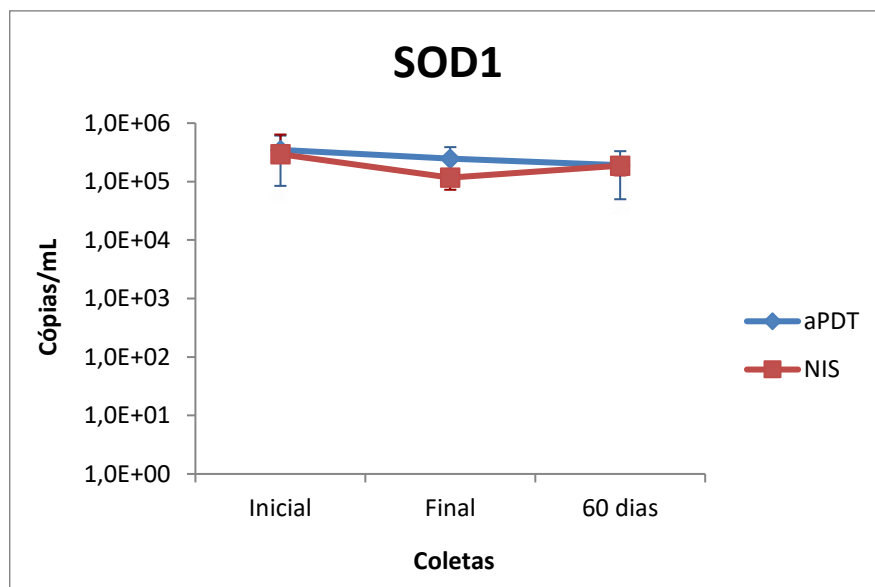
Figura 22 - Expressão do gene SAP1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)



Média e desvio padrão da expressão do gene SAP1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 23 - Expressão do gene SOD1 avaliada em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias)



Média e desvio padrão da expressão do gene SOD1 em cada grupo experimental nas diferentes coletas (inicial, final, 60 dias). O eixo Y está representado em escala Log_{10} para melhor visualização dos dados.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

A infecção da cavidade bucal causada por *Candida* spp., denominada candidose bucal, é a infecção fúngica mais frequente entre humanos, sendo *C. albicans* a espécie mais patogênica^{1,43,76}. A utilização de medicamentos tópicos e sistêmicos, principalmente os azóis, como a Nistatina, pode promover o desenvolvimento de resistência fúngica⁷². A incidência e prevalência de infecções superficiais e sistêmicas causadas por este fungo têm sido atribuídas a condições do hospedeiro, à resistência aos antifúngicos e a expressão de fatores de virulência dos micro-organismos, os quais podem ser expressos após exposição a antifúngicos para tratamentos da infecção. Com o objetivo de contornar a resistência aos antifúngicos, novas terapias estão sendo alvo de estudos, entre elas a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT) que vem sendo sugerida como um tratamento alternativo ou coadjuvante na inativação dos microrganismos^{28,31,81}. Neste tratamento, a luz em associação com o agente fotossensibilizador em presença de oxigênio produz ROS⁸ levando a morte celular.

Elucidar a expressão de genes de virulência associados à *Candida* spp., é de suma importância para o entendimento de como as abordagens terapêuticas afetam a expressão desses genes podendo ser um indicador da eficácia do tratamento/intervenção, pois nem sempre ocorre diminuição numérica significativa na população microbiana. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar, longitudinalmente, a expressão dos genes de virulência ALS1, CAP1, CAT1, EFG1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1, SOD1 e ACT1 em isolados clínicos de pacientes submetidos a diferentes terapias: convencional com Nistatina e aPDT. Para a correta análise da expressão gênica, foi também avaliada a especificidade dos *primers* da literatura, bem como de novos *primers* desenhados através de análises *in silico* e *in vitro*, além da padronização dos *primers* para sua utilização na técnica de RT-qPCR. É importante ressaltar não foram encontrados relatos na literatura que avaliaram o comportamento dos genes propostos após a aPDT. Deste modo, este trabalho, foi o primeiro a analisar os genes alvo após a aPDT, não possibilitando comparações diretas com a literatura.

Muitas técnicas têm sido utilizadas para identificar os principais fatores de virulência responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento da infecção no hospedeiro. A técnica de qPCR tem sido muito utilizada na biologia molecular por sua eficácia, especificidade e fidelidade¹⁴, e tem sido promissora para quantificação dos genes envolvidos uma vez que quantifica, e não apenas avalia qualitativamente, a expressão gênica. Tal fato faz com que o qPCR seja o método de escolha em biologia molecular. Entretanto, dentre os critérios que devem ser seguidos para que o ensaio de qPCR seja adequadamente realizado, destaca-se a

obtenção de um anelamento específico dos primers¹⁰, sendo este de extrema importância para que não haja reação cruzada com outras espécies ou genes, proporcionando resultados reais da expressão dos genes alvos. Tal característica deve ser avaliada, principalmente, nos estudos conduzidos em amostras clínicas, pois sabe-se que os pacientes com candidose oral podem apresentar mais de uma espécie de *Candida* em sua microbiota, além de biofilmes mistos com diversas espécies de microrganismos e de fatores ambientais que também afetam a virulência dos micro-organismos.

A metodologia *in silico* deste estudo assegurou a especificidade dos *primers* antes dos testes *in vitro*. Na literatura consultada não foi possível observar a descrição de todas as etapas de análise e padronização dos *primers*^{2,16,20,33,35,40,46,59,60,86} sendo que a maioria dos estudos que avaliaram a expressão de genes de virulência em *C. albicans* foram conduzidos em amostras *in vitro*^{2,16,20,35} ou em modelos animais (*in vivo*)⁶⁰. Essas condições permitem maior controle das condições experimentais, diferente de amostras clínicas, em que a maior dificuldade é a falta de controle das condições do meio, mesmo que a seleção de voluntários seja criteriosamente realizada. Os dados obtidos neste estudo puderam afirmar que os *primers* da literatura para os genes SAP1 (Naglik et al.⁵⁹) e HWP1 (Alves et al.²) foram específicos para *C. albicans*, enquanto que o *primer* da literatura para o gene ACT1 (Alves et al.²) não apresentou especificidade para *C. albicans*. O *primer* para o gene SOD1 (Zhu et al.⁸⁶) foi detectado em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Os *primers* desenhados para os genes ACT1, ALS1 e HWP1 foram detectados apenas em *C. albicans*, enquanto que os *primers* delineados para os genes CAP1, CAT1, EFG1, LIP3 e PLB1 foram detectados em *C. albicans* e *C. dubliniensis*.

No estudo conduzido por Nailis et al.⁶⁰, os autores citaram a especificidade dos *primers* (verificado por *Blast*), a ausência de reação cruzada com outros organismos, e eficiência entre 90 e 110%, além de ausência de estruturas secundárias. Em contraste, quando os *primers* para os genes ACT1, SAP1, SAP4, PLB1, LIP3 e HWP1 descritos por esses autores nesse estudo⁶⁰ foram submetidos à análise *in silico* no presente estudo, não foram observadas tais características. Além disso, as sequências dos *primers* para os genes ACT1, HWP1, SAP1 e SAP4 não foram encontradas nas sequências de genes obtidas a partir do *Candida Genome Database* e *Pubmed*. Ademais, os testes *in vitro* realizados no presente estudo demonstraram que os *primers* para os genes ACT1, HWP1, LIP3, PLB1, SAP1 e SAP4 (Nailis et al.⁶⁰) foram detectados em outras espécies de *Candida*, inclusive na amplificação para o controle negativo (H₂O de grau molecular) (Figura 6A e B). Os produtos

de PCR nos controles negativos podem ser explicados pela presença de estruturas secundárias nos *primers* (mostrados na análise *in silico*), que permitem ligações inter e intramoleculares que resultam em produtos inespecíficos. A reação cruzada com diferentes espécies de *Candida* foi também confirmada por análise *in silico* através das ferramentas *Blast* e *ClustalW2*. Portanto, com base nestes resultados, estes *primers* não são indicados para estudos com amostras clínicas de pacientes. Seleem et al.⁷⁴ conduziram um estudo *in vitro* no qual os *primers* utilizados foram os descritos por Nailis et al.⁶⁰. Os autores observaram que a expressão dos genes SAP1 e PLB1, após uma nova terapia contra candidose utilizando o composto antifúngico Monolaurina, não mostrou diferença estatística quando comparada com o controle (etanol 1%). Talvez, esses resultados possam ser atribuídos à ausência de especificidade dos *primers*, que podem ter expressado produtos inespecíficos.

Após análises *in silico* dos *primers* descritos por Alves et al.² (ACT1, ALS1, ALS3, HWP1, PLB1, SAP1 e SAP4), os *primers* para os genes ACT1 e HWP1 apresentaram boas características. No entanto, o presente estudo demonstrou através de análise *in vitro* que o *primer* para o gene ACT1 possui reação cruzada com *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (Figura 6C). Por outro lado, o par de *primers* descrito por Alves et al.² para o gene HWP1 mostrou especificidade para *C. albicans* e pode ser utilizado para estudos *in vivo* (Figura 6E).

Embora o *amplicon* do par de *primers* descrito por Naglik et al.⁵⁹ para o gene SAP1 apresente sequência maior (161 pb) do que a ideal (80 – 150 pb, segundo descrito por Bustin¹⁰), este foi o escolhido para análise *in vitro*. Esta escolha foi baseada na descrição, a partir dos autores, da especificidade dos *primers* e da utilização dos mesmos em amostras clínicas de pacientes com lesões de candidose oral e vaginal⁵⁹. No teste *in vitro* realizado neste estudo, observou-se que os *primers* para o gene SAP1 apresentaram especificidade para *C. albicans* (Figura 6E), porém os *primers* para o gene SAP4 descritos não mostraram boas características *in silico*, os quais apresentaram alta homologia nas sequências SAPs. Os *primers* descritos para o gene PLB1 também não apresentaram boas características *in silico* e não foram testados *in vitro*.

No presente estudo, o par de *primers* para o gene SOD1 descrito por Zhu et al.⁸⁶ reagiu com o DNA de *C. albicans* e *C. dubliniensis* (Figura 6D). A detecção de alguns *primers* deste estudo nas espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* pode ser esclarecida pelas características intimamente relacionadas de ambas as espécies, sendo difícil o discernimento das mesmas em amostras clínicas^{30,52}. Para interpretar a dificuldade em encontrar *primers* específicos para *C. albicans*, a literatura demonstra que ambas as espécies compartilham muitas características

fenotípicas, incluindo a capacidade de produzir hifas e clamidósporos^{30,39,52,57}. Jackson et al.³⁹ realizaram um estudo com o objetivo de comparar a patogenicidade de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, pois mesmo que ambas as espécies apresentem sequências genômicas muito parecidas, possuem patogenicidades diferentes. Os autores mostraram que embora *C. dubliniensis* seja um patógeno significativamente menos virulento e menos versátil que a *C. albicans*, eles compartilham muitas características fenotípicas com sintenia mantida (conservação na ordem e no conteúdo de genes entre espécies relacionadas), incluindo a capacidade de formar hifa. Mesmo diante de tanta similaridade genômica, embora alguns genes tenham apresentado especificidade para *C. albicans*, esta condição de similaridade pode explicar a detecção de bandas para os *primers* delineados para os genes LIP3, CAT1, CAP1, EFG1 e PLB1 em ambas as espécies (Figura 7). Esta reação cruzada não impede a utilização do *primer* em estudos in vivo porque, embora exista a homologia, *C. albicans* é mais prevalente quando comparada a *C. dubliniensis*³⁹.

O programa para delineamento de *primers Beacon Designer*TM para genes que não tinham bons *primers* na literatura (após análises in silico e in vitro) foi o escolhido. Segundo Nolan et al.⁶³, o *Beacon Designer*TM é o programa comercial mais abrangente. Os novos *primers* foram arquitetados utilizando as características descritas por Bustin¹⁰ e Thornton et al.⁸⁰. De acordo com Thornton et al.⁸⁰, a temperatura de anelamento ideal deve estar próximo de 59/60°C. Por outro lado, Bustin¹⁰ descreveu que a temperatura ideal deve estar em torno dos 55°C pois a T_m de uma molécula de DNA depende do tamanho e da composição dos nucleotídeos, portanto, amplicons ricos em guanina e citosina têm um T_m maior do que aqueles com mais pares de bases adenina e timina (Nolan et al.⁶³). O controle de qualidade para o delineamento de um *primer* foi descrito como essencial por Nolan et al.⁶³, que elencaram os parâmetros mais importantes: maior eficiência e sensibilidade dos *primers* e ausência de dímeros de *primers*. Tal como descrito por Nolan et al.⁶³, a análise da *Melt Curve* é uma poderosa ferramenta que fornece uma identificação precisa dos produtos amplificados, distinguindo-os de produtos inespecíficos (artefatos) e dímeros de *primers*. Os *Amplification plots* dos genes deste estudo mostraram diluições equidistantes e um único pico na *Melt curve*, o que é um bom indicador da eficiência do *primer*.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que houve diferença estatística na expressão dos genes CAT1 e LIP3 entre as coletas Inicial (sem nenhum tratamento) e Final (após finalização do tratamento). Para o gene CAT1, sua expressão na coleta final foi superior em relação à coleta inicial tanto no grupo tratado com aPDT quanto NIS (Figura 17). Para o

gene LIP3, houve uma redução significativa de sua expressão da coleta inicial com a final independente do tratamento (Figura 20). Para o gene SOD1, também houve a diminuição de expressão entre as coletas independente dos tratamentos (Figura 23). A expressão do gene PLB1 foi diferente entre as coletas onde foi observado maior expressão no grupo aPDT, independente das coletas (Figura 21). Embora a expressão do gene PLB1 tenha sido superior em todas as coletas no grupo aPDT, o gráfico mostrou uma tendência de diminuição da expressão na coleta final do tratamento aPDT quando comparado com a inicial. Em contraste, para os pacientes tratados com NIS, o perfil do gráfico foi de aumento constante na expressão em cada tempo avaliado. Para os genes ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 e SAP1 não houve diferença estatística entre as coletas independente dos tratamentos aPDT e NIS, os quais também não influenciaram a expressão de tais genes.

Embora este estudo não tenha encontrado diferenças significativas na expressão dos genes de virulência dos isolados clínicos tratados com aPDT quando comparados com NIS, tem sido relatado resultados positivos com a utilização aPDT mediada pelo *Photoditazine* (PDZ) associada a luz LED na inativação de *C. albicans* tanto no tratamento da candidose em camundongos quanto em pacientes. Carmello et al.¹² em 2015, demonstraram a eficácia dessa terapia na inativação do fungo após uma aplicação da terapia sem causar qualquer efeito nocivo sobre o tecido do hospedeiro. Em outro estudo¹¹, foi demonstrado que a aPDT foi tão eficaz quanto a Nistatina no tratamento da candidose induzida em camundongos, sendo observada remissão completa das lesões orais nos animais tratados com aPDT enquanto que os animais tratados com Nistatina apresentaram remissão parcial de lesões nos períodos avaliados. Embora utilizando outro fotossensibilizador (Photogem[®]), a eficiência da aPDT também foi avaliada em um estudo clínico conduzido por Mima et al.⁵⁵. Os autores demonstraram redução no número de colônias viáveis de *Candida* spp. após o término do tratamento (coleta final) e redução dos sinais clínicos de inflamação do palato, sendo que a aPDT foi tão efetiva quanto à aplicação da Nistatina no tratamento da estomatite protética. Tal eficácia clínica do tratamento também foi observada nos pacientes do presente estudo (dados não mostrados). Embora estudos já tenham avaliado o efeito da aPDT em suspensões planctônicas^{13,23}, biofilmes^{23,29,54,68}, em animais^{11,12,53} e humanos⁵⁵, os efeitos que as aplicações sucessivas de aPDT podem causar nos genes responsáveis pela expressão de fatores de virulência de *C. albicans* ainda não tinham sido avaliados até o presente momento.

Ainda que não tenha sido observada diferença estatística na expressão do gene ALS1, o perfil do gráfico (Figura 15) pode denotar tendência de diminuição da expressão do gene no

grupo aPDT quando a coleta inicial é comparada com a final e controle posterior (60 dias). Um perfil de expressão antagônico foi observado para a expressão do gene ALS1 no grupo NIS. Segundo Nobile et al.⁶², o gene HWP1 promove a interação direta de *C. albicans* com as células do hospedeiro (tanto in vitro quanto in vivo). Esta interação é substancialmente exacerbada pela presença de ALS1/ALS3 que são ativados quando há o contato inicial microrganismo/hospedeiro pelo gene HWP1⁶². Corroborando com o atual estudo em isolados clínicos de pacientes, a diminuição longitudinal da expressão dos genes ALS1 e HWP1 no grupo aPDT pode ser explicada pela possível desorganização estrutural do biofilme causada pela aPDT. Essa desorganização impede que a expressão desses genes de adesão dos microrganismos seja exacerbada. Em contraste, no teste realizado no grupo NIS, o gene ALS1 tende a manter sua expressão ao final do tratamento além de ter maior expressão 60 dias após a terapia aplicada. Em relação ao gene HWP1, sua expressão foi diminuída ao final do tratamento em ambos os grupos, no entanto, esta foi exacerbada no controle posterior no grupo tratado com NIS (Figura 19). Tal fato pode sugerir o aumento de virulência dos microrganismos quando tratados com NIS. Esse aumento de expressão gênica nas coletas pós-tratamento pode ser explicado pelo fato do biofilme começar a se reorganizar após a suspensão do uso do medicamento Nistatina, fato que pode ser comprovado também clinicamente, em que as lesões de candidose recidivam durante o controle posterior [observação do estudo clínico de Fernanda Alves (dados não mostrados)]. Embora a expressão do gene ALS1 tenha sido superior no grupo aPDT quando comparado ao NIS para as coletas Inicial e Final, sua expressão não foi influenciada pelos tratamentos. Essa maior expressão gênica no grupo aPDT também pode ser observada em outros genes, inclusive na 1ª coleta (em que os pacientes ainda não haviam recebido tratamento), tal observação pode ser esclarecida pelas características inerentes de cada paciente.

A expressão do gene PBL1, que codifica uma fosfolipase, foi diferente entre os tratamentos, Esse gene apresentou maior expressão em todos os tempos no grupo tratado com aPDT quando comparada com o grupo tratado com o tratamento convencional (NIS) (Figura 21). Essa diferença entre os tratamentos pode ser observada desde a coleta inicial, sem as células terem sido submetidas a nenhum tratamento. Essa diferença de expressão também pode ser explicada por características próprias dos pacientes de cada grupo. Embora não tenha tido observado diferença entre as coletas, o perfil de expressão do grupo aPDT mostra declínio na expressão de PLB1 da coleta inicial para a final, enquanto que na coleta final (60 dias), observa-se elevação da expressão. Para o grupo NIS, observa-se constante aumento na

expressão gênica deste gene. Caracterizado por promover adesão e penetração do fungo na célula do hospedeiro, este gene contribui para destruição tecidual^{44,59}. Como pode ser observado na Figura 21, observa-se expressão exacerbada desse gene após 60 dias do início do tratamento nas duas terapias utilizadas, sugerindo uma possível reinfecção dos sítios estudados após ambos os tratamentos. Nota-se que a expressão do PLB1 60 dias após o início dos tratamentos no grupo NIS foi superior à expressão de tal gene na coleta inicial, sugerindo maior capacidade de adesão e penetração dos fungos após serem tratados com a terapia convencional.

Komalapriya et al.⁴⁰ afirmaram que *C. albicans* expressa níveis basais relativamente elevados de catalase na ausência de estresse, sendo esta enzima crítica para a desintoxicação rápida do composto H₂O₂ pelas células de *C. albicans*, desempenhando um papel crítico na resposta ao estresse oxidativo e na rápida regulação da presença de ROS, contribuindo para a homeostase. Correlacionando os resultados do estudo com os encontrados na expressão de CAT1 nos isolados clínicos deste estudo (Figura 17), o ligeiro aumento na expressão do gene da coleta inicial para a final no grupo aPDT pode ser explicada pelo comportamento de proteção de *C. albicans* em relação ao estresse oxidativo causado pela terapia, que gera ROS. O mesmo comportamento também pode ser visualizado no grupo NIS, em que as células do fungo, possivelmente, se protegem das ROS geradas pelo hospedeiro para proteção contra o invasor. Após 60 dias do início da terapia, os níveis de expressão de tal gene apresentaram menor expressão, uma vez que, hipoteticamente, os microrganismos já não sofriam com elevadas produções de ROS. A diminuição da expressão gênica na coleta final do tratamento denota decréscimo deste fator de virulência, diminuindo sua contribuição para a virulência de *C. albicans*. Outro gene também relacionado à resposta ao estresse oxidativo é o CAP1 (Figura 16), para o qual pode ser observado o mesmo comportamento que o gene CAT1 nos isolados clínicos deste estudo (Figura 16).

A grande maioria das evidências recentes sugere que *C. albicans* possui um sistema robusto de desintoxicação sendo os genes SOD1 e SOD5 expressos durante o crescimento exponencial de *C. albicans*⁴⁶ em que o SOD1 é o responsável principal pela remoção dos ROS gerados por macrófagos³⁸. O presente estudo revela que há uma diminuição sutil, porém constante, na expressão do gene SOD1 ao longo do tratamento e controle posterior para o grupo aPDT (Figura 23) (sem diferença estatística). Para o grupo NIS, nota-se uma diminuição mais acentuada no final do tratamento quando relacionado à coleta inicial, no entanto, observações não estatisticamente significantes. Uma observação a ser realizada é que

a expressão do gene SOD1 após 60 dias do tratamento com Nistatina foi ligeiramente maior, sendo mais elevada do que a expressão ao final do tratamento, este dado permite observar que há uma tendência em aumentar a virulência de *C. albicans* quando comparado às células tratadas com aPDT, pois aPDT demonstrou queda constante na expressão de SOD1 (Figura 23) possivelmente denotando menor capacidade de desenvolver virulência.

EFG1 é um gene regulador de transcrição que controla a formação de biofilme em *C. albicans* e está intimamente relacionado à transição do fungo da forma de levedura para hifa⁶¹. Neste estudo o ligeiro aumento na expressão do gene EFG1 no grupo NIS foi mais evidente que no grupo aPDT (Figura 18). A tendência no aumento de expressão pode elucidar maior poder de virulência de *C. albicans* quando relacionado à terapia NIS, pois tem maior capacidade de transição da fase de levedura para a filamentosa. Com este resultado, pode-se concluir que estes isolados clínicos não foram incapacitados de sofrer transição morfológica de levedura para hifa em ambos os tratamentos. Para estudar o efeito de lipases nos diferentes tratamentos, este estudo avaliou a expressão do gene LIP3, o qual está associado ao crescimento do biofilme sobre superfícies mucosas⁶⁰. Os dados demonstraram diminuição na expressão desse gene em ambos os tratamentos da coleta inicial até o final do tratamento. Em contraste, 60 dias após o início de ambos os tratamentos, houve aumento da expressão, podendo elucidar a reorganização do biofilme e o retorno da sua formação nas superfícies analisadas. Para o grupo NIS, a expressão do gene LIP3 foi visualmente igual aos 60 dias após o início dos tratamentos quando comparado com a coleta inicial. Enquanto que no grupo aPDT, a maior expressão do gene foi na coleta inicial (Figura 20).

O gene SAP1, relacionado à expressão de proteinase nas fases iniciais da adesão do biofilme e na colonização e contribuição para a lesão tecidual, pois produz uma enzima que possui ação de degradar proteínas das células do hospedeiro⁵⁹, teve sua expressão elevada após a coleta inicial em ambos os tratamentos. Mesmo estatisticamente não significante, a expressão desse gene foi numericamente maior nas coletas posteriores ao início dos dois tratamentos (Figura 22). Freire et al.²⁹ avaliaram a expressão dos genes SAP5, LIP9 e PLB1 em isolados clínicos após aPDT utilizando o fotossensibilizador azul de metileno associado a luz vermelha 660 nm. Neste estudo, os autores concluíram que a expressão desses genes relacionados a enzimas hidrolíticas (proteinase, lipase e fosfolipase), apresentou uma discreta redução após o tratamento com a terapia fotodinâmica. No entanto, essa redução também não foi estatisticamente significante. Para justificar os resultados, os autores ressaltaram que estudos na literatura demonstraram maior virulência em isolados clínicos de *C. albicans*

quando comparada às cepas padrão do mesmo fungo. Tal explicação pode também elucidar o porquê da não diferença estatística para a expressão de alguns genes deste estudo, uma vez que isolados clínicos podem apresentar maior virulência que cepas laboratoriais padrão. Uma ressalva para o estudo conduzido por Freire et al.²⁹ é que o grupo utilizou *primers* da literatura para os genes SAP5, LIP9 e PLB1 delineados por Nailis et al.⁶⁰. Como já relatado anteriormente, através da análise *in vitro* deste estudo, foi mostrada a presença de produtos inespecíficos para o par de *primers* para o gene PLB1 (Nailis et al.⁶⁰), inclusive no controle com água de grau molecular, podendo resultar em inespecificidade da expressão gênica deste gene na técnica de RT-qPCR no estudo conduzido por Freire et al.²⁹.

Dovigo et al.²³ realizaram um estudo para avaliar o efeito da aPDT, associada ao fotossensibilizador Photodithazine®, na inativação de *Candida* spp. de 15 isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Os autores observaram que a aPDT promoveu redução significativa na viabilidade de suspensões celulares de *C. tropicalis* e *C. glabrata*, enquanto que cinco cepas de *C. albicans* foram completamente inativadas após a aPDT, dados com os quais os autores concluíram que a aPDT mediada pelo PDZ causou redução significativa na viabilidade dos isolados das espécies de *Candida*. Diferentemente da metodologia aplicada no estudo de Dovigo et al.²³, os isolados clínicos recuperados para o atual estudo foram submetidos à extração do RNA após seu crescimento em placas *CHROMagar Candida*, ou seja, não foram tratados após estímulo de crescimento em meio nutritivo. Tal fato pode justificar a dificuldade de se encontrar diferença estatística na expressão gênica dos fatores de virulência do grupo aPDT quando comparado com o NIS, pois o crescimento dos mesmos em estufa sob meio rico em nutrientes pode permitir uma reorganização celular do fungo, podendo ter suas características de virulência reestabelecidas. Os nutrientes do meio também podem ter dado condições para que os isolados de *C. albicans* recuperasse suas características genéticas, que poderim ter sido alteradas após tratamento com aPDT. Tal dado foi observado por Carmello et al.¹³, que em um estudo *in vitro*, observaram que a aPDT, utilizando curcumina (2,5 µM) associada ao LED azul com (37,5 J/cm²), induziu o dano do DNA (teste Cometa) o qual foi causado pelo estresse oxidativo da terapia.

Assim, os isolados foram diretamente submetidos à análise da expressão gênica dos fatores de virulência com o objetivo de aproximar o resultado do RT-qPCR com a amostra recuperada do paciente sem qualquer intervenção *in vitro*. Levantando uma hipótese, um ponto positivo dos resultados da expressão gênica é que a terapia não causou danos às características genéticas do microrganismo, não propiciando resistência antifúngica ou até

mesmo efeitos mutagênicos. No entanto, tais dados ainda precisam ser melhor esclarecidos e testados. Diante desses achados, a aPDT pode ser considerada promissora para a desorganização do biofilme, no entanto, vale ressaltar que levando em consideração a dificuldade em trabalhar com amostras clínicas obtidas de pacientes, mais estudos devem ser realizados para suplementar os resultados obtidos.

Portanto, os resultados dessa pesquisa mostraram que oito *primers* recentemente delineados (ACT1, HWP1, ALS1, LIP3, CAT1, CAP1, EFG1 e PLB1) e três *primers* da literatura (HWP1 por Alves et al.², SAP1 por Naglik et al.⁵⁹, e SOD1 por Zhu et al.⁸⁶) foram padronizados e podem ser usados com segurança em estudos clínicos. A padronização de *primers* específicos de *C. albicans* afeta positivamente a eficiência da amplificação para análises de expressão gênica em estudos com amostras clínicas. As análises de expressão gênica foram realizadas a partir desses *primers* e os resultados do presente estudo sugerem que a aPDT mediada pelo PDZ, vista como promissor em tratamentos da candidose^{11,12,23,68}, não alterou a expressão gênica dos genes ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 e SAP1 nas diferentes coletas longitudinais de pacientes submetidos às terapias aPDT e NIS. Para o gene CAT1, a expressão foi maior na coleta final (pós-tratamento) em relação a inicial independente dos tratamentos utilizados. Para o gene LIP3 houve menor expressão na coleta final (após tratamento) quando comparada com a coleta inicial tanto no grupo aPDT quanto NIS. A expressão do gene SOD1 também foi estatisticamente diferentes entre as coletas independente do tratamento, no entanto. A expressão do gene PLB1 foi diferente entre os tratamentos, foi observado expressão superior no grupo aPDT comparado a NIS, independente das coletas. A recuperação das características do fungo *C. albicans* durante o crescimento em estufa na placa contendo meio *CHROMagar Candida* pode ter influenciado o resultado da expressão gênica. Dessa forma, futuras pesquisas devem considerar a padronização da metodologia para análise direta da expressão gênica em amostras clínicas bem como considerar o aumento do número de pacientes para avaliar a expressão dos genes de virulência de forma mais segura com resultados mais representativos para a população humana, definindo com maior clareza se a aPDT medida pelo PDZ afeta positivamente ou negativamente a expressão desses fatores de virulência.

7 CONCLUSÃO

Perante os resultados apresentados podemos concluir que:

- ✓ Os *primers* da literatura para os genes SAP1 e HWP1 foram específicos para *C. albicans* através dos testes de PCR;
- ✓ Os *primers* desenhados (via *Beacon Designer*TM) para os genes ACT1, ALS1 e HWP1 foram detectados apenas em espécies *C. albicans* confirmando sua especificidade;
- ✓ Os *primers* desenhados para os genes CAP1, CAT1, EFG1, LIP3, PLB1 e o *primer* da literatura para o gene SOD1 mostraram detecção em *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- ✓ Adicionalmente, conclui-se que três *primers* da literatura e oito *primers* desenhados estão padronizados e são específicos para *C. albicans/C. dubliniensis*, podendo ser usados com confiança em estudos clínicos para análise da expressão gênica;
- ✓ O gene LIP3 apresentou redução significativa de sua expressão da coleta inicial para a final (após o tratamento) independente do tratamento;
- ✓ O gene SOD1 apresentou diferença estatística entre as coletas independente do tratamento utilizado;
- ✓ A expressão do gene CAT1, foi superior na coleta final (após o tratamento) em relação à coleta inicial tanto no grupo tratado com aPDT quanto NIS;
- ✓ A expressão do gene PLB1 foi estatisticamente maior no grupo aPDT quando comparado com o grupo NIS, independente das coletas;
- ✓ Para os genes ALS1, CAP1, EFG1, HWP1 e SAP1 não houve diferença estatística entre as coletas independente dos tratamentos aPDT e NIS, os quais também não influenciaram a expressão de tais genes.

REFERÊNCIAS*

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002; 78(922): 455-9.
2. Alves CT, Xiao-Qing Wei, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. *J Infect*. 2014; 69(4): 396-407.
3. Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trends Microbiol*. 2017; 25(1):62-75.
4. Banfi S, Caruso E, Caprioli L, Mazzagatti L, Canti G, Ravizza R, et al. Photodynamic effects of porphyrin and chlorine photosensitizers in human colon adenocarcinoma cells. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12(18): 4853-60.
5. Banting DW, Greenhorn PA, McMinn JG. Effectiveness of a topical antifungal regimen for the treatment of oral candidiasis in older, chronically ill, institutionalized, adults. *J Can Dent Assoc*. 1995; 61(3): 199-200.
6. Banting DW, Hill SA. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. *Spec Care Dentist*. 2001; 21(1): 4-8.
7. Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG. Susceptibility of *Candida* species to photodynamic effects of Photofrin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(6): 2000–6.
8. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*. 2001; 57(17): 9513-47.
9. Budtz-Jorgensen E, Holmstrup P, Krogh P. Fluconazole in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1988; 32(12): 1859-63.
10. Bustin SA, editor. A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line; c2004.
11. Carmello JC, Alves F, Basso FG, de Souza Costa CA, Bagnato VS, Mima EG, et al. Treatment of oral candidiasis using Photodithazine mediated photodynamic therapy in vivo. *PLoS ONE*. 2016; 11(6): e0156947.
12. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci*. 2015; 14(7): 1319-28.
13. Carmello JC, Pavarina AC, Oliveira R, Johansson B. Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. 2015; 15(4): fov018.
14. Cha RS, Thilly WG. Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR Methods Appl*. 1993; 3(3): S18-29.
15. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*. 2001; 183(18): 5385-94.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-marco-2015.pdf>

16. Chen HF, Lan CY. Role of SFP1 in the Regulation of *Candida albicans* biofilm Formation. PLoS ONE. 2015; 10(6): e0129903.
17. Copley L, Vander Watt P, Wirtz KW, Parker MI, Leaner VD. Photolon, a chlorin e6 derivative, triggers ROS production and light-dependent cell death via necrosis. Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40(2): 227–35.
18. Correa JC. Fotodegradação do Photodithazine® e citotoxicidade dos fotoprodutos formados após irradiação com laser [dissertação de mestrado]. São Carlos: Instituto de Química da USP; 2006.
19. Cury, JA, Seils, J, Koo H. Isolation and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* in suspension cultures and biofilms. Braz Oral Res. 2008; 22(3):216-22.
20. Dai B, Wang Y, Zhao L, Li D, Li M, Cao Y, Jiang Y. Cap1p attenuates the apoptosis of *Candida albicans*. FEBS Journal. 2013; 280(11): 2633–43.
21. Dantas AS, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. Biomolecules. 2015; 5(1): 142-65.
22. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. Microbiol Res. 2008; 163(1): 1-12.
23. Dovigo LN, Carmello JC, Carvalho MT, Mima EG, Vergani CE, Bagnato VS, et al. Photodynamic inactivation of clinical isolates of *Candida* using Photodithazine®. Biofouling. 2013; 29(9): 1057-67.
24. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. Lasers Surg Med. 2011; 43(9): 927-34.
25. Dovigo LN, Pavarina AC, de Oliveira Mima EG, Giampaolo ET, Vergani CE, Bagnato VS. Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Mycoses. 2011; 54(2): 123-130.
26. Enjalbert B, Smith DA, Cornell MJ, Alam I, Nicholls S, Brown AJP, et al. Role of the Hog1 stress-activated protein kinase in the global transcriptional response to stress in the fungal pathogen *Candida albicans*. Mol Biol Cell. 2006; 17(2): 1018–32.
27. Ferreira C, Silva S, Faria-Oliveira F, Pinho E, Henriques M, Lucas C. *Candida albicans* virulence and drug-resistance requires the O-acyltransferase Gup1p. BMC Microbiol. 2010; 10: 238.
28. Finkel JS; Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nat Rev Microbiol. 2011; 9(2): 109-18.
29. Freire, F, de Barros PP, da Silva Ávila D, Brito GN, Junqueira JC, Jorge AO. Evaluation of gene expression SAP5, LIP9, and PLB2 of *Candida albicans* biofilms after photodynamic inactivation. Lasers Med Sci. 2015; 30(5):1511-8.
30. Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC, Gow NAR. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. Microbiology. 1998; 144(Pt 4): 829–38.
31. Gois MM, Kurachi C, Santana EJ, Mima EG, Spolidório DM, Pelino JE, et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* to porphyrin-mediated photodynamic antimicrobial chemotherapy: an in vitro study. Lasers Med Sci. 2010; 25(3): 391-95.

32. Goulart Rde C, Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G Jr, Souza SL, Tedesco AC, et al. Photodynamic therapy in planktonic and biofilm cultures of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28 Suppl 1:S53-60.
33. Green CB, Cheng G, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum MA, Hoyer LL. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. *Microbiology.* 2004; 150 (Pt 2): 267–75.
34. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001; 9(12): 591-6.
35. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, Petryshyn A, Glaser W, Schock U, et al. A Histone Deacetylase Adjusts Transcription Kinetics at Coding Sequences during *Candida albicans* Morphogenesis. *PLoS Genet.* 2012; 8(12): e1003118.
36. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schäfer W. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterization and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol.* 2000; 174(5): 362-74.
37. Hwang CS, Rhie G, Kim ST, Kim YR, Huh WK, Baek YU, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochim Biophys.* 1999; 1427(2): 245–55.
38. Hwang CS, Rhie G, Oh J, Huh W, Yim H, Kang S. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology.* 2002; 148(Pt 11): 3705–13
39. Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, Moran GP, Saunders D, Harris D, et al. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res.* 2009; 19(12): 2231–44.
40. Komalapriya C, Kaloriti D, Tillmann AT, Yin Z, Herrero-de-Dios C, Jacobsen MD, et al. Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS ONE.* 2015; 10(9): e0137750.
41. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
42. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006; 27(2-3): 95–125.
43. Kulak Y, Arıkan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent.* 1994; 72(3): 283-8.
44. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem.* 1998; 273(40): 26078–86.
45. Mantareva V, Kussovski V, Angelov I, Wohrle D, Dimitrov R, Popova E, et al. Non-aggregated Ga(III)-phthalocyanines in the photodynamic inactivation of planktonic and biofilm cultures of pathogenic microorganisms. *Photochem Photobiol Sci.* 2011; 10(1): 91–102.
46. Martchenko M, Alarco AM, Marcus D, Whiteway M. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: Transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Mol Biol Cell.* 2004; 15(2): 456–67.

47. Martin MV. Antifungal agents. In: Samaranayake LP, Macfarlane TW. Oral candidosis. London: Wright; 1990. p. 238-51.
48. Martins Jda S, Junqueira JC, Faria RL, Santiago NF, Rossoni RD, Colombo CE, et al. Antimicrobial photodynamic therapy in rat experimental candidiasis: evaluation of pathogenicity factors of *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011; 111(1): 71-7.
49. Mathaba LT, Davies G, Warmington JR. The genotypic relationship of *Candida albicans* strains isolated from the oral cavity of patients with denture stomatitis. Med Microbiol. 1995; 42(5): 372-9.
50. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013; 4(2): 119–28.
51. McCullough MJ, Ross BC, Reade PC. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. Int J Oral Maxillofac Surg. 1996; 25(2): 136-44.
52. McManus BA, Coleman DC, Moran G, Pinjon E, Diogo D, Bougnoux M, et al. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2008; 46(2): 652–64.
53. Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani C E, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(3): 392–401.
54. Mima EG, Pavarina AC, Ribeiro DG, Dovigo LN, Vergani CE, Bagnato VS. Effectiveness of photodynamic therapy for the inactivation of *Candida* spp. on dentures: in vitro study. Photomed Laser Surg. 2011; 29(12): 827-33.
55. Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, et al. Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. Clin Microbiol Infect. 2012; 18(10): E380-8.
56. Monroy-Pérez E, Sáinz-Espuñes T, Paniagua-Contreras G, Negrete-Abascal E, Rodríguez-Moctezuma JR, Vaca S. Frequency and expression of ALS and HWP1 genotypes in *Candida albicans* strains isolated from Mexican patients suffering from vaginal candidosis. Mycoses. 2012; 55(3): e151-7.
57. Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* more pathogenic?. Int J Microbiol. 2012; 2012:205921.
58. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67(3): 400-28.
59. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J. Infect Dis. 2003; 188(3): 469-79.
60. Nailis H, Kucharíková S, Řičicová M, Van Dijck P, Deforce D, Nelis H, et al. Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. BMC Microbiology. 2010; 10: 114.

61. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. 2012; 148(1-2): 126–38.
62. Nobile CJ, Schneider HA, Nett JE, Sheppard DC, Filler SG, Andes DR, et al. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. *Curr Biol*. 2008; 18(14): 1017–24.
63. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006; 1(3): 1559–82.
64. Parvinen T, Kokko J, Yli-Urpo A. Miconazole lacquer compared with gel in treatment of denture stomatitis. *Scand J Dent Res*. 1994; 102(6): 361-6.
65. Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2005; 93(3): 288-93.
66. Prażmo EJ, Kwaśny M, Łapiński M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv Clin Exp Med*. 2016; 25(4): 799–807.
67. Premier BioSoft. [homepage na internet]. PCR *Primer* Design Guidelines. [acesso em 10 de agosto de 2016]. Disponível em: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Desgin.html
68. Quishida CC, Carmello JC, Mima EG, Bagnato VS, Machado AL, Pavarina AC. Susceptibility of multispecies biofilm to photodynamic therapy using Photodithazine®. *Lasers Med Sci*. 2015; 30(2): 685-94.
69. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*. 2005; 4(4): 633-8.
70. Rüchel R. Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses*. 1999; 42 Suppl 1: 48-52.
71. Samaranayake LP. Host factors and oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW, editors. *Oral candidosis*. London: Butterworth; 1990. p. 66–103.
72. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi A, Fusco-Almeida AM, Mendes Gianini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013; 62(Pt 1): 10-24.
73. Scully C, El-Kabir M, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2): 125–57.
74. Seleem D, Chen E, Benso B, Pardi V, Murata RM. In vitro evaluation of antifungal activity of monolaurin against *Candida albicans* biofilms. *PeerJ*. 2016; 4:e2148.
75. Shirliff ME, Krom BP, Meijering RA, Peters BM, Zhu J, Scheper MA, et al. Farnesol induced apoptosis in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6): 2392–401.
76. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36(2): 288–305.
77. Staab JF, Ferrer CA, Sundstrom P. Developmental expression of a tandemly repeated, proline-and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1996; 271(11): 6298–305.

78. Strachkovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Microbiology*. 2002; 71(3): 345–8.
79. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011; 10(9): 1173-82.
80. Thornton B, Basu C. Real-Time PCR (qPCR) *Primer* design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ*. 2011; 39(2): 145–54.
81. Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *PhotochemPhotobiol Sci*. 2004; 3(5):406-11.
82. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2): 382-402.
83. Wysong DR, Christin L, Sugar AM, Robbins PW, Diamon RD. Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun*. 1998; 66(5): 1953–61.
84. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. *Primer-BLAST*: A tool to design target specific *primers* for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:134.
85. Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol*. 2001, 79(3): 213-21.
86. Zhu J, Krom BP, Sanglard D, Intapa C, Dawson CC, Peters BM, et al. Farnesol-induced apoptosis in *Candida albicans* is mediated by Cdr1-p extrusion and depletion of intracellular glutathione. *PLoS ONE*. 2011; 6(12): e28830.

APÊNDICE A

Para avaliar a expressão dos genes de interesse, foi realizado o teste estatístico “Análise de Variância para Medidas Repetidas Mista” ($\alpha= 0,05$) com pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$). O teste foi realizado em cada um dos genes individualmente a partir dos valores obtidos do qPCR (*SQ Mean*). O fator “*Coletas*” foi considerado como a origem das medidas repetidas e o fator “*Tratamento*” como independente.

Tabela A1 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene ACT1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	Π_p^2	Π
Coletas	49569089,181	1,174	42219185,937	3,365	0,080	0,194	0,438
Coletas x Tratamento	12344271,181	1,174	10513912,780	0,838	0,392	0,056	0,145
Resíduo	206211446,444	16,437	12545375,042				

Teste realizado utilizando o índice de Épsilon de Greenhouse-Geisser ($\epsilon_{GG} = 0,587$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A2 - Pós teste de Bonferroni para comparação entre grupos para o gene ACT1

Tratamentos	Média	Erro Padrão	<i>p</i>
aPDT	4061,810	807,117	0,046*
NIS	1709,667	711,810	0,046*

* Nota-se diferença estatística entre os tratamentos.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A3 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene ALS1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	Π_p^2	Π
Coletas	38698315,817	1,111	34833361,041	1,131	0,311	0,075	0,175
Coletas x Tratamento	67429045,817	1,111	60694638,721	1,970	0,180	0,123	0,272
Resíduo	479149526,349	15,553	30806782,620				

Teste realizado utilizando o índice de Épsilon de Greenhouse-Geisser ($\epsilon_{GG} = 0,555$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A4 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene CAP1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η_p^2	π
Coletas	13870355,622	2	6935177,811	0,753	0,480	0,051	0,165
Coletas x Tratamento	44002455,622	2	22001227,811	2,389	0,110	0,146	0,442
Resíduo	257836965,545	28	9208463,055				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A5 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene CAT1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η_p^2	π
Coletas	21328611453,6 38	1,386	15393673091, 488	5,691	0,019	0,289	0,707
Coletas x Tratamento	10566270953,6 38	1,386	7626081107,5 28	2,820	0,099	0,168	0,414
Resíduo	52464680567,1 96	19,398	2704697340,6 60				

Teste realizado utilizando o índice de Épsilon de Greenhouse-Geisser ($\epsilon_{GG} = 0,693$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A6 - Pós teste de Bonferroni para comparação entre grupos para o gene CAT1

Coletas	Média	Erro Padrão	<i>p</i>		
			1 ^a	2 ^a	5 ^a
1 ^a	65290,476	9671,636		0,041*	0,840
2 ^a	9671,636	17576,908	0,041*		0,072
5 ^a	51595,794	8428,473	0,840	0,072	

*Nota-se diferença estatística entre a 1^a e 2^a coleta.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A7 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene EFG1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	Π_p^2	π
Coletas	1078771396,03 2	2	539385698,01 6	1,462	0,249	0,095	0,286
Coletas x Tratamento	659466146,032	2	329733073,01 6	0,894	0,420	0,060	0,188
Resíduo	10329594920,6 35	28	368914104,30 8				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A8 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene HWP1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	Π_p^2	π
Coletas	80502237,902	1,004	80213942,423	1,247	0,283	0,082	0,181
Coletas x Tratamento	59714380,507	1,004	59500530,726	0,925	0,353	0,062	0,146
Resíduo	903731605,782	14,050	64321082,317				

Teste realizado utilizando o índice de Épsilon de Greenhouse-Geisser ($\epsilon_{GG} = 0,502$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A9 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene LIP3 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	Π_p^2	π
Coletas	166200,848	2	83100,424	4,454	0,021	0,241	0,717
Coletas x Tratamento	32047,394	2	16023,697	0,859	0,434	0,058	0,183
Resíduo	522364,255	28	18655,866				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A10 - Pós teste de Bonferroni para comparação entre grupos para o gene LIP3

Coletas	Média	Erro Padrão	<i>p</i>		
			1 ^a	2 ^a	5 ^a
1 ^a	363,517	58,173		0,039*	0,361
2 ^a	219,075	27,923	0,039*		0,581
5 ^a	277,841	45,497	0,361	0,581	

*Nota-se diferença estatística entre a 1^a e 2^a coleta.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A11 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene PLB1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η_p^2	π
Coletas	24363,959	2	12181,980	3,280	0,053	0,190	0,575
Coletas x Tratamento	8601,245	2	4300,622	1,158	0,329	0,076	0,233
Resíduo	104001,952	28	3714,355				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A12 - Pós teste de Bonferroni para comparação entre grupos para o gene PLB1

Tratamentos	Média	Erro Padrão	<i>p</i>
aPDT	114,042	11,623	< 0,01*
NIS	42,404	10,251	< 0,01*

*Nota-se diferença estatística entre os tratamentos

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A13 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene SAP1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η_p^2	π
Coletas	2790548,401	1,236	2257033,742	3,080	0,090	0,180	0,418
Coletas x Tratamento	638818,818	1,236	516685,404	0,705	0,442	0,048	0,132
Resíduo	12685538,307	17,309	732874,072				

Teste realizado utilizando o índice de Épsilon de Greenhouse-Geisser ($\epsilon_{GG} = 0,618$).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A14 - Sumário da análise de Variância para Medidas Repetidas Mista do gene SOD1 ($\alpha= 0,05$)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	<i>p</i>	η_p^2	π
Coletas	305592246791,270	2	152796123395,635	4,434	0,021	0,241	0,715
Coletas x Tratamento	39732599791,270	2	19866299895,635	0,576	0,568	0,040	0,136
Resíduo	964957304292,064	28	34462760867,574				

Fonte: Elaboração própria.

Tabela A15. Pós teste de Bonferroni para comparação entre grupos para o gene SOD1

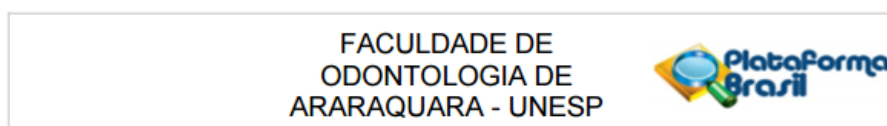
Coletas	Média	Erro Padrão	<i>p</i>		
			1 ^a	2 ^a	5 ^a
1 ^a	359884,762	78051,311		0,152	0,080
2 ^a	190334,127	25177,914	0,152		1,000
5 ^a	188256,349	26140,215	0,080	1,000	

Embora a Análise de variância tenha apontado diferença estatística entre as coletas, o pós teste de Bonferroni não conseguiu identificar devido a sua robustez.

Fonte: Elaboração própria.

ANEXO A

Certificado do “Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos” (CEP) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, o qual aprovou a pesquisa em pacientes, na qual as amostras clínicas deste estudo foram recuperadas.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação clínica da eficácia da Terapia Fotodinâmica, mediada pelo Photodithazine, no tratamento de estomatite protética.

Pesquisador: Ana Cláudia Pavarina

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 23558614.8.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

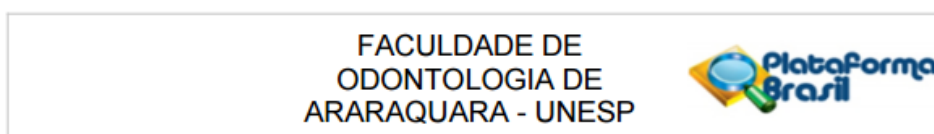
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 867.208

Data da Relatoria: 10/11/2014

Apresentação do Projeto:

Avaliar se a Terapia Fotodinâmica, mediada pelo Photodithazine, é eficaz no tratamento da estomatite protética.



Continuação do Parecer: 867.208

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram respondidas, o medicamento não tem registro na Anvisa, porém a pesquisadora apresentou diversos trabalhos referentes ao uso e sua segurança. O TCLE referente ao grupo que usará Nistatina foi reescrito. O critério de exclusão e cronograma foram adequados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 11 de novembro de 2014.

Não autorizo a publicação deste trabalho até 07 de julho de 2019.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 07 de julho de 2017.

GABRIELA CAROLINE ALONSO