

Tatiana Teixeira de Miranda

Avaliação de parâmetros de virulência em leveduras do gênero *Candida* obtidas do dorso lingual e canais radiculares necróticos portadores de periodontite apical primária

Belo Horizonte

2011

Tatiana Teixeira de Miranda

Avaliação de parâmetros de virulência em leveduras do gênero *Candida* obtidas do dorso lingual e canais radiculares necróticos portadores de periodontite apical primária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas – Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Ary Corrêa Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte

2011

“Tu quieres existir, viver e entender, mas existes para viver e vives para entender. Portanto, sabes que existes, sabes que vives, sabes que entendes.” (Santo Agostinho)

Aos meus pais, Liêda e Osny, pelos ensinamentos e pelo apoio que me faz seguir em frente

Ao Marcello, por ser tão especial

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela inteligência, pelas oportunidades e, sobretudo pelo revigoramento que me faz persistir na caminhada mesmo frente às dificuldades.

Ao meu orientador Professor Ary Corrêa Jr. pela disponibilidade da escuta, da oferta de estímulos e principalmente pela coragem de percorrer novos caminhos na pesquisa, assumindo os riscos inerentes a tal atitude. Pela compreensão silenciosa dos meus limites, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Por sua amizade e pela alegria de trabalharmos juntos, especialmente.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa pela solicitude e gentileza, muito além de qualquer obrigação profissional, com que sempre me acolheu.

À minha irmã Ludmila pela presença amiga.

Aos meus padrinhos Oney e Dalva pelo acolhimento carinhoso.

À minha família, especialmente aos primos Rodrigo, Ellen, Rachel, Anderson, Yasmin, Rogério, Amanda, Roberta, Vânia e Yan pela convivência, pelas risadas que são para mim um bálsamo de descanso.

Ao meu afilhado Gabriel, por ser tão amoroso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais pela grande oportunidade de aprendizado.

À FAPEMIG, pela bolsa concedida.

Ao Professor Cláudio Antônio Bonjardim, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

À Professora Deborah Aparecida Negrão Corrêa pela amizade e por permitir a utilização de recursos do seu laboratório.

À Professora Vera Lúcia Santos pelo constante apoio e pelo carinho sincero.

Ao Professor Luiz Simeão do Carmo pelas conversas amigas e pelo incentivo.

Aos amigos da odontologia, Alexander, Carlos, Luciano, Flávia e Reinaldo pelo interesse neste trabalho e pelo estímulo.

Ao Centro de Microscopia da UFMG, especialmente ao Roberto Lois e Breno pelo auxílio na execução das imagens no microscópio eletrônico de varredura.

À amiga Ângela pelos ensinamentos e consolo em momentos mais difíceis.

Aos colegas dos Laboratórios de Mecanismos Gerais de Infecções Fúngicas e de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras Wladimir, Mariana, Maristela, Adriano, Fagner, Sami, César, Carolina pela agradável convivência e pela enorme ajuda que sempre me ofereceram.

Aos estagiários André e Larissa pelo importante auxílio na execução dos experimentos.

Às “meninas” do meio de cultura pelo “socorro” sempre rápido.

Aos funcionários da Pós-graduação, Douglas, Maria de Fátima, Gina, Iracema e Andréa, por sempre acolherem minhas solicitações com carinho, cordialidade e competência.

Aos amigos Leonardo Rodrigues, Cristina Roscoe, Andréa Monteiro e Cintia Pereira, pesquisadores exemplares, pelas valiosas contribuições a este trabalho e especialmente à minha formação, com o desejo sincero que a amizade aqui conquistada perdure, independente de onde estivermos.

RESUMO

Leveduras do gênero *Candida* podem colonizar canais radiculares portadores de periodontite apical primária. A capacidade de aderir às estruturas dentárias, tigmotropismo, secreção de proteinases, formação de biofilme e o pleomorfismo conferem a esses microrganismos habilidades para se estabelecerem no espaço pulpar, podendo penetrá-lo, sobretudo, através de túbulos dentinários. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar parâmetros relacionados à virulência de amostras leveduriformes obtidas do dorso lingual e canais radiculares necróticos portadores de periodontite apical primária. O método de detecção de proteinase em placa foi utilizado para indicar atividade enzimática. Independente do sítio primário de isolamento, todas as leveduras da espécie *C. albicans* avaliadas foram capazes de degradar a albumina contida no meio de cultura, indicando atividade proteásica positiva. No entanto, entre as amostras obtidas dos canais radiculares, foram revelados os maiores halos de precipitação ao redor das colônias. A expressão de genes codificadores das proteinases Sap-1, Sap-2 e Sap-4 foi identificada pelo método de RT-PCR. O gene codificador de Sap-2 foi preferencialmente expresso por leveduras do dorso lingual enquanto para aquelas dos canais radiculares, destacou-se a expressão do gene codificador de Sap-4. Os resultados obtidos sugerem que a expressão concomitante de Sap-2 e Sap-4 seja necessária à permanência das leveduras no ambiente endodôntico. A microscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a adesão microbiana ao acrílico e à dentina. As maiores médias de adesão foram verificadas no substrato dentina, todavia, a capacidade de adesão à dentina e ao acrílico não apresentou correlação com a hidrofobicidade dos microrganismos. A formação de biofilme foi mensurada em função da intensidade de reação com o XTT. Fatores como pH, disponibilidade de carboidratos, saliva e presença

de outros grupos microbianos parecem influenciar a formação de biofilme na dentina uma vez que neste substrato foram verificadas as menores intensidades de reação. Foi observado que a direção de colonização dos túbulos dentinários por leveduras da espécie *C. albicans* não é influenciada pela topografia do substrato. Entretanto, o pleomorfismo revelou-se importante uma vez que leveduras da espécie *C. glabrata* não foram capazes de colonizar camadas internas da dentina.

Palavras-chave: *Candida*, periodontite apical, virulência, dorso lingual, canal radicular

ABSTRACT

Yeasts from the genus *Candida* can be commensal members of the oral microbiota, and can also colonize the endodontic environment. These microorganisms can penetrate the pulp space through dentinal tubules. The ability to adhere to dentinal structures, thigmotropic responses, secretion of proteases, formation of biofilm and pleomorphism is related to this penetration capacity. This study aimed to evaluate this virulence parameters of yeast samples from the tongue dorsum and necrotic root canals. The method for detecting protease in plate was used to indicate enzyme activity. Regardless of the primary isolation site, *C. albicans* samples were able to degrade the albumin contained in the culture medium, indicating positive protease activity. However, among root canals samples, it was revealed the largest precipitation zones around the colonies. The expression of genes coding for Sap-1, Sap-2 and Sap-4 was identified by RT-PCR. The gene encoding Sap-2 was preferentially expressed by yeasts of the tongue dorsum while for those of the root canals, highlighted the expression of the gene encoding Sap-4. The results suggest that the concomitant expression of Sap-2 and Sap-4 is necessary for yeast pulpal colonization. Fluorescence microscopy was used to evaluate the microbial adhesion to acrylic and dentin. The highest adhesion means were observed in the dentin substrate however neither dentin adhesion nor acrylic adhesion showed correlation with the microbial hidrophobicity. Biofilm formation was measured according to the intensity of XTT reaction. Factors such as pH, carbohydrate availability, presence of saliva and other microbial groups present some influence on biofilm formation. Using an in vitro dentin infection model, it was observed that the direction of hyphal tip did not change in according with tubular nature of the dentin. In this view, only the pleomorfirm has a determinant role for the fungal colonization of human dentin.

Key-words: periapical disease, virulence, *Candida*, root canal