

UNICESUMAR - CENTRO UNIVERSITÁRIO DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Candida spp.* EM AMOSTRAS DE PACIENTES
USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTÁRIAS POR MEIO DE PCR -MULTIPLEX.**

ALICIA AYUMI KIMURA

MARINGÁ – PR
2017

ALICIA AYUMI KIMURA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Candida spp.* EM AMOSTRAS DE PACIENTES
USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTÁRIAS POR MEIO DE PCR -MULTIPLEX.**

Artigo apresentado ao curso de graduação em Biomedicina da UniCesumar – Centro Universitário de Maringá como requisito parcial para a obtenção do título de bacharela em Biomedicina, sob a orientação da Prof. Dr. Marcela Funaki dos Reis.

MARINGÁ – PR

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALICIA AYUMI KIMURA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Candida spp.* EM AMOSTRAS DE PACIENTES
USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTÁRIAS POR MEIO DE PCR -MULTIPLEX.**

Artigo apresentado ao curso de graduação em Biomedicina da UniCesumar – Centro
Universitário de Maringá como requisito parcial para a obtenção do título de bacharela em
Biomedicina, sob a orientação da Prof. Dr. Marcela Funaki dos Reis.

Aprovado em: ____ de _____ de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Nome do professor – (Titulação, nome e Instituição)

Nome do professor - (Titulação, nome e Instituição)

Nome do professor - (Titulação, nome e Instituição)

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Candida spp.* EM AMOSTRAS DE PACIENTES USUÁRIOS DE PRÓTESES DENTÁRIAS POR MEIO DE PCR -MULTIPLEX.

Alicia Ayumi Kimura¹

Marcela Funaki dos Reis²

¹Acadêmica do Curso de Biomedicina, Centro Universitário Cesumar – UNICESUMAR.
alicia.kimura@gmail.com

²Orientadora, Doutora, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNICESUMAR.
marcela.reis@unicesumar.edu.br

RESUMO

A candidíase bucal é uma infecção oportunista comum a pacientes usuários de prótese dental. E para o tratamento correto é necessário o diagnóstico preciso da levedura causadora da infecção uma vez que diferentes espécies de *Candida* podem estar relacionadas. Assim, o objetivo deste estudo foi identificar simultaneamente diferentes espécies de *Candida* em amostras de pacientes usuários de prótese dental por meio de PCR – multiplex. Para tanto as amostras coletadas de pacientes usuários de prótese dental foram inoculadas em meio Saubourand e, posteriormente o DNA genômico das colônias foi extraído pelo método de extração orgânica com fenol-clorofórmio. As amostras de DNA das leveduras foram amplificadas via dois *rounds* de PCR. No primeiro foi utilizado os *primers* ITS1 e ITS4 e no segundo caracterizado como Multiplex com *touchdown* para amplificação dos marcadores moleculares espécie-específicos. O método utilizado no estudo foi capaz de identificar de maneira distintiva as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* que colonizavam ao mesmo tempo a cavidade bucal do paciente analisado. Embora, a PCR multiplex testada tenha sido capaz de identificação, a sensibilidade foi considerada inferior ao esperado. Assim, é sugerido que estudos posteriores possam ser realizados a fim de aumentar a eficiência do teste, promovendo a padronização da reação de PCR com incremento de substâncias que elevam a sensibilidade e ampliação no número de ciclos no termociclador.

Palavras-chave: Candidíase; Mucosa Bucal; Reação em Cadeia da Polimerase.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Candida spp.* IN SAMPLES OF PATIENTS USERS OF DENTAL PROSTHESES BY MULTIPLEX – PCR.

ABSTRACT

Oral candidiasis is an opportunistic infection common to patients using dental prostheses. For the correct treatment is necessary the precise diagnosis of the yeast causing the infection since different species of *Candida* may be related. Thus, the objective of this study was to simultaneously identify different *Candida* species in samples of dental prosthesis patients by PCR - multiplex. The samples collected from dental prosthesis patients were inoculated in Saubourand medium and later the genomic DNA from the colonies was extracted by the organic extraction method with phenol-chloroform. The yeast DNA samples were amplified via two *rounds* of PCR. In the first one was used the primers ITS1 and ITS4 and in the second

characterized as Multiplex with *touchdown* for amplification of molecular markers species-specific. The method used in the study was able to identify in a distinctive way the species *C. albicans* and *C. tropicalis* that colonized the oral cavity of the analyzed patient. Although, the multiplex PCR tested was able to identify the sensitivity was considered lower than expected. Thus, it is suggested that further studies can be performed in order to increase the efficiency of the test by promoting the standardization of the PCR reaction with increasing substances that raise the sensitivity and increase in the number of cycles in the thermal cycler.

Keywords: Candidiasis; Oral Mucosa; Polymerase Chain Reaction.

1 INTRODUÇÃO

A perda dentária constitui um dos principais acometimentos à saúde bucal no Brasil devido à sua significativa prevalência e aos danos causados ao indivíduo, danos estes tanto de caráter estético e funcional quanto de agravamento psicológico e social. Embora as políticas públicas de saúde bucal tenham avançado o edentalismo parcial ou total ainda tem acometido um número elevado de indivíduos e, conseqüentemente, tem-se aumentado o uso de artefatos protéticos, como a prótese dental (PARAGUASSÚ et al., 2011; PERES et al., 2013; SILVA; MAGALHÃES; FERREIRA, 2010).

O uso de prótese dental associada a fatores como o material utilizado para sua confecção, má higienização e adaptação, podem levar a mudanças da biodiversidade de microrganismos residentes do meio bucal e conseqüentemente, favorecer a colonização e infecção por espécies oportunistas como *Candida* spp. (FALCÃO; SANTOS; SAMPAIO, 2004; GASPARETTO et al., 2005; SENA et al., 2009).

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, interagindo como colonizadores comensais, entretanto, em situações de alteração na homeostasia da microbiota normal, comprometimento do sistema imunológico ou em uso de medicamentos como de antimicrobianos podem tornar-se patogênicas, causando a candidíase bucal (PEIXOTO et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

A candidíase bucal é uma infecção que se destaca como uma das causas de lesões relacionadas ao uso de prótese dental e apresenta manifestações clínicas de lesões agudas, crônicas e ainda superficiais (COSTA, 2016; PARAGUASSÚ et al., 2011; SENA et al., 2009) com predisposição a complicações de recuperação lenta e internação prolongada (SIQUEIRA, 2014).

Candida albicans é considerada a causa primária de candidíase e a principal responsável pelas manifestações clínicas, no entanto a candidíase bucal pode estar associada à infecção simultânea de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* e *C. dubliniensis* (IMABAYASHI et al., 2016; MANZANO, 2016).

O diagnóstico clínico de candidíase é realizado com base na sintomatologia apresentada pelo paciente, contudo apresenta um diagnóstico inconclusivo, já que os sinais e sintomas não são específicos de cada espécie de *Candida*. Para tanto, faz-se necessário o diagnóstico laboratorial realizado por meio da raspagem das lesões e posterior identificação presuntiva e confirmatória (COSTA, 2016; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

A identificação das leveduras do gênero *Candida* se dá por métodos tradicionais morfológicos e bioquímicos, além da utilização de métodos de cultivo cromogênico (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MANZANO, 2016). No entanto, associado a um tratamento prolongado com alteração da biodiversidade fúngica pelo uso de antifúngicos, efeitos colaterais, além do desconforto que os agentes tópicos podem causar aos pacientes, a identificação das espécies de *Candida* torna-se essencial para uma terapia antifúngica apropriada (IMABAYASHI et al., 2016; MANZANO, 2016; SENA et al., 2009). E dentro deste contexto denota-se uma problemática para o diagnóstico diferencial das espécies desta levedura (MÍMICA et al., 2009; TARINI et al., 2010). Neste sentido, o desenvolvimento de métodos moleculares baseados em análise de DNA têm se mostrados úteis para a identificação das espécies de *Candida*, pois são métodos mais rápidos, sensíveis e específicos, quando comparados aos métodos convencionais (MANZANO, 2016; ZHANG et al., 2016).

Dentre os atuais métodos diagnósticos de candidíase o mais utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou modificações desta técnica, na qual possibilita a amplificação de regiões-alvo no DNA da levedura em curto tempo para emissão do resultado, além de demonstrar elevada sensibilidade e especificidade (TAIRA, 2013; ZHANG et al., 2016).

Para a identificação das espécies de *Candida*, tem-se buscado a padronização e aplicação da técnica de PCR Multiplex. Este tipo de reação tem a capacidade de identificar, simultaneamente, em uma única reação, diferentes espécies de microrganismos em um mesmo paciente ou diferentes alvos num mesmo microrganismo (CARVALHO et al., 2007), e neste caso pode ser considerado o método ideal para a identificação simultânea de diferentes espécies de *Candida*, responsáveis por candidíase bucal em pacientes usuários de prótese dental.

Assim, o objetivo deste estudo foi identificar, simultaneamente, diferentes espécies de *Candida* em amostras de pacientes usuários de prótese dental por meio de PCR – multiplex.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta das Amostras

As amostras foram providas de pacientes usuários de prótese dental que frequentavam a Clínica Odontológica da Unicesumar – Centro Universitário Cesumar, Maringá – Paraná.

Crêterios de Inclusão no estudo e aspectos  ticos

A pesquisa seguiu os aspectos  ticos conforme a resolu o 466 (BRASIL, 2012) e o projeto foi aprovado pelo Comit  em  tica do Centro Universitário Cesumar, bem como a Comissão de  tica em Pesquisa – CONEP, via Plataforma Brasil.

Como critério de inclusão neste estudo foi optado por indivíduos maiores de 18 anos de idade, de ambos os sexos e que usam próteses dentárias. Os pacientes foram convidados a participar da pesquisa, em seguida foi realizado o esclarecimento indicando a finalidade do estudo e depois do aceite foi entregue a cada um o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Coleta das Amostras

A amostragem foi realizada por conveniência com o número de indivíduos amostrados, determinados de acordo com o número de pacientes que frequentaram a clínica odontológica em setembro de 2017 e concordaram em participar do estudo.

Para a coleta do material biológico foi realizada raspagem da mucosa bucal utilizando Swab estéril e descartável. Em seguida o material coletado foi acondicionado em tubos plásticos contendo soluço salina estéril. Logo após a coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Centro Universitário Cesumar - Unicesumar para ser realizado o isolamento em meio de cultivo.

Isolamento das Amostras

As amostras foram isoladas assepticamente em placas de Petri com  gar Saubourand, preparado de acordo com as instru es do fabricante. As placas inoculadas permaneceram incubadas em estufa microbiológica Nova  tica Série 410ND   37 C   1 C durante 24   48 horas para o crescimento das col nias.

Extra o de DNA

O DNA para amplifica o foi extraído a partir das culturas das espécies de *Candida* segundo o método proposto por Crestani (2007), com modifica es. Col nias de *Candida* sp. foram coletadas e transferidas para a um microtubo contendo 500  L de tampão de lise

celular (NaCl 0,15M; Tris – HCl 50M; EDTA 10mM; SDS – 2%; pH 8). Em seguida foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1) e misturado em Vórtex Phoenix AP56 por 15 minutos. O lisado foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm e logo retirado a suspensão aquosa e adicionado a um novo microtubo. Nesta suspensão foi adicionado 300 µL de fenol/clorofórmio (1:1), misturado em vórtex por 5 minutos e centrifugados por 10 minutos a 13000 rpm. Ao sobrenadante foi adicionado 800 µL de etanol absoluto gelado para ocorrer a precipitação do DNA. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm, e o sedimento lavado com etanol 70%. O DNA foi ressuscitado em 80 µL de TE (Tris-EDTA, pH 8,0). A suspensão foi tratada com 2 µL RNase na concentração de 50 µg/mL por 30 minutos a 37°C.

Quantificação dos produtos de extração por Eletroforese em Gel de Agarose

Para estimar a concentração da amostra de DNA genômico realizou-se a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,2 % em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) corado com 2 µL brometo de etídeo (0,4 µg/ µL), (KANBE et al., 2002). Como padrão de peso molecular foi utilizado um Ladder de 1Kb (Amresco). Foram utilizados 5 µL da amostra de DNA e 2 µL de *Loading Dye* (LudwigBiotec). A corrida eletroforética foi ajustada para 100 V durante 60 minutos e os resultados revelados em transiluminador. As amostras de DNA foram então diluídas e padronizadas na concentração de 25 ng para a reação em cadeia da polimerase – PCR.

Amplificação dos marcadores moleculares por PCR – multiplex

Para a identificação das espécies de *Candida* foi utilizada a metodologia proposta por Taira (2013) baseada na nested-multiplex do tipo *touchdown* (ROUX, 2009).

No primeiro *round* de amplificação foram utilizados os primers universais ITS1 e ITS4 (Tabela 1). Foi preparado uma reação de 50 µL com tampão da enzima 1X, 0,1 mM de mix de dNTPs, 0,4 µM de cada *primer* ITS, taq-polimerase 2 U/ µL (Cellco) e 25 ng de DNA.

As condições de ciclagem programadas em Termociclador Thermo Electron Corporation PCR Sprint foram um ciclo de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido

de trinta ciclos desnaturação à 95°C por 45 segundos, anelamento à 50°C por 45 segundos, extensão à 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os *amplicons* obtidos na PCR foram revelados em gel de agarose a 2,5% seguindo o mesmo método utilizado na determinação da concentração e utilizando como marcador de peso molecular um *Ladder* de 100 pb (Ludwig).

	<i>Primer</i>	Sequencia	<i>Amplicon</i>
Fungos	ITS1/4	F: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCGG-3' R: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Variável
<i>C. albicans</i>	CALB1/2	F: 5'-TTTATCAACTTGTCACACCAGA-3' R: 5'-ATCCCGCCTTACCACTACCG-3'	272pb
<i>C. glabrata</i>	CGL1/2	F: 5'-TTATCACACGACTCGACACT-3' R: 5'-CCCACATACTGATATGGCCTACAA-3'	423pb
<i>C. parapsilosis</i>	CPAR3/2	F: 5'-GCCAGAGATTAACCTCAACCAA-3' R: 5'-CCTATCCATTAGTTTATACTCCGC-3'	297pb
<i>C. tropicalis</i>	CTR1/2	F: 5'-CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT-3' R: 5'-TGGCCACTAGCAAATAAGCGT-3'	357pb
<i>C. krusei</i>	CKR2/3	F: 5'-ACTACACTGCGTGAGCGGAA-3' R: 5'-AAAAGTCTAGTTCGCTCGG-3'	362pb

Tabela 1. Sequencia de *primers* para reação de PCR multiplex. F= Forward, R= Reverse, pares de bases. Adaptado a partir de Del Negro (2008).

O segundo *round* de amplificação foi caracterizado como espécie - específico baseado no emprego dos *primers* internos que amplificam regiões específicas de cada espécie de *Candida*. Foi preparado uma reação de 50 µL com tampão da enzima 1X, 0,1 mM de mix de dNTPs, cada *primer* nas concentrações de 0,20 µM de CALB, 0,12 µM CTR, 0,30 µM CGL, 0,20 µM de CKR, e 0,15 µM de CPAR, 2 U/ µL Taq DNA-polimerase e o produto do primeiro round de amplificação na diluição de 1:100.

As condições de ciclagem Multiplex tipo *touchdown* programadas no Termociclador foram um ciclo de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos com desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento *touchdown* com decréscimo de 1 °C a partir de 67 °C à 58 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos. Na mesma ciclagem foi incluída uma desnaturação a 95 °C por 5 minutos, anelamento a 58 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 45 segundos, uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Eletoforese dos produtos de amplificação por PCR

Para visualização dos resultados da PCR foi novamente utilizada a metodologia de Kanbe et al. (2002). Todos os ensaios de eletroforese foram registrados em fotos e tratados com o *software* ImageJ®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a capacidade de identificação de espécies de *Candida* em amostras de pacientes usuários de prótese dental por meio de reação de PCR multiplex. Foram coletadas amostras bucais de 10 pacientes e destes apenas 8 pacientes apresentaram crescimento das leveduras em meio Saubourand. Estas amostras positivas para crescimento de leveduras foram utilizadas para extração de DNA e a qualidade da extração de DNA e a concentração (ng) foram reveladas em eletroforese em gel de agarose (Figura 1).

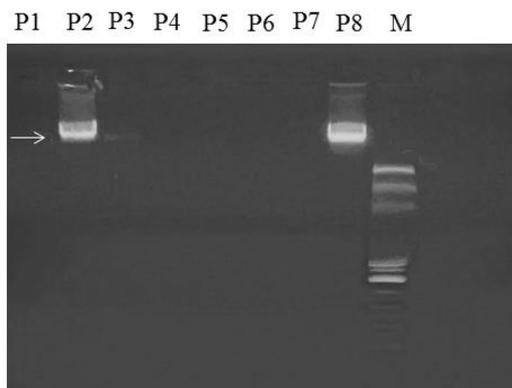


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídeo apresentando os resultados da extração de DNA de amostras de *Candida* spp.. Canaletas apresentadas como P1 à P8 correspondem as amostras dos pacientes com crescimento da levedura positivo em meio de cultura Saboraand. Canaleta indica por M corresponde a marcador de peso molecular de 1 Kb (Amresco).

O resultado da eletroforese mostrou que três amostras provindas pacientes analisados apresentaram quantidade de DNA em ng suficiente para visualização no gel. Estas amostras foram utilizadas para a primeira *round* da reação de PCR utilizando os primers universais ITS (Figura 2).

A amplificação via PCR da região ITS do DNAr é comumente utilizada como marcador molecular em fungos. Neste estudo, esta região apresentou sensibilidade para as espécies de *C. krusei* (~ 510 pb) utilizado no controle positivo e para *C. tropicalis* (~526 pb), sendo esta espécie de ocorrência no paciente nomeado como P3. É reconhecido para o gênero

Candida seja necessária a amplificação por dois *rounds*, ou seja, por Nested-PCR, pois os *amplicons* gerados via amplificação da região ITS pode ser de difícil individualização quando visualizados em gel de agarose.

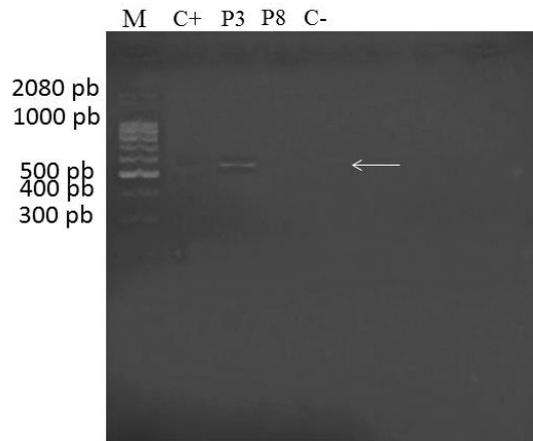


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 2,5 % corado com brometo de etídeo apresentando a amplificação via PCR da região ITS das amostras dos pacientes. Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig), Canaleta 2: controle positivo, Canaletas 3 e 4: pacientes e Canaleta 5: controle negativo.

A capacidade de detecção do DNA do microrganismo depende da capacidade da amplificação seletiva de regiões específicas de DNA, por meio de marcadores moleculares, da técnica de PCR, possibilitando que até mesmo quantidades mínimas de DNA encontrados nas amostras sejam detectadas (MANZANO, 2016; ZHANG et al., 2016).

O genoma da *Candida* é constituído em sua maior parte por DNA mitocondrial e ribossômico, e devido sua expansiva variabilidade de regiões entre as espécies é possível utilizá-los para testes moleculares de identificação de espécies de *Candida*. Seu alvo principal para a amplificação da técnica de PCR são sequências variáveis repetidas *en tandem* denominadas de *Internal Transcribed Spacer* (ITS) encontradas no DNA ribossômico da *Candida*, que presentes em múltiplas cópias pelo seu genoma que pode aumentar ainda mais a sensibilidade da técnica (MANZANO, 2016; TAIRA, 2013; ZHANG et al., 2016).

Neste estudo, optou-se pela Nested-PCR multiplex com o primeiro *round* com o primer universal ITS e apenas um segundo *round* único com todos os primers que identificam as espécies de *Candida* na mesma reação (Figura 3).

O resultado do segundo *round* permitiu identificar que os pacientes indicados como P3 e P8 apresentavam candidíase e as espécies foram identificadas como *C. albicans* (272 pb) e *C. tropicalis* (357 pb). Para comparação e para demonstrar a capacidade distintiva da reação

de PCR multiplex o controle positivo foi composto pelas espécies *C. glabrata* (423 pb) e *C. krusei* (362 pb).

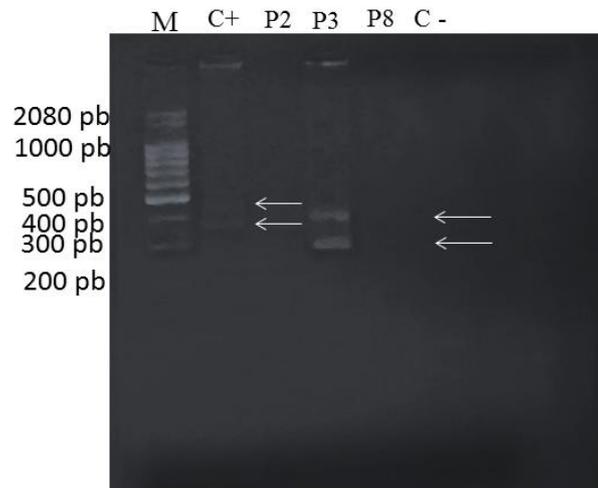


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo apresentando a amplificação via PCR dos primers espécie-específicos das amostras dos pacientes. Canaleta 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Ludwig), Canaleta 2: controle positivo, Canaletas 3 e 5: pacientes e Canaleta 5: controle negativo.

A PCR tipo multiplex apresenta como vantagens a amplificação simultânea de diferentes regiões-alvo no DNA, sejam estas presentes no mesmo microrganismo ou em espécies diferentes, além de tornar o teste de identificação mais rápido e diminuir as chances de contaminação da reação (TAIRA, 2013).

Com relação a especificidade da reação os métodos tipo Nested e *touchdown* aliados a diluição da amostra do primeiro *round* auxiliam evitando a produção de *amplicons* não específicos (TAIRA, 2013), no entanto não contribuíram diretamente na geração de uma grande quantidade de fragmentos de DNA que marcam esta região, desta maneira as bandas apresentadas no gel de agarose se mostram muito claras. Estes problemas poderiam ser solucionados pelo aumento na quantidade de ciclos durante a amplificação no termociclador e pela aplicação de substâncias que aumentam a sensibilidade dos *primers* as sequências-alvo nas leveduras.

Mesmo diante destes desafios é possível afirmar que a reação de PCR tipo multiplex é eficaz na distinção e identificação de espécies de *Candida* que causam candidíase bucal em

pacientes usuários de próteses dental e desta maneira auxiliar na escolha do tratamento mais eficaz contra estes agentes patogênicos.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foi utilizado o método de PCR multiplex para identificação simultânea de espécies de *Candida* em uma única reação. O método utilizado foi capaz de identificar de maneira distintiva as espécies de *Candida*, além disso, também foi capaz de identificar em um mesmo indivíduo a ocorrência de duas espécies diferentes que colonizam ao mesmo tempo cavidade bucal. Embora, a PCR multiplex testada tenha sido capaz de identificação a sensibilidade foi considerada inferior ao esperado. Assim, é sugerido que estudos posteriores podem ser realizados a fim aumentar a eficiência do teste promovendo a padronização da reação de PCR com incremento de substâncias que elevam a sensibilidade e ampliação no número de ciclos no termociclador.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução N°466**. Conselho Nacional de Saúde e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, p.1-12, 2012. Acesso em: 18/07/2017. Disponível em: <<<http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf>>>.

CARVALHO, A.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; MARTINS, M.L.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Identification of eighth clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 619–627, 2007.

COSTA, K. R. A. D. ***Candida albicans: uma revisão de literatura***. Aparecida de Goiânia: Faculdade Alfredo Nasser – Instituto de Ciências da Saúde, 2016, 5 p.

FALCÃO, A. F. P.; SANTOS, L. D. B.; SAMPAIO, N. D. M. Candidíase associada a próteses dentárias. **Sitientibus**, n. 30, p. 135-146, 2004.

GASPARETTO, A.; NEGRI, M. F. N.; PAULA, C. R. D.; SVIDZINSKI, T. I. E. Produção de biofilmes por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Sci Health Sci**, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatologia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

IMABAYASHI, Y.; MORIYAMA, M.; TAKESHITA, T.; IEDA, S.; HAYASHIDA, J. N.; TANAKA, A.; MAEHARA, T.; FURUKAWA, S.; OHTA, M.; KUBOTA, K.; YAMAUCHI, M.; ISHIGURO, N.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, S. Molecular analysis of fungal populations in patients with oral candidiasis using next-generation sequencing. **Nature**, v. 6, n. 28110, p. 1-8, 2016.

KANBE, T.; HORII, T.; ARISHIMA, T.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. **Yeast**, v. 29, p. 973-989, 2002.

MANZANO, M. I. **Identificação molecular por nested-PCR de *Candida* sp. em mucosa bucal de pacientes atendidos em clínica odontológica.** 2016. 17f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biomedicina), Unicesumar - Centro Universitário Cesumar, Maringá, 2016.

MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. Y.; MARTINO, M. D. V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I. J. Diagnóstico de infecção por *Candida*: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.

PARAGUASSÚ, G. M.; PIMENTEL, P. A.; SANTOS, A. R.; GURGEL, C. A. S.; SARMENTO, V. A. Prevalência de lesões bucais associadas ao uso de próteses dentárias removíveis em um dos serviços de estomatologia. **Rev Cubana de Estomatol**, v. 48, n. 3, p. 268-276, 2011.

PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase – uma revisão de literatura. **BJSCR**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

PERES, M. A.; BARBATO, P. R.; REIS, S. C. G. B.; FREITAS, C. H. S. D. M.; ANTUNES, J. L. F. Perdas dentárias no Brasil: análise da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010. **Rev Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 78-89, 2013.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **CSH Protocols**, v. 4, n. 4, p. 1-6, 2009.

SENA, M. F. D.; GONDIM, L. A. M.; SOUZA, G. C. D. A.; FERREIRA, M. A. F.; LIMA, K. C. Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. **AMRIGS**, v. 53, n. 3, p. 241-245, 2009.

SILVA, M. E. D. S. E.; MAGALHÃES, C. S. D.; FERREIRA, E. F. E. Perda dentária e expectativa da reposição protética: estudo qualitativo. **Rev Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 813-820, 2010.

SIQUEIRA, J. D. S. S.; BATISTA, S. A.; JUNIOR, A. S.; FERREIRA, M. F.; AGOSTINI, M.; TORRES, S. R. Candidíase oral em pacientes internados em UTI. **RBO**, v. 71, n. 2, p. 176-9, 2014.

TAIRA, C. L. **Validação da PCR multiplex na detecção e identificação de *Candida* spp. em infecções de corrente sanguínea de pacientes pediátricos gravemente doentes.** 2013. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

TAIRA, C. L.; OKAY, T. S.; DELGADO, A. F.; CECCON, M. E. J. R.; ALMEIDA, M. T. G. D.; NEGRO, G. M. B. D. A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 406, p. 1-7, 2014.

TARINI, N. M. A.; WAHID, M. H.; IBRAHIM, F.; YASMON, A.; DJAUZI, S. Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida* spp. **Med. J. Indones**, v. 19, n. 2, p. 83-88, 2010.

ZHANG, J.; HUNG, G. C.; NAGAMINE, K.; LI, B.; TSAI, S.; LO, S. C. Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. **Microbiology Insights**, v. 9, p. 21-28, 2016.