

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

PEDRO CASTANIA AMADIO DOMINGUES

**Avaliação *in vitro* da formação de biofilme por cepas de
Candida spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não
diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose**

RIBEIRÃO PRETO

2020

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO**

PEDRO CASTANIA AMADIO DOMINGUES

***Avaliação in vitro* da formação de biofilme por cepas de
Candida spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não
diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose**

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Fundamentação teórica, metodológica e tecnológica do processo de cuidar.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Watanabe

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Domingues, Pedro Castania Amadio

Avaliação in vitro da formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose. Ribeirão Preto, 2020.

78 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Evandro Watanabe

1. Biofilmes. 2. Candidíase Bucal. 3. Diabetes Mellitus. 4. Saliva.

DOMINGUES, Pedro Castania Amadio

Avaliação *in vitro* da formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental.

Aprovado em:

Presidente

Prof. Dr _____
Instituição _____

Comissão Julgadora

Prof. Dr _____
Instituição _____

Prof. Dr _____
Instituição _____

Prof. Dr _____
Instituição _____

DEDICATÓRIA

A Deus por me fazer seguir em frente nos dias difíceis e nos dias fáceis da vida, e assim me fortalecer e ensinar a valorizar cada uma das coisas que temos.

Aos meus pais, Edilaine Castania Amadio Domingues e Luiz Antonio Domingues, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Obrigado por me ensinarem a caminhar e assim poder seguir meus próprios passos, pela educação que me deram e por sempre estarem ao meu lado, tanto nas alegrias como nos momentos difíceis. Devo a vocês meu caráter, meus valores e minha felicidade. Já me consideraria uma pessoa afortunada se tivesse somente um de vocês em minha vida, mas ter vocês dois, ainda mais como pai e mãe, faz de mim uma pessoa abençoada. Obrigado por tudo, de coração. Amo muito vocês!

Ao meu irmão, Lucas Castania Amadio Domingues, por me aguentar durante esses anos todos e estar sempre ao meu lado quando preciso.

As minhas avós, Nair Baptista Domingues (*in memorian*) e Maria Isaura Castania Amadio, pelo amor incondicional e por serem responsáveis por eu ser a pessoa que sou hoje.

Aos meus avôs (*in memorian*), Luizinho Domingues e Nevercindo Amadio, pelos conselhos, broncas e risadas que me tornaram uma pessoa melhor.

A toda minha família por fazer parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Evandro Watanabe, que me proporcionou essa oportunidade e acreditou em mim, pela capacidade, serenidade, paciência e amizade. Obrigado por compartilhar comigo seu amor pelo ensino e ciência.

À Profa. Dra. Denise de Andrade, por meio de oportunidade, carinho, amizade e conselhos. Obrigado por tudo nessa minha caminhada.

Ao André Pereira dos Santos, por auxiliar na elaboração da dissertação, além de me tranquilizar, incentivar, e ainda pela realização das análises estatísticas desta pesquisa, não tenho palavras para agradecer tudo o que você fez por mim, obrigado, de coração.

À Viviane de Cássia Oliveira e ao Felipe Lazarini Bim, por auxiliarem com disposição e profissionalismo o desenvolvimento da minha pesquisa, bem como todos os momentos de ensinamento e amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, Rachel Maciel Monteiro, Álvaro Francisco Lopes Souza, Artur Acelino Francisco Luiz Queiroz, Lucas Lazarini Bim, Gisele Tais Roldão de Souza, Guilherme Schneider, Hérica Emilia Félix de Carvalho, Marcela Padilha Facetto Azevedo, Marinila Buzanelo Machado, e Kaon Doca de Sá, por tornar o ambiente de trabalho um lugar extremamente agradável, me ajudar durante o mestrado e ainda compartilhar um pouco de suas experiências e conhecimentos comigo.

À Rita, pelos momentos de descontração e risadas na hora do cafezinho.

À Profa. Dra. Carolina Patrícia Aires Garbellini e à Ana Cristina Morseli Polizello da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP pela parceria na quantificação de matéria seca do biofilme desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Vanderlei José Haas, pelos conselhos referentes as questões estatísticas no meu exame de qualificação.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da EERP-USP, pelos momentos de aprendizado e de descontração proporcionados.

À Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP (EERP-USP) e ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem Fundamental da EERP-USP, pela infraestrutura e suporte oferecidos durante o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (FORP-USP), pela infraestrutura e suporte oferecidos durante o desenvolvimento da minha dissertação de mestrado.

AUXÍLIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

DOMNIGUES, Pedro Castania Amadio. **Avaliação *in vitro* da formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose.** 2020. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

É notório o papel do diabetes *mellitus* como fator de risco para o desenvolvimento de doenças bucais, como a candidíase bucal, cárie e a periodontite. Assim, este estudo tem como objetivo avaliar a formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose. Trata-se de um estudo experimental laboratorial *in vitro*, em três etapas. Etapas um e dois, de obtenção e identificação de 48 cepas de *Candida* spp., sendo que 32 de *C. albicans* e 16 de *C. glabrata*, com auxílio da técnica de PCR. Ainda, a etapa três, de processamento microbiológico, com a avaliação da capacidade de formação de biofilme por três ensaios distintos: I) determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL); II) matéria seca dos biofilmes; III) taxa de crescimento de biofilme em fundo de placa de poliestireno. Inicialmente, objetivando simular as características observadas *in vivo*, o fundo das placas de cultivo recebeu 400 µL de saliva humana para formação da película adquirida. Decorrida a incubação a 37 °C por 24 h, a saliva foi descartada e cada poço de cultura recebeu suspensão padronizada das leveduras (10^6 UFC/mL) em *Saubouraud Dextrose Broth* sem suplementação e com suplementação de glicose a 2 e 10 mg/mL, e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Para avaliação do número de UFC/mL, o biofilme aderido foi coletado, diluído seriamente e cultivado em placas de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar*. Após incubação os resultados foram expressos em log UFC/mL. Para a avaliação da matéria seca, a solução remanescente foi liofilizada e mensurada em balança de precisão. A taxa de crescimento de biofilme foi avaliada por microscopia *Operetta CLS High Content* e o *FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability kit*, conforme o protocolo do fabricante. Posteriormente, 10 imagens por poço foram obtidas e digitalizadas com ampliação de 40 x. A área recoberta por biofilme (μm^2) das imagens foi avaliada com auxílio do *software Harmony High Content Imaging*. Os dados apresentaram distribuição não normal, e a comparação entre as cepas de diabéticos e não diabéticos foi realizada pelo teste *U Mann–Whitney*. O teste de *Kruskal–Wallis one way* foi utilizado para verificar diferenças entre as condições de suplementação de glicose. O nível de significância estatística adotado foi de $\alpha = 5\%$. Os valores de UFC/mL mostraram um maior crescimento das cepas de *C. albicans* dos pacientes diabéticos em relação aos não diabéticos nas três suplementações ($p < 0,001$). Por outro lado, acerca da matéria seca em 10 mg/mL e da taxa de crescimento de biofilme sem suplementação de glicose e a 2 mg/mL, os resultados indicaram uma formação de biofilme maior para cepas de *C. albicans* dos não diabéticos ($p < 0,001$). Em conclusão, cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose apresentaram resultados distintos quanto à formação de biofilme, por diferentes técnicas.

Palavras-chave: Biofilmes. Candidíase Bucal. Diabetes Mellitus. Saliva.

ABSTRACT

DOMNIGUES, Pedro Castania Amadio. ***In vitro* evaluation of biofilm formation by *Candida* spp. strains from diabetic and non-diabetic individuals in environment without and with glucose supplementation.** 2020. 78 f. Dissertation (Master of Science) – School of Nursing of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

The role of diabetes *mellitus* is notorious as a risk factor for development of oral diseases, such as oral candidiasis, dental caries, and periodontitis. Thus, this study aimed to evaluate biofilm formation by *Candida* spp. strains from diabetic and non-diabetic individuals in environment without and with glucose supplementation. This is an *in vitro* experimental laboratory study, in three stages. Stages one and two of obtainment and identification of 48 *Candida* spp. strains, with 32 of *C. albicans* and 16 of *C. glabrata*, with the help of PCR technique. Also, stage three, of microbiological processing, with evaluation of biofilm formation capacity by three different assays: I) determination of the number of colony forming units (CFU/mL); II) biofilm dry matter; III) biofilm growth rate on the bottom of polystyrene plates. Initially, aiming to simulate the characteristics observed *in vivo*, the bottom of the cultivation plates received 400 µL of human saliva for formation of acquired pellicle. After the incubation at 37 °C for 24 h, the saliva was discarded and each culture well received standardized suspension of yeast (10^6 CFU/mL) in Sabouraud Dextrose Broth without supplementation and with glucose supplementation at 2 and 10 mg/mL, and the plates were incubated at 37 °C for 48 h. To assess the number of CFU/mL, the adhered biofilm was collected, seriously diluted, and cultivated in Petri dishes with Sabouraud Dextrose Agar. After the incubation, the results were expressed in log CFU/mL. To assess the dry matter, the remaining solution was lyophilized and measured on a precision scale. The biofilm growth rate was evaluated by Operetta CLS High Content microscopy and FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability kit, according to manufacturer's protocol. Later, 10 images per well were obtained and digitalized with 40 × magnification. The area covered by biofilm (µm²) of the images was assessed with the help of Harmony High Content Imaging software. Data showed non-normal distribution, and the comparison among the diabetic and non-diabetic strains was performed by Mann–Whitney *U* test. Kruskal–Wallis one-way test was used to verify differences between conditions of glucose supplementation. The level of statistical significance adopted was $\alpha = 5\%$. The values of CFU/mL showed greater growth of the diabetic patient's strains in relation to the non-diabetic ones ($p < 0.001$). On the other hand, regarding dry matter at 10 mg/mL and the growth rate of biofilm without glucose supplementation and at 2 mg/mL, the results indicated a higher biofilm formation for strains of *C. albicans* from non-diabetic individuals ($p < 0.001$). In conclusion, *C. albicans* and *C. glabrata* strains from diabetic and non-diabetic individuals in environment without and with glucose supplementation showed different results concerning the biofilm formation, using different techniques.

Keywords: Biofilms. Candidiasis, Oral. Diabetes Mellitus. Saliva.

RESUMEN

DOMNIGUES, Pedro Castania Amadio. **Evaluación *in vitro* de la formación de biopelículas por *Candida spp.* de individuos diabéticos y no diabéticos en un ambiente sin y con suplementación de glucosa.** 2020. 78 f. Disertación (Maestría en Ciencias) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Es notorio el papel de la diabetes *mellitus* como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades bucales, como candidiasis bucal, caries y periodontitis. Por lo tanto, este estudio tiene como objetivo evaluar la formación de biopelículas por *Candida spp.* de diabéticos y no diabéticos en un ambiente sin y con suplementación de glucosa. Se trata de un estudio de laboratorio experimental *in vitro*, en tres etapas. Etapas uno y dos, para obtener e identificar 48 cepas de *Candida spp.*, 32 de *C. albicans* y 16 de *C. glabrata*, con ayuda de la técnica de PCR. Aún, etapa tres, del procesamiento microbiológico, con la evaluación de la capacidad de formación de biopelículas por tres pruebas diferentes: I) determinación del número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL); II) materia seca de biopelículas; III) tasa de crecimiento de biopelícula en un fondo de placa de poliestireno. Inicialmente, con el objetivo de simular las características observadas *in vivo*, el fondo de las placas de cultivo recibió 400µL de saliva humana para formar la película adquirida. Después de la incubación a 37°C durante 24h, se descartó la saliva y cada cultivo recibió una suspensión de levadura estandarizada (10^6 UFC/mL) en *Saubouraud Dextrose Broth* sin suplementación y con suplementación de glucosa a 2 y 10 mg/mL, y las placas se incubaron a 37 °C durante 48h. Para evaluar el número de UFC/mL, se recogió la biopelícula adherida, se diluyó seriamente y se cultivó en placas de Petri con *Sabouraud Dextrose Agar*. Después de la incubación, los resultados se expresaron en log CFU/mL. Para la evaluación de materia seca, la solución restante se liofilizó y se midió en una escala de precisión. La tasa de crecimiento del biofilm se evaluó mediante microscopía *Operetta CLS High Content* y *FilmTracer™ LIVE/DEAD Biofilm Viability kit*, de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, se obtuvieron 10 imágenes por pocillo y se digitalizaron con un aumento de 40x. El área cubierta por la biopelícula (µm²) de las imágenes se evaluó con la ayuda del *software Harmony High Content Imaging*. Los datos mostraron una distribución no normal y la comparación entre las cepas de diabéticos y no diabéticos se realizó mediante la prueba *U Mann-Whitney*. Se utilizó la prueba unidireccional de *Kruskal-Wallis one way* para verificar las diferencias entre las condiciones de suplementación de glucosa. El nivel de significación estadística adoptado fue $\alpha=5\%$. Los valores de UFC/mL mostraron un mayor crecimiento de cepas en pacientes diabéticos en comparación con pacientes no diabéticos ($p < 0,001$). Por otro lado, con respecto a la materia seca en 10 mg/mL y la tasa de crecimiento de biopelículas sin suplementación de glucosa y 2 mg/mL, los resultados indicaron una mayor formación de biopelículas para las cepas no diabéticas ($p < 0.001$). En conclusión, cepas de *C. albicans* y *C. glabrata* de diabéticos y no diabéticos en un ambiente sin y con suplementación de glucosa mostraron resultados diferentes en cuanto a la formación de biopelículas, por diferentes técnicas.

Palabras clave: Biopelículas. Candidiasis Bucal. Diabetes Mellitus. Saliva.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Colônias de <i>Candida</i> spp.....	44
Figura 2. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de <i>Candida albicans</i> de pacientes diabéticos.....	57
Figura 3. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de <i>Candida albicans</i> de pacientes não diabéticos.....	58
Figura 4. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de <i>Candida glabrata</i> de pacientes diabéticos.....	59
Figura 5. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de <i>Candida glabrata</i> de pacientes não diabéticos.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de <i>Candida albicans</i> entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	45
Tabela 2. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de <i>Candida albicans</i> intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	46
Tabela 3. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de <i>Candida glabrata</i> entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	47
Tabela 4 Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de <i>Candida glabrata</i> intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	48
Tabela 5. Comparação do crescimento de cepas de <i>Candida albicans</i> (g) entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	51
Tabela 6. Comparação do crescimento de cepas de <i>Candida albicans</i> (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	52
Tabela 7. Comparação do crescimento de cepas de <i>Candida glabrata</i> (g) entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	53
Tabela 8. Comparação do crescimento de cepas de <i>Candida albicans</i> (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	54

Tabela 9. Taxa de crescimento das cepas de <i>Candida albicans</i> (μm^2) isoladas de pacientes diabéticos e não diabéticos e cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	61
Tabela 10. Comparação do crescimento de cepas de <i>Candida albicans</i> (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	62
Tabela 11. Taxa de crescimento das cepas de <i>Candida glabrata</i> (μm^2) isoladas de pacientes diabéticos e não diabéticos e cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	63
Tabela 12. Comparação do crescimento de cepas de <i>Candida glabrata</i> (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
CPOD	Índice de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
HbA1c	Hemoglobina glicada
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMMA	Polimetilmetacrilato
PRISMA	Principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análises
PSP	Profundidade de sondagem periodontal
RFLP	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
UFC	Unidade(s) formadora(s) de colônia
USP	Universidade de São Paulo
YBN	Meio de cultura para levedura à base de nitrogênio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau(s) Celsius
μL	Microlitro(s)
μm	Micrometro(s)
dL	Decilitro(s)
G	Aceleração da gravidade
g	Grama(s)
h	Hora(s)
L	Litro(s)
m	Metro(s)
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)
mm	Milímetro(s)
mM	Milimol(s)
ng	Nanograma(s)
RPM	Rotação(ões) por minuto
s	Segundo(s)
V	Volt(s)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISTA DA LITERATURA.....	19
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Aspectos éticos	34
4.2 Delineamento da Pesquisa	34
4.3 Local do Estudo	34
4.4 Procedimento para a coleta de dados	35
4.4.1 Seleção amostral	35
4.4.2 Identificação das cepas de <i>Candida spp.</i>	35
4.4.2.1 Identificação das espécies de <i>Candida</i> pela técnica de PCR	35
4.4.2.2 Extração do DNA das leveduras	36
4.4.2.3 Seleção do Primer e amplificação da PCR	37
4.5 Preparação da saliva	38
4.5.1 Critérios de inclusão e exclusão para doação de saliva	38
4.5.2 Coleta de saliva	38
4.5.3 Preparo da película adquirida com saliva	39
4.6. Formação de biofilme por <i>Candida spp.</i>	39
4.7 Avaliação da carga fúngica (UFC/mL) do biofilme	40
4.8 Determinação da matéria seca do biofilme	40
4.9 Análise da taxa de crescimento de biofilme por microscopia de fluorescência	41
4.10 Análise dos dados	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Avaliação da carga fúngica (UFC/mL) do biofilme	43
5.2 Determinação da matéria seca do biofilme	50
5.3 Análise da do crescimento do biofilme por microscopia de fluorescência	56
6 DISCUSSÃO	66
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS ¹	73
APÊNDICE	76

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma das principais doenças associadas à morbidade e mortalidade no mundo. Estima-se que até 2040, aproximadamente, 642 milhões de pessoas desenvolverão o diabetes. Entende-se DM como uma desordem de ordem metabólica, caracterizada pelo comprometimento na síntese/absorção da insulina, que pode desencadear complicações oculares, renais e vasculares, são conhecidos dois tipos de diabetes: O tipo I caracterizado pela destruição das células produtoras de insulina por meio de um processo autoimune, e tipo II onde as células do corpo não conseguem utilizar de maneira adequada a insulina produzida ou não há produção de insulina suficiente para o controle glicêmico. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

É notório que o DM é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças bucais, como a cárie e a periodontite, bem como outros quadros que podem influenciar na saúde bucal, em decorrência da alteração de pH, da xerostomia, das lesões na mucosa da boca (LOPÉZ-PINTOR, 2016).

A microbiota bucal é uma parte importante do microbioma humano, contendo vários nichos diferentes com comunidades microbianas distintas, albergando cerca de 700 espécies bacterianas e outros micro-organismos (fungos, vírus e protozoários), que colonizam as superfícies duras dos dentes, bem como os tecidos moles da mucosa bucal (GOODSON, 2017).

A literatura científica sinaliza que as infecções bucais são capazes de influenciar no nível sanguíneo de glicose e no processo de equilíbrio de saúde/doença presente boca. Além disso, a glicemia controlada propicia um sistema imunológico mais eficiente no combate a infecções. No entanto, quando descompensada, a glicemia proporciona um ambiente favorável ao desenvolvimento de infecções e vice e versa (LOPÉZ-PINTOR, 2016).

Observa-se na literatura científica a importância e a influência no processo saúde/doença bucal e as doenças sistêmicas, tais como o diabetes, possuem entre si apresentando uma relação recíproca, uma vez que ocorre uma infecção bucal a doença sistêmica tende a se agravar e a doença sistêmica não controlada favorece o surgimento de infecções e o desenvolvimento de respostas inflamatórias sistêmicas. Além disso, evidências

crescentes sustentam que essa microbiota pode influenciar outros aspectos da saúde sistêmica, inibindo potenciais patógenos, regulando respostas imunes, a absorção e metabolismo de nutrientes, bem como em conjunto com seus subprodutos pode causar complicações como doenças cardiovasculares e tumores. (SAEB, 2019).

A candidíase bucal e outras doenças fúngicas superficiais ou sistêmicas podem ocorrer devido ao descontrole do DM. Ainda, o agravamento da candidíase bucal, que pode ser classificada em três grandes variantes, a candidíase pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica em pacientes com DM é mais frequente. Além disso o tempo de tratamento desses pacientes pode ser maior e com isso há necessidade de utilização de diversos medicamentos antifúngicos e assim causar o surgimento de espécies de *Candida* resistentes a esses medicamentos. Por outro lado, apesar das pesquisas demonstrarem a correlação do DM com a candidíase bucal, o papel da carga fúngica em relação ao agravamento deste tipo de infecção permanece como uma incógnita (MARTINEZ et al., 2013).

O DM tem papel importante no que diz respeito à microbiota bucal podendo causar alterações nessa microbiota e proporcionando um ambiente favorável ao desenvolvimento excessivo de espécies de *Candida* (BABATZIA et al., 2019).

Desta maneira, a associação entre o DM e a candidíase bucal pode ser verificada em vários aspectos, seja a partir da doença fúngica, como em uma infecção local ou sistêmica, aumento da patogenicidade, como capacidade de formação de biofilme. Biofilme é a (o) comunidade / consórcio / cadeia alimentar de micro-organismos aderidos na superfície de sólidos e embutidos em matriz de substâncias poliméricas extracelulares (açúcares, proteínas e ácidos nucleicos), em ambiente que contém líquidos, sendo altamente resistente aos agentes antimicrobianos (DE SOUZA et al., 2014).

A partir do paciente hospedeiro em relação à aderência de leveduras às superfícies celulares epiteliais, níveis mais altos de glicose salivar, fluxo salivar reduzido, degeneração microvascular e atividade antifúngica reduzida dos neutrófilos são fatores que podem causar a um desequilíbrio da relação paciente e micro-organismo e resultar na transformação da levedura de

comensal em parasita (AL MUBARAK, 2013; BALAN, 2015; DUGGAN et al, 2015; HAMAD, 2013; MOTTA-SILVA, 2010).

Diversas pesquisas têm sido realizadas acerca da relação entre o diabetes *mellitus* e os níveis de glicose salivar (BALAN, 2015; MARTINEZ et al., 2013). A alteração dos níveis de glicose na saliva é um dos fatores etiológicos relacionadas ao desenvolvimento de candidíase bucal por alterar a microbiota bucal. Essa alteração leva a um desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro que existe na boca, e isso contribui no surgimento de infecções e outros problemas aos portadores do diabetes.

Assim, a compreensão da formação de biofilmes por cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose, por meio das ciências básicas, pode permitir o avanço do conhecimento nas perspectivas microbiológicas e aplicadas na área da saúde, com possíveis enfrentamentos aos desafios na manutenção do equilíbrio no processo de saúde / doença das pessoas.

A hipótese nula desse estudo é que a suplementação do meio de cultura com diferentes concentrações de glicose não teria efeito na formação de biofilmes por cepas de *Candida* spp. provenientes de pacientes diabéticos e não diabéticos.

2 REVISTA DA LITERATURA

A revista da literatura desta pesquisa foi desenvolvida no período de 2008 a 2019, a partir de uma busca sistematizada no portal *PubMed* da *National Library of Medicine* de artigos científicos originais e de revisão da literatura relacionados a capacidade de formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos, bem como cultivados em ambiente sem e com suplementação de glicose.

Motta-Silva et al. (2010) isolaram e identificaram *Candida* spp. de pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM2), por meio de morfologia, bioquimismo, produção enzimática e biologia molecular. Um total de 274 pacientes foram divididos em dois grupos: grupo 1 (G1) - 156 usuários de prótese total sem DM2 (grupo controle) e grupo 2 (G2) - 118 usuários de prótese total com DM2. Após a definição dos critérios de inclusão e exclusão, o G1 permaneceu com 30 pacientes e o G2 com 47. As amostras de cada paciente foram coletadas do palato com auxílio de swab e, em seguida, semeadas em placas de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar* suplementado com cloranfenicol. A incubação das placas foi realizada a 30 °C por 48 a 72 h, e as colônias das leveduras isoladas foram identificadas por bioquimismo com auxílio do kit Api 20C Ref 20210. Além disso, a identificação morfológica foi realizada pelo teste do tubo germinativo, e a enzimática pela produção de exoenzimas (fosfolipase e proteinase). Ainda, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi a técnica empregada para a identificação por biologia molecular de *Candida* spp. Como resultados, a candidíase bucal demonstrou lesões eritematosas em 28 (59,6%) dos diabéticos. Ademais, dessas amostras, 24 (85%) apresentaram *Candida* spp. No G1, 25 (83,4%) dos pacientes apresentaram *C. albicans*, enquanto no G2 foram isoladas 16 (66,7%) *C. albicans*, 3 (12,5%) *C. tropicalis*, 2 (8,3%) *C. famata*, 1 (4,2%) *C. glabrata* e 2 (8,3%) amostras com nenhuma identificação possível. Das 16 amostras de *C. albicans* identificadas bioquimicamente, 75% produziram fosfolipase (50% com elevada atividade enzimática). Ainda, das 16 *C. albicans*, 31,3% produziram proteinase com atividade enzimática. Em suma, os diabéticos apresentaram maior diversidade de *Candida* spp e condições sistêmicas predisponentes à

produção de proteinase por *C. albicans*, que pode estar associada às manifestações clínicas da candidíase bucal eritematosa.

Em 2013, Hammad, Darwazeh e Idrees determinaram a prevalência em um grupo de pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM2) e periodontite crônica da colonização na língua e no biofilme dentário subgengival por *Candida* spp. Outrossim, a glicemia, parâmetros periodontais [índice gengival (IG) e índice de placa (IP)], hábitos de higiene bucal, duração do diabetes, idade e sexo do paciente foram avaliados. Os pacientes com DM2 foram atendidos no ambulatório de diabéticos do hospital *Princess Basma*, na cidade de *Irbid*, localizada ao norte da Jordânia. No dia do exame clínico bucal, a hemoglobina glicada (HbA1c) foi mensurada, como indicador da glicemia de cada paciente. As amostras foram coletadas de cada paciente, do dorso da língua com suabe (n=1), de biofilmes dentários subgengivais com cureta (n=2) e das bolsas periodontais mais profundas com cureta (n=2). As amostras foram semeadas em placas de Petri com *Sabourad Dextrose Agar* e incubadas em aerobiose a 37 °C por 48 h. As colônias de *Candida* spp. isoladas foram identificadas com auxílio do sistema de identificação de leveduras *RapID Yeast Plus System*, bem como o teste do turbo germinativo. Dos 78 pacientes adultos com DM2, 38 (48,7%) eram homens e 40 (51,3%) mulheres com idade média de $55,1 \pm 9,5$ anos (de 33 a 76 anos). A duração média do DM2 foi de $7,7 \pm 4,7$ anos (de 1 a 22 anos). As *Candida* spp. foram isoladas de 46 (59%) amostras da língua e de 38 (48,7%) amostras de biofilme dentário subgengival dos pacientes com DM2. A *C. albicans* foi a espécie mais isolada nas amostras da língua e do biofilme dentário subgengival. A análise estatística demonstrou que não houve associação entre a duração do DM2 ou a idade dos pacientes com a prevalência de colonização na língua ou no biofilme dentário subgengival por *Candida* spp. Por outro lado, o descontrole da glicemia nos pacientes com DM2 foi associado a uma maior prevalência de *Candida* spp. no biofilme dentário subgengival ($p = 0,047$), mas não na língua ($p = 0,75$). De acordo com os resultados dessa pesquisa verificou-se que a duração do DM2 e a idade dos pacientes não apresentaram associação com a prevalência de candidíase bucal, mas que um controle glicêmico deficitário elevou os riscos dessa patologia.

Em 2013, Al Mubarak et al. determinaram a prevalência de *Candida* spp. em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo II (DM2) e com doença periodontal. Selecionou-se de março de 2008 a agosto de 2009, em uma cidade da Arábia Saudita, um total de 42 pacientes (18 homens e 24 mulheres) com DM2, periodontite e idade entre 21 e 70 anos. As coletas das amostras de sangue dos participantes do estudo foram realizadas em jejum, por punção venosa e no período da manhã para a avaliação da glicemia mediante o exame de hemoglobina glicada (HbA1c). Como baixo controle glicêmico foram estabelecidos níveis de HbA1c $\geq 7\%$. Ademais, a periodontite foi definida como um estado de doença caracterizada pela destruição do tecido periodontal de suporte com a presença de profundidade de sondagem periodontal (PSP) ≥ 3 mm e perda de inserção periodontal no mesmo local. Para a avaliação bucal dos pacientes foram utilizadas duas medidas clínicas (PSP e nível de inserção clínica). Foram coletadas amostras subgengivais em três bolsas periodontais mais profundas para a análise fúngica. Alíquotas de 10 μ L das amostras foram semeadas em placas de Petri com meio de cultura *CHROMagar* para o isolamento e identificação presuntiva de *Candida* spp. A incubação das placas foi realizada a 37 °C por 48h. A diferenciação dos isolados de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* foi realizada por meio da incubação das amostras a 42 °C por 48h. Ainda, o sistema API 20C AUX (bioMeriux, Marcy-l'Etoile- França) foi empregado para identificação dos isolados de *Candida* spp. por bioquimismo. A prevalência de *Candida* spp. em diabéticos foi de 52%, e as espécies identificadas: *C. albicans* (38%), *C. dubliniensis* (9,5%), *Candida tropicalis* (4,7%) e *Candida glabrata* (4,7%). Ainda, a prevalência de *Candida* spp. foi maior nos pacientes do sexo masculino do que no feminino e em pacientes com mais de 40 anos de idade. A maior prevalência de *Candida* spp. foi reportada em pacientes com baixo controle glicêmico e aqueles com PSP ≥ 5 mostraram aumento de risco de desenvolver candidíase. Em conclusão, os resultados indicaram que a prevalência de *C. albicans* foi maior que as de *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* em diabéticos (baixo controle glicêmico) e com periodontite (PSP ≥ 5 mm).

Em 2014, Gonçalves et al. analisaram a matriz de polissacarídeos extracelulares de biofilmes de *C. albicans* desenvolvida em superfície de

próteses dentárias sob exposição alimentar a carboidratos, com auxílio de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). O estudo foi realizado sobre discos de resina acrílica de polimetilmetacrilato (PMMA) com rugosidade superficial padronizada, utilizados como substrato para desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans*. Foi utilizada uma cepa ATCC (90028) de *C. albicans*, inicialmente cultivada em *Sabouraud Dextrose Agar* à 35°C por 24 h. Após o período de incubação, uma colônia foi transferida para um meio de cultura para leveduras à base de nitrogênio (YBN) suplementado com 50 mM de glicose e cultivada em aerobiose a 35 °C por 20 h sob agitador orbital. Em seguida, as suspensões foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e inoculadas em YBN sem suplementação de glicose ou sacarose (grupo controle), bem como com suplementação glicose ou sacarose a 100 mM. Para simular a cavidade bucal, os discos de PMMA foram submetidos a formação de uma película adquirida com saliva de um participante voluntário do estudo. Os discos com a película adquirida foram transferidos para uma placa de 24 poços e inoculados com suspensões de *C. albicans*. A incubação foi realizada em aerobiose a 35°C por 90 min, sob agitação orbital para aderência fúngica inicial. Depois, os discos foram lavados com solução PBS e transferidos para outra placa de 24 poços contendo YBN sem suplementação de glicose ou sacarose. A cada 24 h, os discos foram lavados com solução PBS e o meio de cultura substituído, sendo adicionados aos poços 50µM do conjugado ConA-tetrametilrodamina para a marcação da matriz de polissacarídeos extracelulares durante sua síntese. As placas foram incubadas a 35 °C por 72 h em aerobiose, protegidas da luz e sob agitação orbital. Para a análise de MCVL, os discos foram lavados com água purificada e, posteriormente, as células de levedura foram marcadas com o corante fluorescente SYTO-9 e incubadas a 35 °C por 20 min, sob a proteção da luz. Ainda, a matriz de polissacarídeos extracelulares foi avaliada pelo método de fenol-sulfúrico. Todos os dados foram analisados por ANOVA, seguidos pelo teste de Tukey e nível de significância de 5%. As imagens da MCVL mostraram um maior biovolume (quantidade de leveduras e de matriz de polissacarídeos extracelulares) no biofilme de *C. albicans* desenvolvido na presença de sacarose em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$). Em síntese, houve um

maior desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans* expostos à sacarose, e a MCVL demonstrou ser uma técnica eficaz para a finalidade proposta no estudo.

Em 2014, Kumar, Padmashree e Jayalekshmi estudaram a correlação entre os níveis de glicose sérico e salivar de pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM2). Além disso, avaliaram a relação entre os níveis de glicose salivar e de *Candida* spp., bem como se os níveis de glicose salivar poderiam ser usados como uma maneira de mensuração para o controle glicêmico não invasivo de indivíduos com DM2. Um total de 90 pacientes foi dividido em três grupos (n = 30 para cada grupo), sendo o grupo 1 (G1): pacientes com DM2 e controle glicêmico (120 a 200 mg/dL); grupo dois (G2): pacientes com DM2 sem controle glicêmico (acima de 200 mg/dL); e grupo três (G3): pacientes saudáveis (controle) com glicemia sem jejum de 80 a 120 mg/dL. A glicemia sanguínea foi determinada pelos testes de glicose-oxidase e da hemoglobina glicada (HbA1c) a partir da coleta de 2 mL de sangue, aleatoriamente e sem jejum. Ainda, a coleta de saliva foi realizada após 2 h do café da manhã para a determinação da glicose salivar. No que concerne a avaliação da carga bucal de *Candida* spp., 10 mL de solução PBS foi bochechado por 60 s e este conteúdo inoculado em placas de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar* com cloranfenicol. A análise estatística foi realizada com auxílio dos testes ANOVA, Qui-quadrado, correlação de Pearson (r) e o teste t de *student*. Os níveis de glicose sanguíneo e salivar, a HbA1c e a carga bucal de *Candida* spp. foram maiores no G2 do que no G1 e G3 ($p < 0,001$). Em conclusão, a mensuração dos níveis de glicose salivar poderia ser usada como forma estimada, não invasiva e indolor para determinação do estado diabético de pacientes na odontologia. Ainda, houve uma correlação entre o aumento de glicose salivar e carga bucal de *Candida* spp.

Em 2015, Balan et al. avaliaram os níveis de glicose salivar e a presença de *Candida* spp. em pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM2). Um total de 90 pacientes com idades entre 30 e 60 anos foi dividido em três grupos (n = 30 para cada grupo), sendo o grupo 1 (G1): pacientes saudáveis (controle) sem diabetes; grupo 2 (G2): pacientes com DM2 e controle glicêmico (< 120 mg/dL); e grupo três (G3): pacientes com DM2 sem controle glicêmico (acima de 120

mg/dL). A saliva não estimulada foi coletada e empregada para a investigação do nível de glicose, da carga de *Candida* spp. (cultura em *Sabouraud Dextrose Agar*) e do pH. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos testes post hoc de *Tukey* HSD e correlação de Pearson. A média de glicose salivar no G1 ($1,18 \pm 0,675$ g/dL) foi menor do que do G2 ($4,95 \pm 6,61$ g/dL) e do G3 ($13,35 \pm 6,61$ g/dL), e demonstraram diferença entre G1 e G3 ($p = 0,002$), bem como entre as demais comparações entre os grupos ($p < 0,001$). A carga salivar de *Candida* spp. dos pacientes maior no G1 (ausência de crescimento em 46,7% e em 40,0% com 10 UFC/mL), seguida do G2 (43,3% com 10^2 UFC/mL, enquanto nenhuma amostra acima de 10^3 UFC/mL) e G3 (de 10 a 10^4 UFC/mL, com predomínio de 30% com 10^2 UFC/mL). Além disso, houve excelente correlação entre os níveis de glicose salivar e a carga de *Candida* spp. nos três grupos ($p < 0,001$ e $r = 0,844$; $0,925$ e $0,901$, respectivamente): G1 (71,2%), G2 (85,6%) e G3 (81,2%). Em conclusão, os níveis de glicose salivar de indivíduos diabéticos demonstraram correlação com o aumento da carga de *Candida* spp., que pode propiciar o desenvolvimento de candidíase bucal.

Em 2016, Mohammadi et al. compararam as espécies e a quantidade de *Candida* na boca de pacientes sem e com diabetes *mellitus*. Foram selecionados 106 participantes distribuídos em dois grupos, sendo o grupo 1 (G1) constituído com 58 pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM2) e glicemia em jejum acima de 126 mg/dL, e o grupo 2 (G2) ou grupo controle com 48 indivíduos sem diabetes. As amostras foram coletadas com suabe e semeadas em placas de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar*. A incubação foi realizada a 25 °C por 72 h. As colônias puras foram semeadas em *CHROMagar Candida* e incubadas a 37 °C por 48 h. para o isolamento e a identificação presuntiva de *Candida* spp., que foi confirmada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP). Na análise estatística dos dados, os testes *Qui-quadrado* e *Mann-Whitney* foram realizados com auxílio do software *SPSS* versão 15.0. Dos pacientes do G1, 32 (55%) evidenciaram a presença de *Candida* spp., enquanto do G2, somente 17(35,5%). A maior frequência de isolados dos pacientes sem e com DM2 foi de *C. albicans*. Ainda, a carga fúngica média foi maior no G1 do que do G2 ($p < 0,0044$), em referência às amostras positivas

para *Candida* spp.. Os autores concluíram nesta pesquisa que *C. albicans* foi o isolado mais frequente e que a carga de *Candida* spp. foi maior em pacientes com DM2.

Em 2016, López-Pintor et al. realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de comparar as prevalências de xerostomia, fluxo salivar e hipossalivação em amostras de populações com e sem diabetes *mellitus* (DM). A pesquisa foi realizada de acordo com as diretrizes do PRISMA (principais itens para relatar revisões sistemáticas e meta-análises). Diante do exposto, três questões baseadas na estratégia PICO foram elaboradas, sendo elas: Os pacientes com DM têm maior prevalência de xerostomia do que os sem DM? O fluxo salivar nos pacientes com DM é menor em comparação aos pacientes sem DM? Os pacientes com DM têm maior prevalência de hipossalivação do que os sem DM? A busca dos artigos científicos foi realizada entre 1970 e 18 de janeiro de 2016 no portal *PubMed* e os bancos de dados utilizados foram: *MEDLINE*, *Scopus* e *Cochrane*. Ademais, uma pesquisa manual foi realizada com o intuito de adicionar possíveis estudos elegíveis como listas de referência de artigos de revisão e estudos relevantes. As palavras-chave empregadas foram diabetes, xerostomia, boca seca, hipossalivação e fluxo salivar. As pesquisas mostraram maior prevalência de xerostomia em pacientes com DM (12,5 a 53,5%) do que em pacientes sem DM (0 a 30%). Ademais, o fluxo salivar de pacientes com DM foi menor do que os sem DM. A revisão evidenciou uma variação considerável na prevalência de xerostomia e taxas de fluxo salivar em pacientes com DM em relação aos sem DM. Em conclusão, na maioria dos estudos avaliados, os pacientes com DM mostraram maior prevalência de xerostomia e menores taxas de fluxo salivar quando comparados aos sem DM. Entretanto, houve o predomínio de estudos com baixa qualidade científica, sendo necessárias novas investigações embasadas no rigor científico e metodológico da coleta de fluxo salivar, da avaliação e do diagnóstico de hipossalivação e xerostomia.

Goodson et al. (2017) avaliaram a concentração de glicose, carga e frequências relativas de 42 espécies bacterianas em amostras de saliva de

8.173 adolescentes do Kuwait com idade média de $10,00 \pm 0,67$ anos, por meio da análise de material genético. As amostras foram coletadas durante 182 visitas a 39 escolas do Kuwait entre 2 de outubro de 2011 e 15 de maio de 2012. Ademais, foram coletados os dados de identificação, altura, peso, pressão arterial, preferências alimentares, exame bucal, condicionamento físico e parâmetros relacionados ao sono. A saliva de todos os participantes foi coletada entre 8h30 e 9h30 e em condições de jejum. Cada participante bochechou e engoliu 15 mL de água antes da coleta da saliva. A microbiota salivar foi avaliada com auxílio da técnica de hibridação de *DNA-DNA checkerboard*, análise do material genômico. A carga bacteriana das amostras foi determinada pela comparação com os padrões de 10^5 e 10^6 de cada uma das sondas genéticas. A concentração de glicose salivar foi obtida pela mensuração indireta da glicose oxidase pela fluorescência de um corante (kit de ensaio colorimétrico / fluorimétrico de glicose # K606-100, BioVision, Inc., Mountain View, CA, EUA). Os resultados mostraram uma diminuição da carga bacteriana total na saliva com o aumento da concentração de glicose salivar. Em relação as cargas bacterianas por espécies, cerca de 88% ($n=37$) apresentaram diferenças ($p \leq 0,001$) entre as condições de alta e baixa concentração de glicose salivar. Além disso, as frequências relativas das concentrações de glicose foram diferentes em 62% das espécies bacterianas. A elevada concentração de glicose salivar foi associada à redução da carga bacteriana total e à alteração das frequências relativas das espécies bacterianas. Concluíram que a elevada concentração de glicose salivar em adolescentes estava associada a uma alteração na diversidade ou frequência da microbiota bucal. A hiperglicemia e/ou doença metabólica dos adolescentes pode ter causado a elevada concentração de glicose salivar e, conseqüentemente, a acidificação do ambiente bucal e alteração do seu microbioma.

Hosida et al. (2017) avaliaram as interações entre *C. albicans* e *C. glabrata* em biofilmes mistos no que tange o tipo de meio de cultura e as diferentes concentrações de glicose. Para cada *C. albicans* e *C. glabrata*, duas cepas ATCC e isoladas clinicamente foram empregadas para a formação de biofilme em placas de 96 poços, contendo 200µL de suspensão fúngica

padronizada (10^7 UFC/mL) sem ou com suplementação de glicose a 1 ou 5%. Ainda, aos biofilmes mistos foram adicionados 100 μ L de cada inóculo (2×10^7 UFC/mL de *C. albicans* + 2×10^7 UFC/mL de *C. glabrata*) em cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e o meio de cultura (suplementado com glicose a 0%, 1% ou 5%) foi renovado a cada 24 h. Após o período de formação do biofilme (48 h), o meio de cultura foi removido e os poços lavados uma vez com solução PBS para retirada das células fúngicas planctônicas. Em seguida, os biofilmes foram extraídos em 200 μ L de solução PBS para a realização das diluições decimais e semeadura em *Sabouraud Dextrose Agar* e *Chromagar Candida* para os biofilmes simples e mistos, respectivamente. Após a incubação a 37°C por 48 h, os resultados foram expressos em função da área dos poços e em escala logarítmica (log UFC/cm²). Todos os ensaios de biofilme foram realizados em triplicado e em três ocasiões distintas. Os dados foram analisados por ANOVA de três fatores e teste *post hoc* de *Turkey HSD* com nível de significância de 5%. Em relação à carga de *Candida* spp., a suplementação de glicose apresentou influência significativa apenas na associação das duas cepas clínicas, enquanto nas padrão não. Outrossim, para os biofilmes mistos, a carga de *C. glabrata* foi maior do que a de *C. albicans*, independentemente, da suplementação de glicose e do meio de cultura. Em síntese, o tipo de cepa, o meio de cultura e a suplementação ou não de glicose influenciaram as interações entre *C. albicans* e *C. glabrata*.

Em 2019, Bezerra et al., avaliaram o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre a formação do biofilme de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Os biofilmes foram formados sobre discos de resina acrílica à base de polimetilmetacrilato (PMMA) e, em seguida, foram submetidos a formação de uma película adquirida de saliva artificial a 37°C por 1 h, em aerobiose. O biofilme foi formado durante 72 h e submetido a diferentes concentrações de glicose: sem glicose (G0: controle), 100 mmol / L (G100) e 300 mmol / L (G300). No final do período de incubação de 72 h, as amostras (n = 8 / grupo) foram transferidas para tubos contendo 1 mL de solução salina. Os tubos foram então agitados em agitador de tubos por 60 s para obtenção das suspensões fúngicas dos biofilmes. Alíquotas de 0,2 mL destas suspensões foram diluídas

em série e semeadas em triplicata nas superfícies de placas com *Sabouraud Dextrose Agar* pela técnica de gota (10 µL). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O conteúdo restante da suspensão fúngica (0,8 mL) foi utilizado para a quantificação da matriz de polissacarídeos extracelulares. Quanto à viabilidade do biofilme, G0 diferiu de G100 e G300 ($p<0,05$), entretanto não houve diferença entre G100 e G300 ($p>0,05$). Os níveis de polissacarídeos insolúveis foram maiores do que dos solúveis. Ainda, os níveis de polissacarídeos extracelulares insolúveis do G300 foram maiores do que do G0 e G100. Em conclusão, houve uma relação de aumento de disponibilidade de glicose com a viabilidade e a matriz extracelular dos biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*.

Em 2019, Chouhan et al. investigaram o nível de glicose salivar em indivíduos diabéticos e saudáveis. Além disso, determinaram as diferentes espécies de *Candida*, bem com a quantificação delas. A amostra foi de 80 indivíduos subdivididos em três grupos: grupo 1 (G1) com 30 pacientes diabéticos com glicemia não controlada e uso exclusivo de medicamentos para o controle do diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2); grupo 2 (G2) com 30 pacientes com DM2 e uso exclusivo de medicamentos para o controle do DM2; e grupo 3 (G3) com 20 indivíduos saudáveis e sem diabetes *mellitus* com níveis de glicemia dentro dos limites de normalidade. As amostras de saliva não estimulada foram coletadas de todos os participantes por pelo menos 5 min, entre 8 e 11 h a fim de se evitar variações circadianas. O nível de glicose salivar foi medido pelo método da glicose oxidase-peroxidase. Além disso, a carga de *Candida* spp. (UFC/mL) foi determinada, por meio da técnica de semeadura por estria em quatro quadrantes de placas de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar* suplementado com cloranfenicol, após incubação a 37 °C por 24 h. A identificação presuntiva das *Candida* spp. foi realizada em CHROMagar *Candida*. Os níveis médios de glicose salivar foram mais elevados no G1 ($21,93 \pm 4,53$ mg/dL), seguidos pelo G2 ($4,73 \pm 2,02$ mg/dL) e G3 ($1,38 \pm 0,516$ mg/dL) $p<0,05$. A média de UFC total de *Candida* foi maior no G1 (62963 UFC / ml) do que no G2 (12.368 UFC / ml) e no G3 (29.000 UFC / ml) com – $p<0,05$. No G1 houve crescimento de *Candida* spp. em 27 (90%) amostras, sendo que as mais frequentes foram *C. glabrata* (56,6%), *C. albicans* (23,3%) e *C.*

tropicalis (10%). No G2 foram isoladas *Candida* spp. em 19 (63,3%) amostras, sendo as mais frequentes: *C. glabrata* (40%) e *C. albicans* (20%). Por fim, no G3, quatro amostras apresentaram presença de *C. glabrata*. O teste de coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado entre os grupos com relação ao nível de glicose salivar e a carga de *Candida* spp. e, somente para o G3 foi negativa a correlação ($r = 0,637$; $p = 0,0003$). Em conclusão os pacientes diabéticos com estado metabólico não controlado mostraram os maiores níveis de glicose salivar e carga de *Candida* spp. Ademais, as cepas mais isoladas foram *C. glabrata* seguida por *C. albicans*.

Rodrigues, Rodrigues e Henriques (2019) determinaram a prevalência de espécies de *Candida* e estudaram fatores associados à colonização bucal em pacientes com diabetes *mellitus* tipo II (DM2). Foram selecionados 107 participantes com diagnóstico de DM2 e em tratamento com idades igual ou maior que 40 anos. Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a taxa de hemoglobina glicosilada (HbA1c), com controle glicêmico ($n = 52$) com a taxa menor ou igual 7% e sem controle glicêmico ($n = 55$) com valores $> 7\%$. Foram coletados dos pacientes amostras de sangue, para determinação da HbA1c, de saliva estimulada para verificação do pH e do fluxo salivar, bem como do bochecho para a quantificação de espécies de *Candida* e de outras leveduras. *CHROMagar Candida* foi empregado para a identificação presumida e a determinação da carga fúngica, após a incubação a 30°C por 48h. A identificação das leveduras foi realizada com auxílio de API 20C Aux, testes fenotípicos (produção de tubo germinativo e clamidósporo no ágar fubá). Também foram feitos estudos de crescimento a 42°C e 45°C no *Sabouraud Dextrose Agar*, adicionando cloreto de sódio a 6,5%. Cepas como *C. dubliniensis* foram identificadas com esses procedimentos e confirmadas com API 20C Aux. Foi mostrado crescimento de leveduras em 36/52 (69,2%) pacientes controlados e 44/55 (80%) em não controlados com $p = 0,2$ para a comparação do controle glicêmico e a presença de leveduras. A prevalência na população estudada foi 71% (76/107) para *Candida* sp. e de 16,8% (18/107) de outras espécies fúngicas. Os resultados da distribuição de *C. albicans* mostraram que, dos 37 pacientes com somente *C. albicans*, 21 eram pacientes controlados e 16 não controlados, enquanto os 43 pacientes com outras

leveduras ou em associação a *C. albicans*, 15 eram controlados e 28 não. Essa diferença teve $p = 0,049$. Os indivíduos colonizados por leveduras foram classificados de acordo com a contagem de UFC em três grupos: indivíduos com contagem ≤ 50 UFC/mL = 45 (56,2%), com a contagem entre 51 a 400 UFC/mL $n=24$ (30%) e 11 (13,8%) tinham uma contagem >400 UFC/mL. O valor máximo foi de 3397,5 UFC/ml e a média foi de 182,2 UFC/mL. Os autores mostraram uma elevada frequência de colonização por *Candida* em pacientes com DM2 sem controle glicêmico, entretanto as amostras mostraram maior diversidade de espécies. Ressalta-se que as elevadas cargas de *Candida* spp. isoladas de pacientes com e sem candidíase bucal não permitiu distinguir entre colonização e doença.

O objetivo da pesquisa de Saeb et al. (2019) foi comparar a carga e diversidade da microbiota bucal de normoglicêmicos, tolerantes à glicose e diabéticos. Foram selecionados 44 de três coortes diferentes sendo 19 normoglicêmicos (grupo controle), 10 (grupo pré-diabético) e 15 com diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2). Os participantes eram cidadãos saudáveis de ambos os sexos e tinham idade entre 40 e 55 anos. Os critérios da *American Diabetes Association* (ADA) foram empregados para caracterizar os grupos. Os com DM2 foram selecionados dentre os pacientes atendidos nas clínicas do Centro de Diabetes da Universidade de *King Saud* e diagnosticados de acordo com os critérios da ADA. O tratamento desses pacientes foi realizado somente com medicamentos hipoglicêmicos bucais. Todos os indivíduos foram submetidos à avaliação da saúde bucal geral e de doenças periodontais por três examinadores diferentes. A doença periodontal foi avaliada por meio da determinação da profundidade de sondagem da bolsa periodontal e da perda de inserção clínica dos dentes. Amostras de saliva foram coletadas em tubos da Omingene do kit OM501 (Ontário, Canadá) para análise do material genético microbiano, segundo as instruções do fabricante. Por pelo menos 60min antes da coleta das amostras, os participantes da pesquisa foram instruídos para não higienizar a boca, não comer, não beber e não fumar. Após a purificação das amostras, a análise molecular de saliva foi realizada para identificar e quantificar a diversidade microbiana bucal. De um modo geral, 551 unidades taxonômicas operacionais foram identificadas. A partir da análise

desses resultados foi observada uma redução na diversidade das espécies microbianas presentes nos grupos tolerantes à glicose (n=412) e com DM2 (n=372) em comparação com o grupo normoglicêmico (n=502) com $p = 0,05$. Ainda, isso foi associado a um padrão semelhante de redução da diversidade biológica entre os três grupos. Além disso, a diversidade filogenética microbiana no grupo normoglicêmico foi superior ao do grupo com DM2. Entretanto, o grupo com DM2 demonstrou os maiores valores de uniformidade e microbiota patogênica. Os autores concluíram que houve uma redução na diversidade biológica e filogenética presente na microbiota bucal dos indivíduos com DM2 e TG em comparação com o grupo normoglicêmico. Por outro lado, houve uma associação no aumento da microbiota patogênica bucal em indivíduos com hiperglicemia.

Em 2019, Babatzia et al. avaliaram a saúde bucal de pessoas jovens com diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) controlado e não controlado e compararam os resultados com os de pessoas saudáveis. Para esse estudo foi selecionada uma população de 144 pessoas, independentemente, do sexo, com idade entre 6 e 15 anos. O grupo com DM1 foi constituído de 74, sendo que 31 eram meninos e 43 meninas, com tempo de diagnóstico do DM1 de $4,21 \pm 2,93$ anos. Além disso, esse grupo foi agrupado em grupos com pacientes com bom e mal controle glicêmico, de acordo com o nível da hemoglobina glicosilada (HbA1c), n=35 (13 meninos e 22 meninas) e n=39 (18 meninos e 21 meninas), respectivamente. O grupo controle contou com 70 pacientes. Todos preencheram um questionário, que forneceu informações sobre os perfis: socioeconômico, de higiene bucal, de hábitos alimentares, bem como da frequência de visita ao dentista. Foram registrados os índices de biofilme dentário, inflamação gengival, cálculo dentário e cárie dentária, avaliando o índice de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPOD). Ainda foi realizada a detecção e a determinação dos níveis de *C. albicans* e *Streptococcus mutans*, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, a partir da coleta de saliva estimulada. Níveis diferentes de biofilme dentário foram reportados entre os grupos de estudo ($p = 0,024$): os jovens com pior controle glicêmico apresentaram maior quantidade de biofilme dentário do que os jovens dos outros dois grupos. Os índices de retração

gingival, de cálculo dentário e de CPOD não foram diferentes entre os grupos ($p>0,05$). Ademais, os níveis de *C. albicans* não foram diferentes entre os grupos, mas o grupo com baixo controle glicêmico mostrou uma frequência elevada de isolamento desse micro-organismo. *Streptococcus mutans* foi isolado da boca de 96 (67%) dos 144. Ainda, foi reportada diferença no nível de *S. mutans* entre o grupo com controle glicêmico deficiente e o grupo controle saudável ($p = 0,032$). Em suma, os jovens com DM1 apresentaram menor nível de higiene bucal e, por conseguinte, um risco maior no desenvolvimento de doenças bucais, principalmente, quando o distúrbio metabólico não é controlado. No entanto, fatores externos à boca também podem ter relevância considerável no início e na progressão das doenças bucais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos, por meio de técnica de biologia molecular;
- ✓ Determinar *in vitro* a carga fúngica de biofilmes formados por cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose a 2 e 10 mg/mL, pelo número de unidades formadoras de colônia por mililitro;
- ✓ Mensurar *in vitro* a matéria seca em gramas de biofilmes formados por cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose a 2 e 10 mg/mL;
- ✓ Analisar *in vitro* a taxa de crescimento de biofilme por cepas de *Candida albicans* e *Candida glabrata* provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose a 2 e 10 mg/mL com auxílio de microscopia de fluorescência.

4 MATERIAL E MÉTODOS

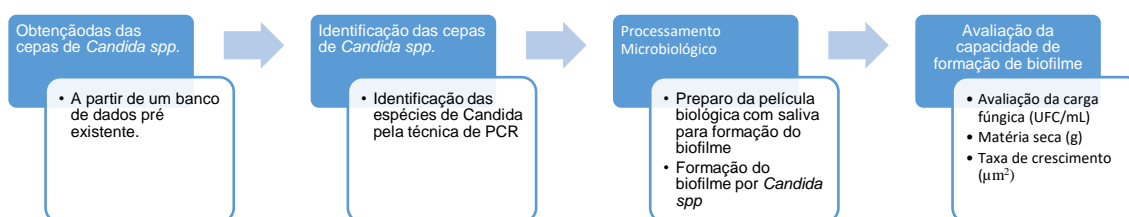
4.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi realizada de acordo com as recomendações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que reúne os aspectos éticos em pesquisas que envolvem seres humanos (BRASIL, 2012).

O projeto de pesquisa foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e só teve início após a sua aprovação (CAAE: 29695720.0.0000.5419; Parecer de aprovação: 4.008.627 – Apêndice A).

Em relação ao patrimônio genético das cepas clínicas, as instruções da Lei no 13.123/2015 foram cumpridas.

4.2 Delineamento da Pesquisa



4.3 Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido em 3 etapas: As etapas um e dois, de obtenção e identificação das cepas de *Candida* spp., respectivamente, foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.

A etapa três, processamento microbiológico e avaliação da capacidade de formação de biofilme foi conduzida no Laboratório do Núcleo de Estudos de Prevenção e Controle de Infecção nos Serviços de Saúde (NEPECISS) da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP e na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. A avaliação da taxa de biofilme por microscopia de fluorescência com o sistema de imagem *Operetta CLS High Content* foi realizada na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

4.4 Procedimento para a coleta de dados

4.4.1 Seleção amostral

Foi realizado um estudo piloto utilizando 4 cepas de *Candida* spp. sendo: duas cepas padrão ATCC (*C. albicans* – 10231 e *C. glabrata* - 2001) e duas clínicas (*C. albicans* e *C. glabrata*). A partir do estudo piloto foi decidido utilizar as cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* disponíveis no banco de amostras do Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, que haviam sido identificadas presuntivamente em meio de cultura seletivo diferencial *CHROMagar Candida*.

Assim, a seleção amostral, por conveniência, foi definida em 48 cepas de *Candida* spp., sendo: 32 de *C. albicans* (16 de diabéticos e 16 de não diabéticos) e 16 de *C. glabrata* (9 de diabéticos e 7 de não diabéticos).

4.4.2 Identificação das cepas de *Candida* spp.

A identificação da espécie foi confirmada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR).

4.4.2.1 Identificação das espécies de *Candida* pela técnica de PCR

Para a identificação das espécies de *Candida* pela técnica de PCR foi realizada a extração do DNA de todas as amostras selecionadas a partir do banco de dados.

Em seguida foi feita a amplificação dos genes pelos *primers* específicos e a digestão com enzimas de restrição, para comparação do polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP).

As amostras não identificadas foram descartadas. A comparação realizada teve base na metodologia descrita na pesquisa de Cornet et al. (2011).

4.4.2.2 Extração do DNA das leveduras

Cada amostra foi removida do freezer -80 °C e descongelada à temperatura ambiente. Com auxílio de uma alça de plástico descartável esterilizada (Ø 2 mm), uma alíquota da suspensão foi semeada em estrias múltiplas em placa de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar* (BD, New Jersey, Estados Unidos). Após incubação a 37 °C por 24 h, uma colônia foi transferida para um tubo de ensaio com 10 mL de *Sabouraud Dextrose Broth* (HiMedia, Mumbai, Índia). Decorrido o mesmo processo de incubação anterior, os tubos foram submetidos à centrifugação a 3200 *g* por 5 min. O *pellet* obtido foi ressuscitado em 500 µL de tampão de lise [200 mM de Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Saint. Lois, Missouri, EUA); 250 mM de NaCl (Sigma-Aldrich); 25 mM de EDTA (Sigma-Aldrich) a 0,5 % de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) – (Sigma-Aldrich)], com pH = 8,5 e transferido para um microtubo de 2 mL. Ainda, a esse tubo foi adicionado 500 µL de pérolas de vidro, de 425 - 600 µm de diâmetros, lavadas previamente com ácido clorídrico (Sigma-Aldrich). As amostras foram homogeneizadas vigorosamente em um agitador de tubos por 10 min. Todo o lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e a ele adicionado o mesmo volume (500 µL) de fenol-clorofórmio (1:1) (Sigma-Aldrich). Em seguida, os tubos foram, novamente, agitados, em agitador de tubos, por 10 min e depois, centrifugados a 20000 *g* por 10 min. A fase aquosa obtida desta centrifugação (interfase superior) foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e a ela adicionado 1 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich), ocorrendo a precipitação do DNA. Depois, foi realizada uma centrifugação a 20000 *g* por 5 min. O sobrenadante obtido foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µL de etanol a 70% (Sigma-Aldrich) gelado e submetido à centrifugação a 2000 *g* por 5 min. O *pellet* obtido foi mantido à temperatura ambiente para secagem. As amostras foram ressuscitadas em 50 µL de água ultrapura e submetidas a um tratamento com 20 µg/mL de RNase (Sigma-Aldrich) em banho-maria a 37 °C por 30 min. Após o tratamento, 1 µL de cada amostra foi diluído em 49 µL de água e quantificada em espectrofotômetro com leituras a 260 e 280 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia). A medida da absorbância feita a 260 nm determinou a concentração de DNA na amostra e a razão 260/280 determinou a pureza da amostra. A integridade do DNA foi avaliada

aplicando-se as amostras em gel de agarose (Agargen, Laboratórios Espanagar, Espanha). O gel foi preparado a 1% pela solidificação da agarose fundida em tampão TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM; pH = 8,0). Em seguida, o gel foi levado a cuba de eletroforese (Major Science, Saratoga, Califórnia, EUA) 10 × 10 cm com tampão TE e em cada poço do gel foi inserido uma mistura de 1 µL de tampão de carregamento (Invitrogen, Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), 1 µL de corante Gel Red (Biotium Inc., Hayward, Califórnia, EUA) diluído 500x e 2 µL da amostra. A corrida foi realizada a 100 V por 30 min. O gel foi visualizado e analisado em fotodocumentador E-BOX VX5 (Fisher Biotec, Perth, Austrália Ocidental, Austrália) e após a confirmação da integridade, as amostras foram estocadas a -20 °C.

4.4.2.3 Seleção do Primer e amplificação da PCR

A seleção dos *primers* teve como base a pesquisa de Cornet et al. (2011). Sendo assim, utilizou-se um par de *primers* (Sigma-Aldrich) de amplificação parcial do gene IGS, 5'-TTAACTACAGTTGATCGGAC-3' (*forward*) e 5'-CTTAATCTTTGAGACAAGC-3' (*reverse*) para as espécies de *C. albicans* e *C. glabrata*. Para amplificação, uma mistura contendo 10 pmol de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 5 nmol de dNTP (Qiagen, Hilden, Renânia do Norte-Vestfália, Alemanha), 1,5 U da enzima Taq polimerase (Sigma-Aldrich), 10% de tampão da Taq polimerase (Sigma-Aldrich) e 100 ng de DNA, em um volume final de 25 µL, foi submetida a ciclagem térmica. A ciclagem foi realizada em termociclador Amplitem (Thermal Cyclers, Madison, Wisconsin, EUA) com desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida por 30 ciclos a 94 °C por 30 s, a 48°C por 30 s, a 72 °C por 2 min e 30 s e um passo de elongação final a 72 °C por 5 min.

Após a amplificação, uma alíquota de 4 µL do produto da PCR foi acondicionada em gel de agarose 1% a 100 V por 40 min para confirmação. Em seguida o produto de PCR confirmado foi submetido à digestão por meio de enzimas de restrição, com o objetivo de obter o polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição necessários para a identificação das espécies de *Candida*. Para isso, a enzima Nla-III (New England BioLabs,

Hitchin, Hertfordshire, Inglaterra) foi utilizada. Todas as digestões foram realizadas com a enzima Nla-III e comparadas às cepas ATCC. Para a reação de digestão utilizou-se 10 µL de produto de PCR, 1,5 U de uma da enzima (Nla-III), 2 µL do tampão em um volume final de 20 µL. A mistura foi então levada ao termociclador a 37°C por 90 min, seguido e inativação da enzima a 65 °C por 20 min. Os subfragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 2%, conforme descrição anterior, a 80 V por 80 min, para verificar a separação das bandas.

Cada matriz de gel apresentou amostras das duas cepas de referência (ATCC) e marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen). A análise de cada matriz de gel foi realizada por meio de comparação visual dos padrões de bandas das cepas que foram identificadas com as cepas de referência.

4.5 Preparação da saliva

4.5.1 Critérios de inclusão e exclusão para doação de saliva

Os critérios de inclusão para a participação no estudo foram pessoas com idade acima de 18 anos, do sexo masculino, sem quadro de diabetes *mellitus*, com glicemia em jejum entre 70 e 99 mg/dL. Critérios de exclusão incluíram pessoas com glicemia em jejum acima de 99 mg/dL na hora da coleta, pessoas com algum sinal de infecção bucal e quadro de diabetes *mellitus*.

4.5.2 Coleta de saliva

Para a coleta da saliva foram selecionados por conveniência cinco alunos de Pós-Graduação do NEPECISS. Os participantes mastigaram um filme (Parafilm M ®, Bemis Corporate, Wisconsin, EUA) devidamente higienizado com álcool etílico a 70% (p/v). Após 30 s, a saliva formada foi deglutida e cerca de 30 mL de saliva foram coletados e mantidos em gelo. O volume de saliva coletada variou de acordo com o voluntário. Ao final da coleta foi obtido cerca de 1000 mL de saliva.

4.5.3 Preparo da película adquirida com saliva

A saliva foi dividida em tubos de 50 mL e centrifugada a 7100 g durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido em ambiente asséptico e transferido para um frasco de 1000 mL para formação de um *pool* de saliva. Este *pool* foi filtrado em sistema de filtração com membrana de acetato de celulose de 0,22 µm. Por ser um fluido biológico rico em macromoléculas, os poros da membrana saturaram rapidamente. Por isso, foi utilizado de 3 a 4 filtros de capacidade para 500 mL ou 2 filtros com capacidade para 1000 mL para a filtragem (Kasvi, Brasil) todas das amostras. Para acelerar o processo, uma bomba peristáltica para formação de vácuo foi empregada.

4.6. Formação de biofilme por *Candida* spp.

Para formação do biofilme, inicialmente, as cepas estocadas a -80 °C foram descongeladas e cultivadas conforme protocolo descrito na seção 4.3.2.2. Após incubação a 37 °C por 24 h de em *Sabouraud Dextrose Broth*, os tubos foram centrifugados a 4200 g à 4°C e o precipitado celular foi ressuscitado em 5 mL de solução PBS. A padronização da concentração celular foi realizada por meio da contagem de células na câmara de *Neubauer* (HBG, Gießen, Alemanha). Previamente ao preparo do inóculo fúngico, uma placa de poliestireno de 48 poços (Kasvi, Brasil) recebeu tratamento com 400 µL saliva e foi mantida em estufa a 37 °C por 24 h para formação da película adquirida. Após a padronização da concentração celular e o tratamento da placa com saliva, cada poço recebeu 400 µL de meio de cultura *Sabouraud Dextrose Broth* inoculado a 10⁶ UFC/mL e suplementado com diferentes concentrações de glicose. Foram três grupos experimentais: um sem adição de glicose, um com glicose a 2 mg/mL e outro com glicose a 10 mg/mL (Hosida et al, 2017). Essas concentrações foram utilizadas para cada espécie de *Candida* e para cada grupo de paciente ao qual a *Candida* foi obtida, seja de paciente sem ou com diabetes. A seguir, as placas foram acondicionadas em estufa de agitação orbital (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 37 °C por 48 h e 75 rpm para o desenvolvimento do biofilme.

4.7 Avaliação da carga fúngica (UFC/mL) do biofilme

O meio de cultura presente nos poços foi cuidadosamente retirado com ajuda da pipeta e os poços contendo o biofilme foram lavados com 1000 μ L de solução PBS. A seguir foram adicionados 1000 μ L de solução PBS e o biofilme foi removido por sucessivas pipetagens e fricção com a ponta da ponteira. A seguir, a suspensão foi diluída na razão 1:1000 com 1 μ L da amostra e 999 μ L de solução PBS. Subsequentes diluições seriadas (10^{-4} a 10^{-6}) foram realizadas e 10 μ L de cada diluição (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) foram semeadas, em duplicata, em forma de gota em 4 regiões de placas de Petri com *Sabouraud Dextrose Agar*. As placas então foram incubadas a 37 °C por 24 h e depois foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os valores foram encontrados em UFC/mL (UFC/mL = contagem do número de unidades formadoras de colônia $\times 10^{\wedge}$ a diluição onde foi contada) e transformada em log UFC/mL. Este procedimento foi realizado em triplicata em 3 momentos distintos. Assim, para *C. albicans*, um total de 32 amostras foram analisadas resultando em 288 cultivos, e para *C. glabrata* 16 amostras foram analisadas, resultando em 144 cultivos. Ao final da semeadura cada amostra foi armazenada em tubo esterilizado de 15 mL (Kasvi, Brasil) a -20°C, a fim de manter preservada as amostras para uso nos procedimentos experimentais subsequentes que seriam realizados.

4.8 Determinação da matéria seca do biofilme

As amostras da etapa anterior foram descongeladas e transferidas para tubos de 50 mL (Kasvi, Brasil) previamente pesados. Devido à limitação de amostras no liofilizador, nessa etapa os cultivos de cada amostra [$n = 9$ (triplicata \times 3 momentos distintos)] foram reunidos formando um *pool*, o que resultou em 32 amostras de *C. albicans* e 16 de *C. glabrata*. Em seguida os tubos já com as amostras foram levados para um processo de liofilização onde nos tubos contendo as amostras ficaria apenas o material orgânico uma vez que o processo de liofilização retira toda água presente. Depois da liofilização os tubos foram novamente pesados e a partir da diferença entre o peso dos tubos foi calculado a matéria seca do biofilme.

4.9 Análise da taxa de crescimento de biofilme por microscopia de fluorescência

Outro crescimento de biofilme foi conduzido sob condições assépticas para avaliação da taxa de crescimento de biofilme por microscopia de fluorescência. Toda a metodologia de preparo do inóculo e formação da película adquirida seguiram os critérios descritos no item 4.5. Em seguida, 200 μ L de *Saubouraud Dextrose Broth* com diferentes concentrações de glicose contendo suspensão padronizada de leveduras (10^6 UFC / mL) foram cultivados em triplicata em placas pretas de 96 poços com fundo de vidro plano (Corning Inc., Corning, Nova York, EUA). As placas escuras são indicadas para ensaios envolvendo fluorescência, a fim de evitar interferência da coloração de um poço nos poços adjacentes. Para evitar a secagem excessiva, os poços externos foram preenchidos com 200 μ L de água estéril. As placas foram incubadas a 37°C, a 75 rpm por 48h, em uma incubadora de agitação orbital. Posteriormente, a suspensão planctônica foi cuidadosamente removida evitando-se tocar no fundo dos poços. Os poços foram lavados com solução PBS e corados por 15 min, protegidos da luz, com o Kit de Viabilidade de Biofilme LIVE / DEAD™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente, as placas foram digitalizadas com o sistema de imagem *Operetta CLS High Content* (PerkinElmer, Dinamarca) com ampliação de 40 \times com 10 campos de visão por poço, totalizando 30 imagens / amostra. Todas as imagens foram obtidas aleatoriamente, na mesma localização usando os mesmos parâmetros de contraste e brilho. A análise dos dados foi realizada pela mesma configuração de parâmetros para todas as amostras. Para avaliar as taxas de crescimento de biofilme, a área média recoberta por biofilme foi registrada μm^2 .

4.10 Análise dos dados

A digitação foi realizada em um banco de dados no aplicativo *Microsoft Excel®* mediante dupla entrada seguida por validação devido a grande quantidade de dados afim de não se ter erros de digitação. Em seguida, os dados foram exportados para o software *Statistical Package for the Social*

Sciences (SPSS), versão 20.0 para proceder-se às análises estatísticas. O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi utilizado para verificar a distribuição dos dados. Para a análise descritiva, as variáveis quantitativas foram apresentadas através de medidas de tendência central (mediana e intervalo interquartil 25p – 75p). O teste *U Mann-Whitney* para amostras independentes foi utilizado para verificar diferenças entre diabéticos e não diabéticos. O teste de *Kruskal-Wallis one way* foi utilizado para verificar diferenças entre as condições de suplementação. O nível de significância estatística adotado foi de $\alpha=5\%$.

5 RESULTADOS

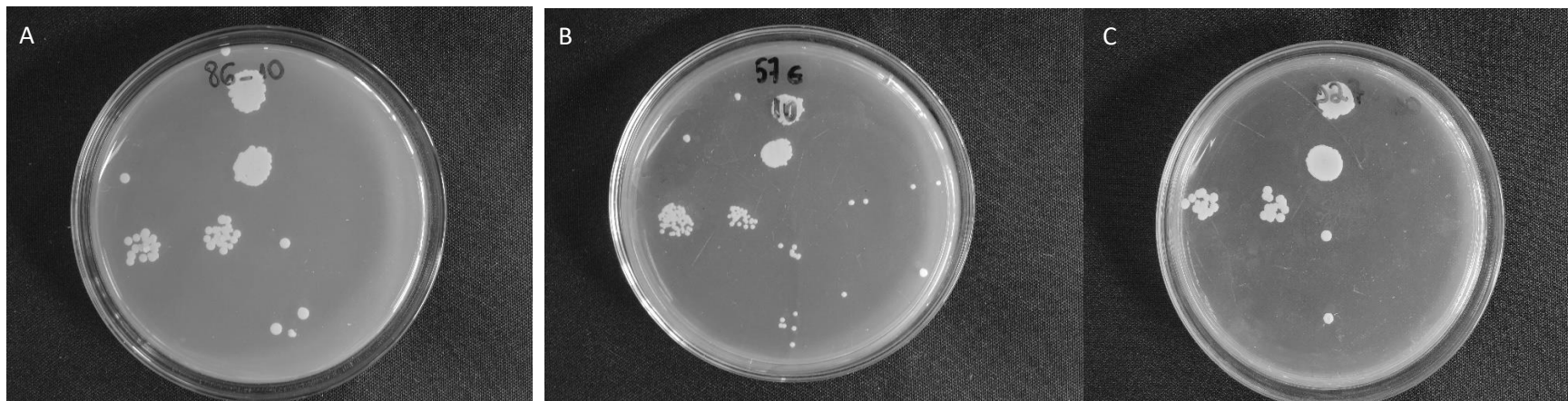
Das 48 cepas de *Candida* spp. analisadas pela técnica de PCR, 32 foram identificadas como *C. albicans* provenientes de 16 pacientes diabéticos e de 16 não diabéticos. Ainda, 16 foram identificadas como *C. glabrata* provenientes de 9 pacientes diabéticos e de 7 não diabéticos.

5.1 Avaliação da carga fúngica (UFC/mL) do biofilme

Um total de 432 cultivos (Figura 1), sendo: *C. albicans* de diabéticos (n = 144), *C. albicans* de não diabéticos (n = 144), *C. glabrata* de diabéticos (n = 81) e *C. glabrata* de não diabéticos (n = 63) foram empregados na avaliação desta variável.

Os valores medianos da carga fúngica referentes à formação do biofilme das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, cultivadas em diferentes concentrações de glicose estão apresentados nas Tabelas 1 e 2 (*C. albicans*), 3 e 4 (*C. glabrata*).

Figura 1. Colônias de *Candida* spp.



Legenda: A= *C. Glabrata* de diabético cultivada á 10mg/mL, B= *C. Glabrata* de não diabético cultivada à 10mg/mL, C= *C. Glabrata* de diabético cultivada à 10mg/mL

Fonte: Próprio autor.

Tabela 1. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de *Candida albicans* entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura sem suplementação e com diferentes suplementações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Concentrações de glicose	Diabéticos (n=144)					Não Diabéticos (n=144)					Teste U de Mann - Whitney	
	Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Valor z	p
		25p	75p	Valor	p		25p	75p	Valor	p		
Sem Suplementação	8,439	8,114	11,114	0,805	< 0,001	7,929	7,720	8,130	0,913	< 0,001	-9,953	< 0,001*
Suplementação 2mg/mL	8,352	7,903	10,676	0,838	< 0,001	8,011	7,796	8,317	0,794	< 0,001	-4,752	< 0,001*
Suplementação 10 mg/mL	8,070	7,813	9,197	0,779	< 0,001	7,929	7,740	8,190	0,779	< 0,001	-3,287	0,001*

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75, Valor z= resultado do Teste U Mann-Whitney; *Significância estatística quando $p < 0,05$.

Tabela 2. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de *Candida albicans* intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura sem suplementação e com diferentes suplementações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Grupo	Sem Suplementação					Suplementação 2 mg/mL					Suplementação 10 mg/mL				
	Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis	
		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p
Diabético (n=144)	8,439	8,114	11,114	34,413	0,580	8,352	7,903	10,676	43,559	0,009 ^b	8,070	7,813	9,197	77,972	<0,001 ^c
Não Diabético (n=144)	7,929	7,720	8,130	-46,212	0,005 ^a	8,011	7,796	8,317	27,532	0,181	7,929	7,740	8,190	-18,580	0,619

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro, Teste de Kruskal-Wallis oneway para comparação entre as condições de suplementação; ^adiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre sem suplementação e suplementação 2 mg/mL; ^bdiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre suplementação de 2 mg/mL e suplementação de 10 mg/mL; ^cdiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre suplementação de 10 mg/mL e sem suplementação; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75.

Tabela 3. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de *Candida glabrata* entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura sem suplementação e com diferentes suplementações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Concentrações de glicose	Diabéticos (n = 81)					Não Diabéticos (n = 63)					Teste U de Mann - Whitney	
	Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Valor z	p
		25p	75p	Valor	p		25p	75p	Valor	p		
Sem Suplementação	8,623	8,322	11,491	0,795	< 0,001	8,423	8,255	9,948	0,801	< 0,001	-2,938	0,003*
Suplementação 2 mg/mL	8,498	8,273	10,788	0,827	< 0,001	8,519	8,243	9,903	0,839	< 0,001	-1,154	0,249
Suplementação 10 mg/mL	8,407	8,187	9,643	0,742	< 0,001	8,455	8,114	10,025	0,830	< 0,001	-0,179	0,858

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; *Significância estatística quando $p < 0,05$; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75; Valor z= resultado do Teste U Mann-Whitney.

Tabela 4. Comparação dos valores de Unidades Formadoras de Colônia ($\text{Log}_{10}^{\text{UFC/mL}}$) de cepas de *Candida glabrata* intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura sem suplementação e com diferentes suplementações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Grupo	Sem Suplementação					Suplementação 2 mg/mL					Suplementação 10 mg/mL				
	Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis	
		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p
Diabético (n = 81)	8,623	8,322	11,491	11,173	0,935	8,498	8,273	10,788	19,765	0,220	8,407	8,187	9,643	30,938	0,015 ^a
Não Diabético (n = 63)	8,423	8,255	9,948	-	-	8,519	8,243	9,903	-	-	8,455	8,114	10,025	-	-

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; ^adiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre sem suplementação e suplementação 10 mg/mL, 25p= percentil 25; 75p= percentil 75.

As cepas de *C. albicans* de diabéticos cultivadas em meio sem suplementação de glicose apresentaram crescimento mediano estatisticamente significativo ($p < 0,001$) superior ($8,439 \log_{10}^{UFC/mL}$) em comparação a cepas de não diabéticos ($7,929 \log_{10}^{UFC/mL}$).

Em relação as cepas cultivadas em meio suplementado a 2 mg/mL de diabéticos houve crescimento mediano estatisticamente significativo ($p < 0,001$) superior ($8,352 \log_{10}^{UFC/mL}$) em comparação a cepas de não diabéticos ($8,011 \log_{10}^{UFC/mL}$).

Os resultados mostraram um crescimento mediano superior ($8,070 \log_{10}^{UFC/mL}$) das cepas cultivadas em 10 mg/mL e obtidas de diabéticos em comparação com as cepas de não diabéticos ($7,929 \log_{10}^{UFC/mL}$), com valor estatístico significativo ($p < 0,001$).

A comparação entre as suplementações nos diabéticos mostrou que o crescimento no grupo sem suplementação ($8,439 \log_{10}^{UFC/mL}$) foi estatisticamente semelhante ao grupo suplementação 2 mg/mL ($8,352 \log_{10}^{UFC/mL}$). O grupo com suplementação 10 mg/mL apresentou crescimento inferior ($8,070 \log_{10}^{UFC/mL}$) às demais condições de suplementação (sem suplementação: $p < 0,001$; 2 mg/mL: $p = 0,009$).

Para os não diabéticos o maior crescimento foi no cultivo com suplementação a 2 mg/mL ($8,011 \log_{10}^{UFC/mL}$) o qual foi estatisticamente semelhante ao grupo com suplementação a 10 mg/mL ($p = 0,619$) e superior ao grupo sem suplementação ($p = 0,005$).

Para as cepas de *C. glabrata*, o maior crescimento mediano foi encontrado nas cepas cultivadas sem suplementação de glicose ($8,623 \log_{10}^{UFC/mL}$) oriundas de diabéticos em comparação com as cepas de não diabéticos ($8,423 \log_{10}^{UFC/mL}$) com valor estatisticamente significativo ($p = 0,003$). A suplementação a 2 mg/mL e 10 mg/mL não promoveu diferenças no crescimento de *C. glabrata* oriunda de diabéticos e não diabéticos.

Para as cepas de *C. glabrata*, a comparação entre as suplementações apresentou diferenças somente nos diabéticos, onde o crescimento sem suplementação foi superior ao cultivo com suplementação a 10 mg/mL ($p =$

0,015). Para os não diabéticos, não houve diferenças entre as condições de suplementação.

5.2 Determinação da matéria seca do biofilme

Os cultivos referentes a 48 cepas de *Candida* spp., sendo: *C. albicans* de diabéticos (n = 16), *C. albicans* de não diabéticos (n = 16), *C. glabrata* de diabéticos (n = 9) e *C. glabrata* de não diabéticos (n = 7), foram empregadas na avaliação desta variável.

As Tabelas 5, 6, 7 e 8 mostram os resultados da formação de biofilme, das cepas *C. albicans* (5 e 6) e *C. glabrata* (7 e 8) provenientes de diabéticos e não diabéticos, cultivadas em diferentes concentrações de glicose, na forma de matéria seca.

Tabela 5. Comparação do crescimento de cepas de *Candida albicans* (g) entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura sem suplementação e com diferentes suplementações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Concentrações de glicose	Diabéticos (n = 16)					Não Diabéticos (n = 16)					Teste U de Mann - Whitney	
	Mediana	Intervalo Interquartil		Shapiro-Wilk		Mediana	Intervalo Interquartil		Shapiro-Wilk		Valor z	p
		25p	75p	Valor	P		25p	75p	Valor	p		
Sem Suplementação	0,094	0,090	0,095	0,654	< 0,001	0,096	0,088	0,099	0,744	0,001	-1,809	0,070
Suplementação 2 mg/mL	0,090	0,072	0,095	0,876	0,033	0,096	0,094	0,099	0,543	< 0,001	-2,601	0,009*
Suplementação 10 mg/mL	0,922	0,090	0,095	0,958	0,630	0,100	0,099	0,102	0,812	0,040	-3,808	< 0,001*

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; *Significância estatística quando $p < 0,05$; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75; Valor z= resultado do Teste U Mann-Whitney.

Tabela 6. Comparação do crescimento de cepas de *Candida albicans* (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura sem suplementação e com diferentes suplementações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Grupo	Sem Suplementação					Suplementação 2 mg/mL					Suplementação 10 mg/mL				
	Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis	
		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p
Diabético (n = 16)	0,094	0,090	0,095	-	-	0,090	0,072	0,095	-	-	0,092	0,090	0,095	-	-
Não Diabético (n = 16)	0,096	0,088	0,099	-1,668	1,000	0,096	0,094	0,099	-12,844	0,028 ^a	0,100	0,099	0,102	-14,531	0,010 ^b

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro. ^adiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre suplementação de 2 mg/mL e suplementação de 10 mg/mL; ^bdiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre suplementação de 10 mg/mL e sem suplementação; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75.

Tabela 7. Comparação do crescimento de cepas de *Candida glabrata* (g) entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Concentrações de glicose	Diabéticos (n = 9)						Não Diabéticos (n = 7)				Teste U de Mann -Whitney	
	Mediana	Intervalo Interquartil		Shapiro-Wilk		Mediana	Intervalo Interquartil		Shapiro-Wilk		Valor z	p
		25p	75p	Valor	p		25p	75p	Valor	p		
Sem Suplementação	0,094	0,091	0,097	0,533	< 0,001	0,097	0,097	0,097	0,718	0,006	-1,919	0,055
Suplementação 2 mg/mL	0,094	0,086	0,096	0,636	< 0,001	0,091	0,091	0,094	0,973	0,921	-0,212	0,832
Suplementação 10 mg/mL	0,092	0,090	0,095	0,846	0,067	0,095	0,093	0,097	0,930	0,550	-1,325	0,185

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro. 25p= percentil 25, 75p= percentil 75; Valor z= resultado do Teste U Mann-Whitney.

Tabela 8. Comparação do crescimento de cepas de *Candida glabrata* (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Grupo	Sem Suplementação					Suplementação 2 mg/mL					Suplementação 10 mg/mL				
	Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis	
		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p
Diabético (n = 9)	0,094	0,091	0,097	-	-	0,094	0,086	0,096	-	-	0,092	0,090	0,095	-	-
Não Diabético (n = 7)	0,097	0,097	0,097	8,571	0,029 ^a	0,091	0,091	0,094	-4,286	0,587	0,095	0,093	0,097	4,286	0,587

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; ^adiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação entre sem suplementação e suplementação 2 mg/mL; 25p= percentil 25, 75p= percentil 75.

Na matéria seca, as cepas de *C. albicans* cultivadas em meio sem suplementação de glicose apresentaram crescimento mediano maior, porém sem significância estatística ($p = 0,070$) quando obtidas de não diabéticos (0,0966 g) em comparação com as cepas de diabéticos (0,0936 g).

Para cepas cultivadas em meio suplementado a 2 mg/mL o crescimento mediano foi superior e estatisticamente significativo ($p = 0,009$) quando provenientes de não diabéticos (0,0961 g) em relação a diabéticos (0,0903 g).

As cepas de *C. albicans* cultivadas em suplementado a 10 mg/mL tiveram maior crescimento quando oriundas de não diabéticos (0,1000 g) quando comparadas às cepas de diabéticos (0,0922 g) ainda apresentando significância estatística ($p < 0,001$).

A comparação entre as suplementações nos diabéticos mostrou que o crescimento das cepas de *C. albicans* foi similar em todas as concentrações de glicose. No entanto, nos não diabéticos a suplementação a 10 mg/mL promoveu maior crescimento que os demais grupos (Sem suplementação: $p = 0,010$; Suplementação 2 mg/mL: $p = 0,028$).

As cepas de *C. glabrata* cultivadas em meio sem suplementação de glicose e provenientes de não diabéticos apresentaram crescimento mediano maior (0,0972 g) em relação às cepas de não diabéticos (0,0939 g), porém sem significância estatística ($p = 0,055$).

Em relação as cepas cultivadas em meio suplementado a 2 mg/mL e oriundas de diabéticos tiveram crescimento mediano maior (0,0936 g) quando comparadas às cepas de não diabéticos (0,0910 g) sem valor estatisticamente significativo ($p = 0,832$).

As cepas cultivadas em meio a 10 mg/mL e obtidas de não diabéticos apresentaram maior crescimento mediano (0,0947 g) quando comparadas a cepas obtidas de diabéticos (0,0917 g), no entanto essa comparação não apresentou valor estatisticamente significativo ($p = 0,185$).

Ao comparar-se o efeito da suplementação nos diabéticos não foram observadas diferenças quanto à suplementação de glicose. No entanto, para os não diabéticos, as cepas de *C. glabrata* tiveram um maior crescimento no cultivo sem suplementação em comparação ao suplementado à 2 mg/mL ($p =$

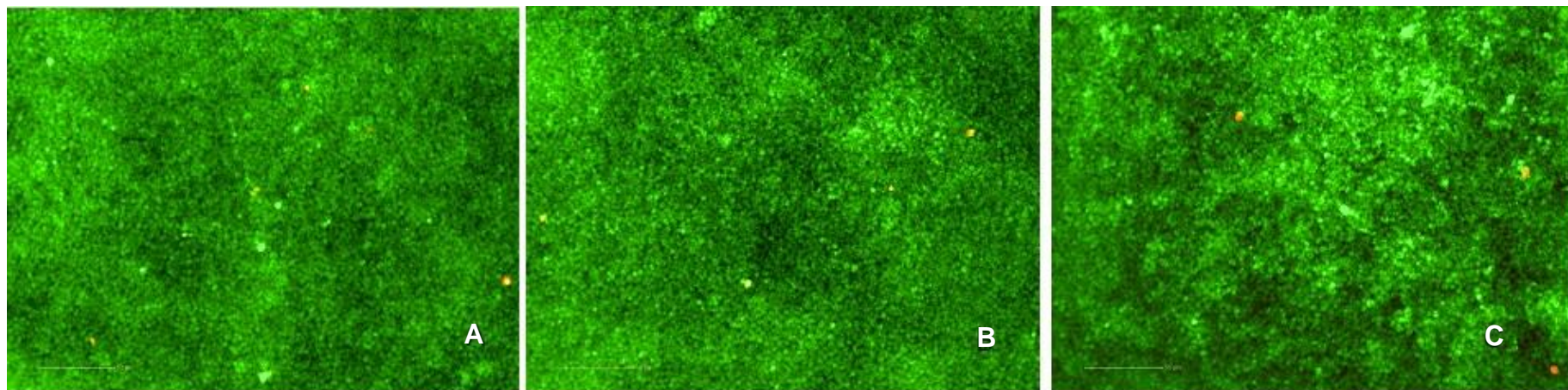
0,029). O crescimento nas suplementações a 2 mg/mL e 10 mg/mL foi semelhante ($p = 0,587$).

5.3 Análise da do crescimento do biofilme por microscopia de fluorescência

Um total 144 cultivos, sendo: *C. albicans* de diabéticos ($n = 48$) – (Figura 2), *C. albicans* de não diabéticos ($n = 48$) (Figura 3), *C. glabrata* de diabéticos ($n = 27$) (Figura 4) e *C. glabrata* de não diabéticos ($n = 21$) (Figura 5) foram empregados para avaliação dessa variável.

As Tabelas 9, 10, 11 e 12 mostram os resultados da formação de biofilme, das cepas *C. albicans* (9 e 10) e *C. glabrata* (11 e 12) provenientes de diabéticos e não diabéticos, cultivadas em diferentes concentrações de glicose, na área recoberta pelo biofilme(μm^2).

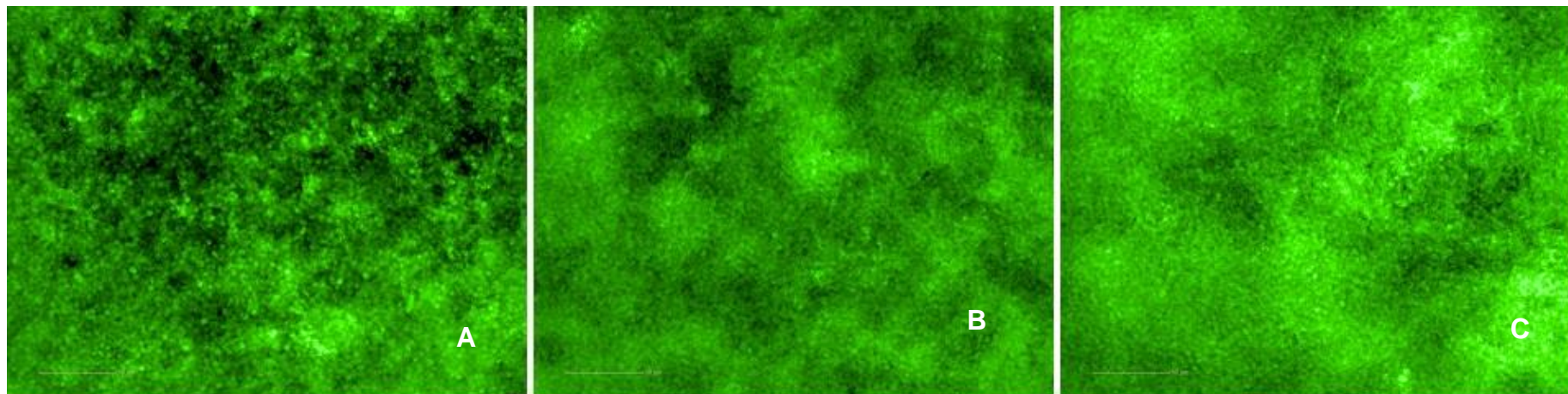
Figura 2. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de *Candida albicans* de pacientes diabéticos.



A: Sem glicose, B: 2 mg/mL e C: 10 mg/mL.

Fonte: Próprio autor.

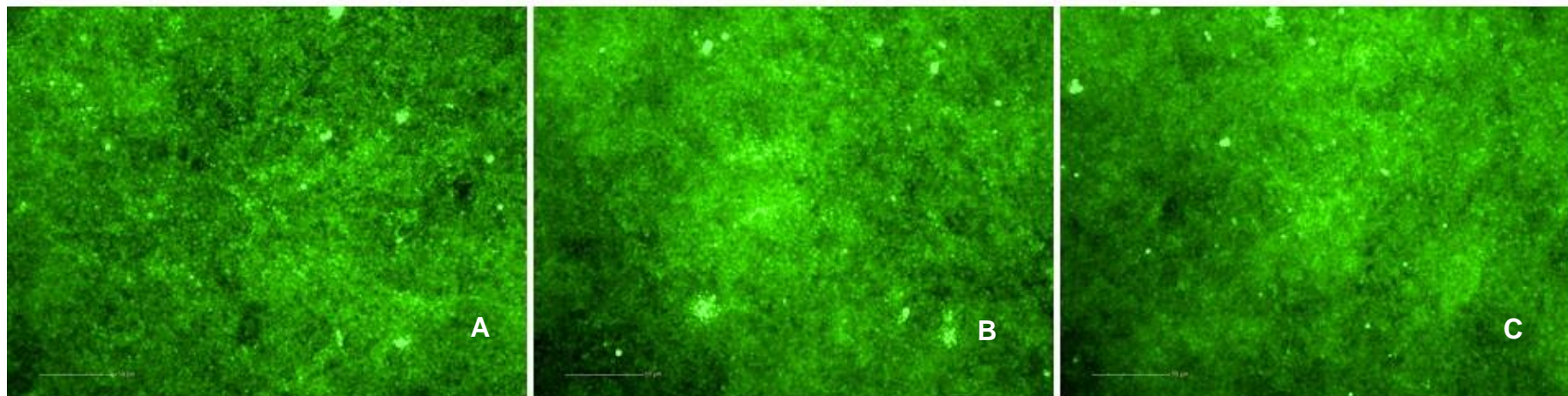
Figura 3. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de *Candida albicans* de pacientes não diabéticos.



A: Sem glicose, B: 2 mg/mL e C: 10 mg/mL.

Fonte: Próprio autor.

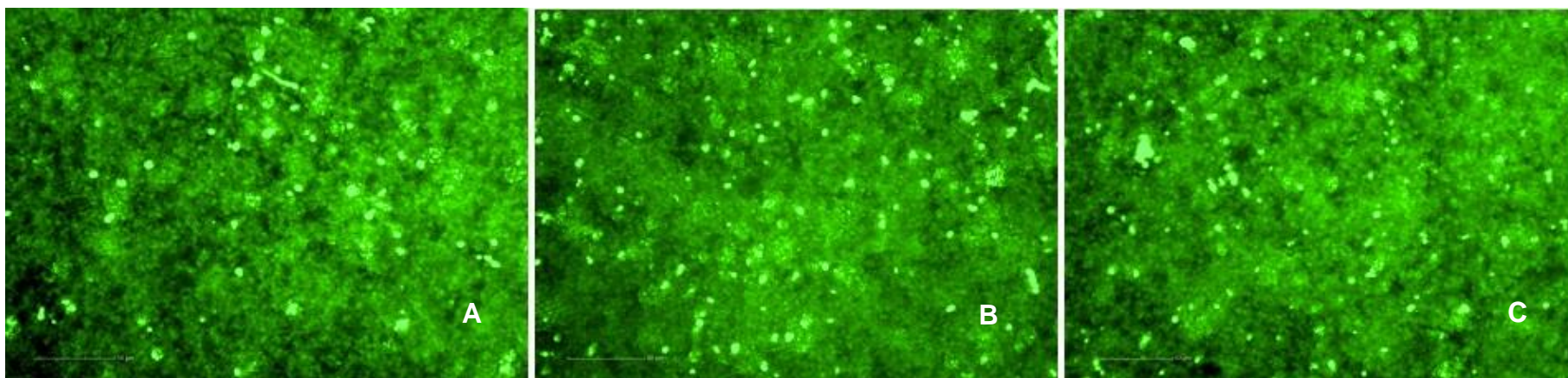
Figura 4. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de *Candida glabrata* de pacientes diabéticos.



A: Sem glicose, B: 2 mg/mL e C: 10 mg/mL.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5. Formação de biofilme em três diferentes concentrações de glicose de cepa de *Candida glabrata* de pacientes não diabéticos.



A: Sem glicose, B: 2 mg/mL e C: 10 mg/mL.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9: Comparação da taxa de crescimento das cepas de *Candida albicans* (μm^2) entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Concentrações de glicose	Diabéticos (n = 48)					Não Diabéticos (n = 48)					Teste U de Mann - Whitney	
	Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Valor z	p
		25p	75p	Valor	p		25p	75p	Valor	p		
Sem Suplementação	171,886	145,688	204,315	0,085	0,200	204,455	169,311	277,492	0,151	0,008	-3,231	< 0,001*
Suplementação 2 mg/mL	160,841	135,734	207,188	0,116	0,105	201,635	164,552	252,786	0,126	0,053	-3,503	< 0,001*
Suplementação 10 mg/mL	205,102	156,783	251,362	0,095	0,200	252,046	175,257	306,174	0,056	0,200	-2,466	0,014*

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; *Significância estatística quando $p < 0,05$; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75; Valor z= resultado do Teste U Mann-Whitney.

Tabela 10. Comparação do crescimento de cepas de *Candida albicans* (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Grupo	Sem Suplementação					Suplementação 2 mg/mL					Suplementação 10 mg/mL				
	Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis	
		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p
Diabético (n = 9)	71,886	145,688	204,315	0,499	1,000	160,841	135,734	207,188	-3,031	0,007 ^a	205,102	156,783	251,362	-2,538	0,033 ^b
Não Diabético (n = 7)	204,455	169,311	277,492	-	-	201,635	164,552	252,786	-	-	252,046	175,257	306,174	-	-

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; ^adiferença estatisticamente significativa (p<0,05) na comparação entre suplementação de 2 mg/mL e suplementação de 10 mg/mL; ^bdiferença estatisticamente significativa (p<0,05) na comparação entre suplementação de 10 mg/mL e sem suplementação; 25p= percentil 25, 75p= percentil 75.

Tabela 11. Comparação da taxa de crescimento das cepas de *Candida glabrata* (μm^2) entre diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Concentrações de glicose	Diabéticos (n = 27)					Não Diabéticos (n = 21)					Teste U de Mann - Whitney	
	Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Mediana	Intervalo Interquartil		Kolmogorov-Smirnov		Valor z	p
		25p	75p	Valor	p		25p	75p	Valor	p		
Sem Suplementação	134,562	115,845	188,236	0,174	0,035	138,743	106,844	181,592	0,159	0,177	0,405	0,685
Suplementação 2 mg/mL	141,593	125,833	216,470	0,229	0,001	146,168	110,294	197,860	0,139	0,200	0,384	0,701
Suplementação 10 mg/mL	190,845	137,198	233,980	0,165	0,077	149,993	119,557	183,136	0,091	0,200	2,305	0,021*

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; *Significância estatística quando $p < 0,05$; 25p= percentil 25; 75p= percentil 75; Valor z= resultado do Teste U Mann-Whitney.

Tabela 12. Comparação do crescimento de cepas de *Candida glabrata* (g) intragrupos diabéticos e não diabéticos cultivadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de glicose, Ribeirão Preto, 2020.

Grupo	Sem Suplementação					Suplementação 2 mg/mL					Suplementação 10 mg/mL				
	Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis		Mediana	Intervalo Interquartil		Teste de Kruskal-Wallis	
		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p		25p	75p	Valor H	p
Diabético (n = 9)	134,562	115,845	188,236	-0,830	1,000	141,593	125,833	216,470	-1,853	0,192	190,845	137,198	233,980	-2,667	0.023 ^a
Não Diabético (n = 7)	138,743	106,844	181,592	-	-	146,168	110,294	197,860	-	-	149,993	119,557	183,136	-	-

Legenda: mg/mL = miligramas por mililitro; ^adiferença estatisticamente significativa (p<0,05) na comparação entre suplementação de 10 mg/mL e sem suplementação; 25p= percentil 25, 75p= percentil 75.

Com relação à taxa de crescimento do biofilme, as cepas de *C. albicans* cultivadas em meio sem suplementação de glicose apresentaram crescimento mediano maior ($p < 0,001$) quando obtidas de não diabéticos ($204,455 \mu\text{m}^2$) em comparação com as cepas de diabéticos ($171,886 \mu\text{m}^2$).

Para cepas cultivadas em meio suplementado a 2 mg/mL o crescimento mediano foi superior e estatisticamente significativo ($p < 0,001$) quando provenientes de não diabéticos ($201,635 \mu\text{m}^2$) em relação a diabéticos ($160,841 \mu\text{m}^2$).

As cepas de *C. albicans* cultivadas em meio suplementado a 10 mg/ dL tiveram maior crescimento quando oriundas de não diabéticos ($252,046 \mu\text{m}^2$) quando comparadas às cepas de diabéticos ($205,102 \mu\text{m}^2$) ainda apresentando significância estatística ($p = 0,014$).

Ao avaliar-se o efeito das condições de suplementação em cada grupo de cepas foi observado as diferentes concentrações de glicose não tiveram efeito na taxa de crescimento de *C. albicans* proveniente de não diabéticos ($p = 0,105$). No entanto, a suplementação a 10 mg/mL, nos diabéticos, promoveu aumento da área recoberta por biofilme em relação ao grupo sem suplementação ($p = 0,033$) e suplementação a 2 mg/mL ($p = 0,007$).

As cepas de *C. glabrata* cultivadas em meio sem suplementação de glicose e em meio suplementado a 2 mg/mL tiveram taxas de crescimento semelhantes nos diabéticos e não diabéticos (Sem suplementação: $p = 0,685$; Suplementação 2 mg/mL: $0,701$).

Já as cepas cultivadas em meio a 10 mg/mL e obtidas de diabéticos apresentaram maior crescimento mediano ($190,845 \mu\text{m}^2$) quando comparadas a cepas obtidas de não diabéticos ($149,993 \mu\text{m}^2$), no entanto essa comparação não apresentou valor estatisticamente significativo ($p = 0,021$).

Ao avaliar-se o efeito das condições de suplementação em cada grupo de cepas foi observado o mesmo comportamento descrito anteriormente para *C. albicans*. As diferentes concentrações de glicose não tiveram efeito na taxa de crescimento de *C. glabrata* proveniente de não diabéticos ($p = 0,788$). No entanto, a suplementação a 10 mg/mL, nos diabéticos, promoveu aumento da área recoberta por biofilme em relação ao grupo sem suplementação ($p = 0,023$).

6 DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose. A hipótese nula do estudo foi rejeitada, uma vez que foram observadas diferenças na formação de biofilmes por cepas de *Candida* spp. provenientes de diabéticos e não diabéticos.

No que tange o crescimento avaliado por unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi observado um maior crescimento de ambas as cepas (*C. albicans* e *C. glabrata*) provenientes de pacientes diabéticos e cultivadas em meio de cultura sem suplementação. O crescimento maior das cepas oriundas de pacientes diabéticos era esperado uma vez que estas estão mais adaptadas a estar em ambiente com maior concentração de glicose. Contudo, esperava-se um maior crescimento das cepas cultivadas nos meios de cultura suplementados com glicose uma vez que estes fornecem mais energia e nutrientes para o desenvolvimento dos micro-organismos.

O crescimento das UFC de *C. albicans* dos diabéticos além de ser superior quando cultivadas em meio sem suplementação também foi maior na suplementação a 2 mg/mL em relação ao cultivo em 10 mg/mL. De maneira similar, nas cepas de não diabéticos o maior crescimento foi observado no cultivo a 2 mg/mL, o que indica que até certo ponto a suplementação ajuda no crescimento dessas cepas e quando se tem uma suplementação elevada a concentração acaba prejudicando o desenvolvimento (HOSIDA et al. 2017. MOHAMMADI et al.2016, SUÁREZ et al.2013). Este mesmo comportamento foi igual para as cepas de *C. glabrata*.

Como observado, o crescimento em UFC/mL das cepas provenientes de diabéticos foi superior em relação as cepas de não diabéticos. Essa informação também foi observada em resultados de outras pesquisas (AL MUBARAK et al., 2013; HAMMAD; DARWAZEH; IDREES,2013). Estes autores analisaram a relação do quadro de diabetes *mellitus* junto com o quadro de candidíase bucal em pacientes portadores da doença e em grupo controle, porém esperava-se que o crescimento dessas cepas fosse superior conforme houvesse aumento da concentração de glicose no meio, o que não ocorreu. Assim a partir dessa sinalização compreende-se que as cepas de diabéticos têm maior capacidade

de crescimento em relação à dos não diabéticos em qualquer concentração de glicose, porém a concentração de glicose tem pouca influência nesse crescimento, tendo como base o resultado em UFC/mL. Com isso, percebemos que os diabéticos têm um risco maior para o desenvolvimento de candidíase bucal pelo fato das cepas obtidas a partir desses pacientes apresentarem maior crescimento.

Os resultados em UFC/mL das cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, nos faz refletir acerca do quanto à concentração de glicose influencia o crescimento dos micro-organismos; uma vez que houve crescimento superior foi observado em concentrações menores de glicose nos diabéticos. Nos não diabéticos o crescimento foi superior no cultivo a 2 mg/mL. Observa-se na literatura que o crescimento de UFC/mL é superior no cultivo em meio mais concentrado de glicose. Contudo, há pesquisas utilizaram técnicas diferentes daquelas adotadas no presente estudo, o que pode explicar as diferenças entre os resultados. Portanto o crescimento das cepas em menores concentrações de glicose pode indicar pouca relação entre a taxa de glicose na saliva e a formação de biofilme ou que a taxa de glicose influencia até certo ponto o desenvolvimento das leveduras (AL MUBARAK et al., 2013; BEZERRA et al., 2019; CHOUHAN et al., 2019; GOODSON et al., 2017; HAMMAD; DARWAZEH; IDREES, 2013; RODRIGUES, RODRIGUES, HENRIQUES, 2019; SAEB et al., 2019).

Em relação à análise de matéria seca, foi observado que as cepas de *C. albicans*, como esperado, apresentaram maior crescimento em meio de cultura com maior concentração de glicose (10 mg/mL), porém este crescimento foi nas cepas provenientes de pacientes não diabéticos, e também nas outras concentrações. Nas cepas de *C. glabrata* o resultado obtido mostrou um comportamento diferente do esperado uma vez que o maior crescimento foi das cepas obtidas de pacientes não diabéticos e cultivadas em meio de cultura sem suplementação. Contudo, em relação a matéria seca, os resultados podem não mostrar com precisão o real crescimento do número de células uma vez que no biofilme formado há também a presença da matriz de polissacarídeos.

As cepas de *C. albicans* dos não diabéticos mostraram um crescimento em g no método da matéria seca exatamente como esperado, sendo superior

no cultivo com maior concentração de glicose e inferior quando não suplementadas. Contudo, quando provenientes de pacientes diabéticos foi notado um crescimento diferente, uma vez que foi superior em meio não suplementado e inferior no cultivo a 2 mg/mL. As cepas de *C. glabrata* dos diabéticos apresentaram um crescimento contrário ao esperado sendo maior no meio sem suplementação e menor no meio hipertônico, mas as cepas oriundas dos não diabéticos tiveram crescimento semelhante as cepas de *C. albicans* dos diabéticos.

Em relação a matéria seca do biofilme, o maior crescimento obtido foi na suplementação a 10 mg/mL, das cepas de *C. albicans* fato previamente observado (BABATZIA et al., 2019; SAEB et al., 2019) em estudo que verificaram a saúde bucal de diabéticos, não diabéticos e pessoas pré-diabéticas, analisando a microbiota bucal associada aos níveis de glicose na saliva e no sangue. Assim quanto maior for o nível de glicose maior será o crescimento, porém o crescimento ocorreu nas cepas de não diabéticos. Este fato evidencia que independentemente da origem da cepa o micro-organismo irá se desenvolver melhor numa maior concentração de nutrientes. Entretanto as cepas de *C. glabrata* mostraram um comportamento diferente e tiveram melhor desenvolvimento quando cultivadas em meio sem suplementação de glicose e oriundas de não diabéticos. Até o momento, não encontramos estudos na literatura que mostrem esse comportamento. Este resultado pode ser explicado pelo fato de o método utilizado ser pouco preciso para evidenciar o real crescimento das cepas, uma vez que no biofilme há outras substâncias além das células de *Candida*. Isso mostra que diferentes espécies de *Candida* se comportam de maneiras diferentes em ambientes semelhantes, implicando assim que antes de adotar uma medida de cuidado deve se verificar e analisar o comportamento da espécie.

Os resultados observados em relação a matéria seca do biofilme são corroborados por outros estudos (AL MUBARAK et al., 2013; BEZERRA et al., 2019; CHOUHAN et al., 2019; HAMMAD; DARWAZEH; IDREES, 2013; BABATZIA et al., 2019). Mesmo que estes autores tenham utilizado o crescimento em meio de cultura sólido e o resultado expresso em UFC/mL, as cepas de *C. albicans* de não diabéticos cultivadas em meio com maior concentração de glicose foi superior. E, apesar das cepas dos diabéticos o

crescimento ser superior em meio sem suplementação de glicose, foi observado um aumento da formação de biofilme no cultivo do meio de maior suplementação.

Ainda no que tange os resultados sobre a matéria seca, as cepas de *C. glabrata* dos não diabéticos seguem o comportamento das cepas de *C. albicans* dos diabéticos. Contudo, as cepas dos não diabéticos apresentaram comportamento inverso sendo superior na condição sem suplementação de glicose, e reduzindo o crescimento conforme se aumentava a concentração de glicose. Os resultados da matéria seca do biofilme pode em certos casos ser semelhante à de outras pesquisas, porém o fato de não conseguir diferenciar o que são células e o que é matriz de polissacarídeos dificulta a confiabilidade dos resultados (HOSIDA et al. 2017).

Observamos através da microscopia realizada no sistema *Operetta* que as cepas de *C. albicans* apresentaram maior área recoberta no crescimento do biofilme dos não diabéticos em relação aos diabéticos, além disso a área recoberta pelo biofilme foi maior no meio suplementado a 10 mg/mL. Este comportamento foi observado tanto para as cepas oriundas de pacientes não diabéticos quanto de pacientes diabéticos. Nas cepas de *C. glabrata* a maior área de maior formação de biofilme foi dos diabéticos em relação aos não diabéticos, e na condição de maior suplementação.

A mesma metodologia, mostrou também que as cepas de *C. albicans* de diabéticos e não diabéticos apresentaram um crescimento inferior quando foram cultivadas no meio a 2 mg/mL. Porém nas cepas de *C. glabrata* o crescimento do biofilme foi exatamente como esperado teve sua maior área recoberta no meio com superior concentração e a menor no meio sem suplementação.

A taxa de crescimento, trouxe importantes resultados a serem discutidos, uma vez que existem poucos dados na literatura sobre a utilização desse tipo de microscopia para análise de formação de biofilme de *Candida*. A maior área de crescimento foi verificada para as cepas cultivadas em meio de cultura suplementado com maior concentração de glicose, assim como observado em outras pesquisas (; AL MUBARAK et al., 2013; BABATZIA et al., 2019; GOODSON et al., 2017; HAMMAD; DARWAZE; IDREES, 2013; MOTTA-SILVA et al., 2010; SAEB et al., 2019). Todavia, estas utilizaram outros

métodos para avaliação do crescimento dos micro-organismos, como o cultivo em meio sólido e CHROMagar.

Os resultados obtidos, são corroborados por estudos que avaliaram o crescimento de espécies de *Candida*, em relação ao seu cultivo em concentrações diferentes de nutrientes, e quanto a sua origem (diabético ou não diabético) (MOTTA-SILVA et al., 2010; AL MUBARAK et al., 2013; HAMMAD; DARWAZEH; IDREES,2013). As cepas de *C. glabrata* expressaram um crescimento exatamente como esperado, tendo maior área recoberta nos meios mais concentrados e quando obtidas e pacientes diabéticos. No entanto, as cepas de *C. albicans* também tiveram a maior área recoberta na maior concentração de glicose, porém isso ocorreu nas cepas obtidas dos não diabéticos. Neste sentido, podemos indicar que a concentração de glicose influencia na formação de biofilme, e, portanto, pacientes diabéticos devem ter um controle glicêmico adequado a fim de evitar complicações decorrentes de uma candidíase bucal.

A relação parasita-hospedeiro da microbiota bucal, geralmente, é benéfica a todos as pessoas, todavia se este equilíbrio for quebrado pode haver o desenvolvimento de infecções e isso se agrava ainda mais em pacientes portadores de doenças crônicas como o diabetes. Assim, o mal controle dessas doenças pode levar ao desequilíbrio da relação parasita-hospedeiro e a um quadro de infecção (SAEB et al., 2019).

Para as cepas de *C. glabrata* o crescimento foi superior nas cepas obtidas de diabéticos. Nosso resultado é corroborado pelas pesquisas citadas anteriormente (AL MUBARAK et al., 2013; BABATZIA et al., 2019; HAMMAD; DARWAZEH; IDREES,2013; SAEB et al., 2019), evidenciando que cepas de diabéticos por estarem em constante meio com maior concentração de glicose conseguem se desenvolver com mais facilidade. Entretanto, para as cepas de *C. albicans* o crescimento foi superior naquelas provenientes de não diabéticos. Dessa forma, compreendemos que diferentes espécies de *Candida* podem ter diferentes comportamentos em relação ao tipo de indivíduo do qual se obteve a cepas, diabético ou não. Este crescimento indica que os diabéticos além de serem mais propensos a desenvolver a candidíase bucal, podem ser mais susceptíveis a infecções bucais quando seu controle glicêmico não é correto.

Algumas limitações devem ser mencionadas. O modelo experimental *in vitro* possui limitações que dificulta a extrapolação dos resultados para Seres Humanos, abordadas a seguir: o cultivo dos micro-organismos e formação do biofilme em ambiente que mimetiza uma situação de um paciente diabético. Com o nível de glicose salivar em diferentes concentrações, a utilização de apenas um micro-organismo, nesse caso leveduras de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Não utilizar o biofilme misto que utiliza diversas espécies de micro-organismos. A utilização de cepas obtidas de um banco de dados criado anteriormente e não de pacientes recém coletados o que permitiria uma análise da qualidade da saúde bucal e do quadro do diabetes do paciente antes, durante e depois das coletas. Contudo, a utilização do modelo experimental *in vitro* apresenta benefícios, como a extrapolação do número de amostras. Ainda, outro ponto positivo é a utilização das diversas concentrações de glicose para simular os diferentes controles glicêmicos dos pacientes, e verificar como determinado micro-organismo responde em cada condição/concentração.

Ainda que não tenha sido pauta da investigação da pesquisa quadros de outras doenças bucais ou metabólicas concomitantes com a candidíase bucal e ao diabetes *mellitus*, podem agravar consideravelmente ambas as doenças, uma vez que podem atrapalhar no controle da glicemia ou debilitar o sistema imunológico do paciente.

Os avanços de nosso estudo estão em evidenciar resultados oriundos da comparação da formação de biofilme de cepas provenientes de diabéticos e não diabéticos, bem como seu comportamento em diferentes concentrações de glicose. Uma vez que os estudos encontrados na literatura mostravam a incidência de espécies de *Candida* ou de outros micro-organismos. O desenvolvimento desta pesquisa por utilizar uma metodologia original, está passível de aprimoramentos, como utilizar outros métodos de formação de biofilme que simulem com maior precisão o ambiente bucal e utilizar métodos mais sensíveis no que tange a real formação do biofilme.

7 CONCLUSÃO

Considerando as comparações entre cepas de *C. albicans* de diabéticos e não diabéticos em diferentes concentrações de glicose podemos concluir que:

- ✓ Nas análises da matéria seca e da taxa de crescimento do biofilme as cepas dos não diabéticos nas três diferentes concentrações de glicose mostraram maior capacidade de formação de biofilme;
- ✓ Na taxa de crescimento das cepas dos diabéticos, a maior capacidade de formação de biofilme foi evidenciada na suplementação de 10 mg/mL, o mesmo pode ser observado nos não diabéticos;
- ✓ Em relação a carga fúngica as cepas dos diabéticos, a capacidade de formação de biofilme foi maior quando cultivadas em meio sem suplementação.

Além disso, segundo as comparações entre cepas de *C. glabrata* de diabéticos e não diabéticos em diferentes concentrações de glicose podemos concluir que:

- ✓ As cepas oriundas de diabéticos, no geral das diferentes concentrações de glicose utilizadas, apresentaram maior capacidade de formação de biofilme;
- ✓ Das cepas dos diabéticos, aquelas cultivadas em meio sem suplementação de glicose, apresentaram crescimento superior em dois momentos (UFC e matéria seca). Contudo, a taxa de formação do biofilme foi superior nas cepas cultivadas com suplementação de glicose a 10 mg/mL;
- ✓ Em relação às cepas de não diabéticos, na análise da carga fúngica o crescimento maior foi observado em suplementação de glicose a 2 mg/mL .

Em conclusão, cepas de *C. albicans* e *C. glabrata* provenientes de diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose apresentaram resultados distintos quanto à formação de biofilme, avaliado por diferentes técnicas.

REFERÊNCIAS¹

AIRES, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M.; KLEIN, M. I.; KOO, H.; DUARTE, S.; CURY, J. A. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Research**, v. 42, n. 5, p. 380-386, Sep. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000154783>.

AL MUBARAK, S.; ROBERT, A. A.; BASKARADOSS, J. K.; AL-ZOMAN, K.; AL SOHAIL, A.; ALSUWYED, A.; CIANCIO, S. The prevalence of oral Candida infections in periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Infection and Public Health**, v. 6, n. 4, p. 296-301, Aug. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2012.12.007>.

BABATZIA, A.; PAPAIOANNOU, W.; STAVROPOULOU, A.; PANDIS, N.; KANAKA-GANTENBEIN, C.; PAPAGIANNOULIS, L.; GIZANI, S. Clinical and microbial oral health status in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. **International Dental Journal**, v. 70, n. 2, p. 136-144, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/idj.12530>.

BALAN, P.; GOGINENI, S. B.; KUMARI, N. S.; SHETTY, V.; LAKSHMAN RANGARE, A.; CASTELINO, R. L.; AREEKAT, K. F. Candida Carriage Rate and Growth Characteristics of Saliva in Diabetes Mellitus Patients: A Case-Control Study. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v.9, n. 4, p. 274-279, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.15171/joddd.2015.048>.

BEZERRA, N. V. F.; BRITO, A. C. M.; DE MEDEIROS, M. M. D.; DE FRANÇA LEITE, K. L.; BEZERRA, I. M.; DE ALMEIDA, L. F. D.; AIRES, C. P.; CAVALCANTI, Y. W. Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of Candida single- and dual-species biofilms. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 10, n. 3, e12412, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jicd.12412>.

CHOUHAN, S.; KALLIANPUR, S.; PRABHU, K. T.; TIJARE, M.; KASETTY, S.; GUPTA, S. Candidal Prevalence in Diabetics and its Species Identification. **International journal of applied & basic medical research**, v. 9, n. 1, p. 49-54, Jan-Mar. 2019. DOI: 10.4103/ijabmr.IJABMR_259_18.

CORNET, M.; SENDID, B.; FRADIN, C.; GAILLARDIN, C.; POULAIN, D.; NGUYEN, H. V. Molecular identification of closely related Candida species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. **The Journal of molecular diagnostics: JMD**, v. 13, n. 1, p. 12-22, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2010.11.014>.

¹Segundo Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP. 4ª Edição. Revisada, ampliada e modificada, 2020. Parte I (ABNT) e ABNT NBR6023.

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A. colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p.167, Jul. 1951. DOI: <https://doi.org/10.1038/168167a0>.

DUGGAN, S.; ESSIG, F.; HÜNNIGER, K.; MOKHTARI, Z.; BAUER, L.; LEHNERT, T.; BRANDES, S.; HÄDER, A.; JACOBSEN, I. D.; MARTIN, R.; FIGGE, M. T.; KURZAI, O. Neutrophil activation by *Candida glabrata* but not *Candida albicans* promotes fungal uptake by monocytes. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1259–1276, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12443>.

GONÇALVES, L. M.; DEL BEL CURY, A. A.; DE VASCONCELLOS, A. A.; CURY, J. A.; DA SILVA, W. J. Confocal analysis of the exopolysaccharide matrix of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 6, n. 3, p. 179-185, Aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jicd.12093>.

GOODSON, J. M.; HARTMAN, M. L.; SHI, P.; HASTURK, H.; YASKELL, T.; VARGAS, J.; SONG, X.; CUGINI, M.; BARAKE, R.; ALSMADI, O.; AL-MUTAWA, S.; ARIGA, J.; SOPARKAR, P.; BEHBEHANI, J.; BEHBEHANI, K. The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. **PLoS One**, v. 12, n. 3, e0170437, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170437>.

HAMMAD, M. M.; DARWAZEH, A. M. G.; IDREES, M. M. The effect of glycemic control on *Candida* colonization of the tongue and the subgingival plaque in patients with type II diabetes and periodontitis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 3, p. 321–326, Sep. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.05.013>.

HOSIDA, T. Y.; CAVAZANA, T. P.; HENRIQUES, M.; PESSAN, J. P.; DELBEM, A.; MONTEIRO, D. R. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. **Mycoses**, v. 61, n. 4, p. 270-278, Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.12738>.

KOO, H.; HAYACIBARA, M. F.; SCHOBEL, B. D.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K.; VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 782-789, Nov. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkg449>.

KUMAR, S.; PADMASHREE, S.; JAYALEKSHMI, R. Correlation of salivary glucose, blood glucose and oral candidal carriage in the saliva of type 2 diabetics: A case-control study. **Contemporary clinical dentistry**, v. 5, n. 3, p. 312-317. Jul-Sep. 2014. DOI: 10.4103 / 0976-237X.137925.

LÓPEZ-PINTOR, R. M.; CASAÑAS, E.; GONZÁLEZ-SERRANO, J.; SERRANO, J.; RAMÍREZ, L.; DE ARRIBA, L.; HERNÁNDEZ, G. Xerostomia, Hyposalivation, and Salivary Flow in Diabetes Patients. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 15, Jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/4372852>.

MARTINEZ, R.F.; JAIMES-AVELDAÑEZ, A.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; ARENAS, R.; MIGUEL, G.F. Oral Candida spp carriers: its prevalence in patients with type 2 diabetes mellitu. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 2, p. 222-225, Mar-Apr. 2013 <https://doi.org/10.1590/S0365-05962013000200006>

MOHAMMADI, F.; JAVAHERI, M. R.; NEKOEIAN, S.; DEGHAN, P. Identification of Candida species in the oral cavity of diabetic patients. **Current medical mycology**, v. 2, n. 2, p. 1-7, Jun. 2016. DOI: 10.18869/acadpub.cmm.2.2.4.

MOTTA-SILVA, A. C.; ALEVA, N. A.; CHAVASCO, J. K.; ARMOND, M. C.; FRANÇA, J. P.; PEREIRA, L. J. Erythematous oral candidiasis in patients with controlled type II diabetes mellitus and complete dentures. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 215-223, Sep. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9240-6>.

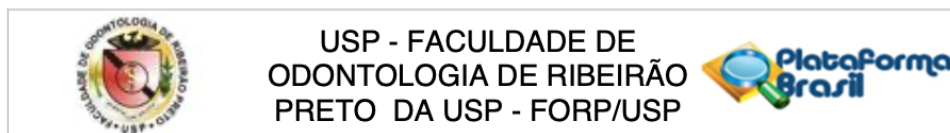
SAEB, A. T. M.; AL-RUBEAN, K. A.; ALDOSARY, K.; UDAYA RAJA, G. K.; MANI, B.; ABOUELHODA, M.; TAYEB, H. T. Relative reduction of biological and phylogenetic diversity of the oral microbiota of diabetes and pre-diabetes patients. **Microbial Pathogenesis**, v.128, p. 215-229, Mar. 2019, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.009>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad; 2017.

SUÁREZ, B. L.; ÁLVAREZ, M. I.; DE BERNAL, M.; COLLAZOS, A. Candida species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. **Colombia medica (Cali, Colombia)**, v. 44, n. 1, p. 26-30, Jan. 2013.

APÊNDICE

Apêndice A. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose

Pesquisador: Evandro Watanabe

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 29695720.0.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.008.627

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa visa avaliar a formação de biofilme por 48 cepas de *Candida* spp., provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose (sem glicose, glicose a 2mg/mL e glicose a 10mg/mL). As cepas compõem o banco de microorganismos do Laboratório de Pesquisa em Reabilitação Oral - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto. A fim de mimetizar a formação da película adquirida e as condições de formação de biofilme oral, saliva humana será utilizada para recobrimento de placas de cultivo celular. A saliva será coletada de 5 adultos, de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos. Serão coletados cerca de 50ml de saliva de cada participante, as quais serão filtradas e formarão um pool de cerca de 250mL.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral desta pesquisa é avaliar a formação de biofilme por cepas de *Candida* spp. provenientes de indivíduos diabéticos e não diabéticos em ambiente sem e com suplementação de glicose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos previsíveis ao participante. No entanto, alguns desconfortos como boca seca e dor leve na região de coleta de sangue para a dosagem da glicose poderão ocorrer. Benefícios: Como benefício, o participante receberá instruções a respeito de alimentação saudável, prática de

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre
UF: SP
Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493
Cep: 14.040-904
Fax: (16)3315-4102
E-mail: cep@forp.usp.br



USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP



Continuação do Parecer: 4.008.627

exercícios físicos e correta higiene bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto bem delineado, embasado cientificamente e nas normativas do CEP FORP/USP e CONEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presentes e adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 235ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 30/04/2020.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1514920.pdf	02/03/2020 12:29:56		Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	02/03/2020 12:29:13	Evandro Watanabe	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_NEPECISS.pdf	02/03/2020 12:28:34	Evandro Watanabe	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura_DMDP.pdf	02/03/2020 12:28:23	Evandro Watanabe	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	20/02/2020 18:31:36	Evandro Watanabe	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	20/02/2020 17:49:06	Evandro Watanabe	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

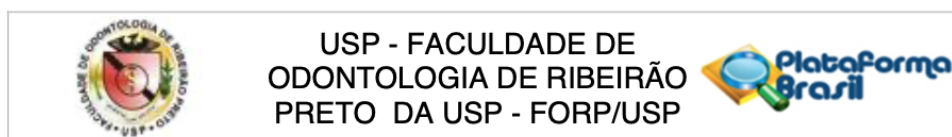
UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.008.627

RIBEIRÃO PRETO, 05 de Maio de 2020

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Café s/n°
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-904
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3315-0493 **Fax:** (16)3315-4102 **E-mail:** cep@forp.usp.br