



**Universidade Estadual De Campinas  
Faculdade De Odontologia De Piracicaba**

**LOUISE MORAIS DORNELAS BEZERRA**

**EFEITO DA GLICOSE SOBRE BIOFILMES DE  
*CANDIDA ALBICANS* DURANTE PROCESSO DE  
INVASÃO TECIDUAL**

**EFFECTS OF GLUCOSE ON *CANDIDA ALBICANS*  
BIOFILMS DURING TISSUE INVASION**

Piracicaba

2017

LOUISE MORAIS DORNELAS BEZERRA

EFEITO DA GLICOSE SOBRE BIOFILMES DE *CANDIDA ALBICANS*  
DURANTE PROCESSO DE INVASÃO TECIDUAL

EFFECTS OF GLUCOSE ON *CANDIDA ALBICANS* BIOFILMS DURING  
TISSUE INVASION

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Clínica Odontológica, área de Prótese Dental

Dissertation presented to the Piracicaba Dental School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Dental Clinic, in the area of Dental Prosthesis

Orientadora: Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pela aluna Louise Morais Dornelas Bezerra e orientada pela Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury.

Piracicaba

2017

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CNPq, 134130/2015-4

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

Bezerra, Louise Morais Dornelas, 1990-  
B469e Efeito da glicose sobre biofilmes de *Candida albicans* durante processo de invasão tecidual / Louise Morais Dornelas Bezerra. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Altair Antoninha Del Bel Cury.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Candida albicans*. 2. Glicose. 3. Citocinas. I. Del Bel Cury, Altair Antoninha, 1948-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Effects of glucose on *Candida albicans* biofilms during tissue invasion

**Palavras-chave em inglês:**

*Candida albicans*

Glucose

Cytokines

**Área de concentração:** Prótese Dental **Titulação:** Mestra em Clínica Odontológica

**Banca examinadora:**

Altair Antoninha Del Bel Cury [Orientador]

Carlos Estrela

Karina Gonzales Silvério Ruiz

**Data de defesa:** 23-02-2017

**Programa de Pós-Graduação:** Clínica Odontológica



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2017, considerou a candidata LOUISE MORAIS DORNELAS BEZERRA aprovada.

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ALTAIR ANTONINHA DEL BEL CURY

PROF. DR. CARLOS ESTRELA

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. KARINA GONZALES SILVÉRIO RUIZ

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## DEDICATÓRIA

À minha avó Regina que sonhou comigo a realização deste mestrado e que sempre me incentivou à buscar meus objetivos. Por acreditar em mim quando eu mesma duvidei. Serei eternamente grata por ter sido sua neta e por ter sido tão amada. Te amarei até meu último suspirar. Sinto sua falta.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Altair A. Del Bel Cury** por me ter aberto às portas da UNICAMP, por acreditar no meu potencial e ter investido em mim. Sou grata por todos os ensinamentos e incentivo ao estudo e à pesquisa. O respeito e admiração que todos ao seu redor lhe dão, é reflexo da profissional exímia que é. Por ser uma mulher forte, com ideias e opiniões respeitadas e executadas, é certamente um exemplo de feminismo à ser seguido. Sinto orgulho em poder dizer que sou e continuarei sendo sua aluna.

Aos meus pais **José Dornelas** e **Francisca Regina** por todo apoio, incentivo e por nunca medirem esforços para meu bem-estar e educação. Certamente não teria conseguido superar as dificuldades sem a ajuda e o amor de vocês. Obrigado por compreender minha ausência momentânea e por me incentivarem a perseguir meus sonhos. Obrigada por serem exemplos de superação e por terem me ensinado que é possível conseguir qualquer coisa a que nos proponhamos, se nos empenharmos. Apesar da distância os levo sempre em minha mente e coração. O amor de vocês por mim foi essencial nas horas difíceis. A vocês, devo tudo. Amo vocês.

À **Raphael Figueira**, que com tanto amor e paciência tem me ajudado durante todo o mestrado. Por ter me dado a mão nos momentos difíceis, me acalmado quando estive ansiosa e ter enxugado minhas lágrimas quando senti saudade de casa. Certamente a caminhada aqui teria sido muito mais dura sem você. Obrigado por me incentivar, apoiar e acreditar que eu conseguiria quando eu mesma duvidei. Tenho certeza que você foi um presente de Deus. Amo você.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, pelas oportunidades que tem colocado em meu caminho e por ter me dado condições para realização desse trabalho.

A **Universidade Estadual de Campinas** por meio do seu magnífico Reitor, **Prof. Dr. José Tadeu**.

A **Faculdade de Odontologia de Piracicaba** da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**.

A Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Profa. Dra. **Cíntia Pereira Machado Tabchoury**.

A Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz**.

Aos docentes da área de Prótese Dentária da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial **Prof. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, **Profa. Dra. Célia Rizatti Barbosa**, **Prof. Dr. Wander José da Silva** e **Prof. Valentim Adelino Ricardo Barão** por contribuírem com minha formação pessoal e profissional ao longo da pós-graduação.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, que de alguma forma contribuíram para meu aprendizado e crescimento profissional.

Aos professores **Prof. Dra. Altair A. Del Bel Cury**, **Prof. Dr. Carlos Estrela** e **Prof. Dra. Karina Gonzales Silvério Ruiz** pela disponibilidade e contribuição nas correções durante exame de defesa da dissertação.

Aos professores **Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin**, **Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho**, **Profa. Dra. Samira Salmeron**, **Prof. Dr. Wander José da Silva** pela disponibilidade e contribuição durante exame de qualificação.

A **Sra. Eliete** Lima secretária da Área de Prótese pelo carinho, atenção e disponibilidade.

A **Sra. Gislaine Piton**, técnica do Laboratório de Prótese Parcial Removível, por cuidar com tanto carinho e dedicação do nosso laboratório e alunos.

A **Área de Periodontia** pela oportunidade de utilizar o laboratório de Biologia Molecular e Cultura de celular possibilitando o desenvolvimento deste trabalho, em especial à **Profa. Dra. Karina Gonzalez** que sempre se mostrou prestativa, atenciosa e disposta a me ajudar.

Aos técnicos **Sra. Mariana Lazarin, José Alfredo Da Silva, Sr. Waldomiro Vieira Filho, Sra Flavia Sammartino Mariano Rodrigues, Sr. Adriano Martins** pela disponibilidade e aprendizado.

A todos amigos e colegas de pós-graduação pela convivência agradável em especial **Edmara Bergamo, Rafael Soares, Dimo Bordin, Priscila Lazari, Vitor Munoz, Lina Maria, Gabriela Alencar** aprendi e me diverti muito com todos vocês.

À **Elis Lira** pela amizade sincera desde a graduação e por ser minha família em Piracicaba. Por ser meu ombro amigo sempre que precisei. Deus colocou você no meu caminho.

À **Rodrigo Lins** por sempre ser tão prestativo e atencioso. Pela amizade sincera e maravilhosa que construímos ao longo destes 8 anos.

Aos demais amigos **Mayara Abreu, Camila Fraga, Jairo Matozinho, Mariana Barbosa, Amanda Bandeira, Rahyza Freire, Olivia Figueredo, Giancarlo de La Torre**, vocês fizeram a caminhada muito mais prazerosa.

A **Martinna Bertolinni**, que sempre tirou minhas dúvidas e colaborou para a realização deste trabalho.

A **Pedro Ricomini** que sempre se mostrou tão atencioso e disposto a sanar minhas dúvidas, você é um exemplo para mim.

A **Samira Salmeron** por todas as horas dispensadas à mim durante a realização dos experimentos.

Ao **Prof Dr Carlos Rossa** por ter cedido as células NOK, possibilitando a realização deste trabalho.

Aos meus pais, **José Dornelas** e **Francisca Regina**, por sempre me ajudarem e apoiarem minhas decisões. Sem eles nada teria sido possível.

Ao meu irmão **Leonardo**, que quando não estive bem, não hesitou em vir morar comigo até que eu melhorasse.

A **Paulo Figueira** e **Kátia Figueira**, por se tornarem minha família neste estado. Sou grata por terem me acolhido tão bem e por me tratarem como filha. Espero um dia poder recompensá-los por todo o bem que têm me feito.

A meus familiares, em especial **Tia Santana** e **Tio Ivonir** que sempre me estenderam à mão e foram uns dos meus grandes ajudadores na minha mudança para o estado de São Paulo.

## RESUMO

*Candida albicans* é a espécie de *Candida* mais comumente encontrada na cavidade oral. Trata-se de um fungo comensal oportunista que quando em condições predisponentes pode se tornar patogênico. Pacientes diabéticos têm maior taxa de infecções causadas por *C. albicans*, quando comparados a pacientes não diabéticos. Sabe-se também que estes pacientes têm maior nível de glicose salivar, independente se estão controlados ou não. No entanto, ainda não está claro se as infecções orais estão relacionadas com o aumento da glicose salivar. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, os efeitos de duas concentrações de glicose (0,1mM, simulando a condição da glicose na saliva em condições de saúde e 1,0 mM, simulando a concentração de glicose em condições alteradas de saúde) em um biofilme de *Candida albicans* formado sobre uma monocamada epitelial. O experimento foi conduzido com quatro grupos: G1 (monocamada epitelial inoculada com *C. albicans* em meio de cultura adicionado de 1 mM de glicose), G2 (monocamada epitelial inoculada com *C. albicans*, em meio de cultura adicionado de 0.1 mM de glicose), G3 (monocamada epitelial inoculada com *C. albicans*, sem glicose adicionada ao meio) e por fim, G4 (apenas monocamada epitelial). Foram analisados a concentração de lactato desidrogenase (LDH) com objetivo da avaliação do dano tecidual, liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, G-CSF e IL-6) e a arquitetura do biofilme por meio da microscopia confocal a laser. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste de variância e posterior aplicação do teste de Tukey-Kramer. O nível de significância estabelecido foi de 5%. Os resultados demonstraram que a liberação de LDH não foi alterada pela presença de glicose, assim como não houve diferenças estatísticas para todas as citocinas pró inflamatórias entre os grupos G1 e G2. No entanto, a liberação de IL-1 $\alpha$  foi estatisticamente maior no grupo com adição de 1mM de glicose quando comparadas com os grupos G3 e G4, enquanto que a adição de 0,1 mM gerou mais IL-1 $\beta$  quando comparada aos referidos grupos. Para as citocinas GM-CSF, G-CSF e IL-6 não houve diferenças entre os grupos G1, G2 e G3. Em relação à estrutura do biofilme, o grupo G2 parece apresentar um biofilme mais denso que os grupos G1 e G3. Deste modo, pode-se concluir que a glicose parece não afetar diretamente o comportamento da *C. albicans* durante invasão tecidual. Outros mecanismos podem estar envolvidos, fazendo necessário a realização de outros estudos na área.

**Palavras Chave:** *Candida albicans*. Glicose. Citocinas

## ABSTRACT

*Candida albicans* is the most prevalent *Candida* spp. in oral cavity. It is a commensal opportunistic fungus that when in predisposing conditions can become pathogenic. Diabetic patients have a higher rate of *Candida albicans* infections when compared to non-diabetic patients. It is known that these patients have a higher level of salivary glucose, regardless if these patients have poorly controlled diabetes or not. However, it is unclear whether oral infections are related to the increased of salivary glucose. Thus, the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the effects of two glucose concentrations (0.1 mM, simulating the glucose concentration in saliva under health conditions and 1 mM, simulating glucose concentration under altered health conditions) on a *Candida albicans* biofilm grown on an epithelial monolayer. The experiment was conducted with four groups: G1 (epithelial monolayer inoculated with *C. albicans*, with 1 mM glucose added to the culture medium), G2 (epithelial monolayer inoculated with *C. albicans*, with 0.1 mM glucose added to the culture medium), G3 (epithelial monolayer inoculated with *C. albicans*, with no glucose added to the culture medium), and G4 (epithelial monolayer). It was analyzed the Lactate dehydrogenase's (LDH) concentration with the objective of assessing tissue damage, also it was evaluated the release of proinflammatory cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF, G-CSF and IL-6) and biofilm architecture by laser confocal microscopy. The data were statistically analyzed using the variance test and the Tukey-Kramer test. The level of significance was set at 5%. The results demonstrated that the release of LDH was not altered by the presence of glucose, nor were there statistical differences for all proinflammatory cytokines between the G1 and G2 groups. However, the release of IL-1 $\alpha$  was statistically higher in the 1mM glucose group when compared to the G3 and G4 groups, whereas the addition of 0.1mM generated more IL-1 $\beta$  when compared to the referred groups. In addition, for the GM-CSF, G-CSF and IL-6 cytokines there were no differences between the G1, G2 and G3 groups. Regarding the biofilm structure, the G2 group appears to have a denser biofilm than the G1 and G3 groups. Thus, it can be concluded that glucose does not seem to affect the behavior of *C. albicans* during tissue invasion. Further studies in the area are necessary, once others mechanisms can be involved.

**Keywords:** *Candida albicans*. Glucose. Cytokines

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Interações entre <i>Candida albicans</i> e Hospedeiro.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Glicose Salivar e <i>Candida albicans</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Candida* são patógenos comensais e oportunistas (Vautier et al., 2012; Singh et al., 2014) que na presença de fatores locais e sistêmicos podem tornar-se patogênicos (Naglik et al., 2011) que na cavidade bucal pode levar a candidíase. Esses fatores estão relacionados à um desequilíbrio (Gow e Hube, 2012) seja de ordem imunológica do hospedeiro, por exemplo desequilíbrio hormonal e ou imunossupressão, ou na flora microbiana normal (tratamento antibiótico prolongado) (Steele and Wormley, 2012; Vautier et al., 2012; Williams et al., 2013).

*C. albicans*, é a espécie de *Candida* mais prevalente nas infecções fúngicas orofaríngeas e também a espécie mais patogênica (Hiller et al., 2011). Sua patogenicidade está fortemente relacionada a sua característica polimórfica, que possibilita uma transição de sua forma leveduriforme à sua forma filamentosa (Han et al., 2011). Além disso, é importante ressaltar que a capacidade de aderência às superfícies bióticas, como a mucosa do hospedeiro, e abióticas ( superfície da resina acrílica de próteses) é de fundamental importância no desenvolvimento deste fungo (Martin et al., 2011; Williams et al., 2013).

A diabetes mellitus é um distúrbio endócrino decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade de a insulina exercer adequadamente seus efeitos, causando um aumento da glicose sanguínea. A colonização por *Candida spp* é associada com o controle glicêmico, o tipo de diabetes e pH salivar. A hiperglicemia pode contribuir para o risco de infecção por *Candida spp*. ao aumentar os níveis de glicose salivar o que pode promover o crescimento de *Candida spp*. Além disso, estudos tem demonstrado que pacientes diabéticos têm maior taxa de candidíase oral, possuem maior quantidade de células de *Candida* disponíveis na saliva (33,3%) quando comparados a indivíduos não-diabéticos (14,3%), bem como uma maior variedade de espécies de *Candida* resistentes aos antifúngicos azóis (Al-Attas and Amro, 2010). Além disso, paciente diabéticos possuem maior índice de colonizações severas do que indivíduos saudáveis (Pallavan et al., 2014). Neste sentido, faz-se importante estudos na área a fim de compreender a razão desta maior colonização para que infecções sistêmicas sejam evitadas.

A glicose é uma molécula pequena que se difunde através de membrana semipermeável e, portanto, pode ser detectada na saliva, principalmente quando os níveis sanguíneos estão elevados. Isto ocorre pois há uma alteração na membrana basal das glândulas salivares levando à uma maior secreção de glicose (Satish et al., 2014).

A saliva tem papel fundamental na manutenção da saúde bucal, uma vez que possui capacidade tampão, ação lubrificante, atividade antimicrobiana, atua na manutenção da integridade da mucosa oral e reparação de tecidos moles. Os componentes salivares podem sofrer variações que podem ser detectadas por análise química (López et al., 2003; Bernardi et al., 2007). Estudos tem demonstrado correlação significativa entre concentração de glicose salivar e os valores de glicose sanguínea (Abikshyeet et al., 2012; Mascarenhas et al., 2014).

Isto posto, é importante ressaltar que a infecção fúngica mais comumente encontrada em pacientes diabéticos é a candidíase oral, sendo que estudos relatam que pacientes diabéticos possuem maior colonização clínica e subclínica de *Candida* spp. quando comparado à pacientes saudáveis, o que pode torná-los mais propensos a desenvolver uma colonização mais profunda da mucosa, com uma maior disseminação através da corrente sanguínea (Javed et al., 2014; Pallavan et al., 2014). Em estudo realizado por Buu e Chen (2014) observou-se que os níveis de glicose modularam a expressão de aspartil proteinases secretadas (SAP) 4, 5 e 6, genes estes associados à formação de hifas, e, portanto, relacionados ao processo de invasão tecidual.

O nível de glicose salivar elevado pode contribuir para uma maior susceptibilidade do hospedeiro à infecções orais, como a candidíase (Lasisi e Fasanmade, 2012). Pacientes diabéticos apresentam níveis de glicose salivar mais elevados que pacientes não diabéticos (Abikshyeet et al., 2012; Balan et al., 2014; Mascarenhas et al., 2014; Indira et al., 2015), independentemente se os níveis de glicose plasmática estão controlados ou não (Bernardi et al., 2007; Singh et al., 2014). Além disto, devido à maior taxa de transporte de *Candida* spp. e colonização estes

pacientes podem ter uma maior predisposição à infecção (Jurysta et al., 2009; Al-Attas e Amro, 2010; Pallavan et al., 2014).

Associado a isto, o uso de próteses dentárias removíveis pode gerar um microambiente propício para o crescimento de biofilmes em sua superfície. Esse microambiente da interface prótese-mucosa oral apresenta baixos níveis de oxigênio e baixo pH o que, associado à má higienização bucal, má adaptação da prótese e redução do fluxo de saliva sob as superfícies protéticas, pode favorecer o desenvolvimento de um quadro de candidíase (Satish et al., 2014).

Quando em contato com a mucosa do hospedeiro, o biofilme é capaz de desencadear uma resposta imune inata e adaptativa (Salvatori et al., 2016), principalmente dependente de receptores da família TLR (Toll Like Receptor), como TLR2 e TLR4, que são os principais sistemas de reconhecimento para invasores microbianos (Weindl et al., 2007). Estes, presentes nas superfícies mucosas desencadearão a resposta imune inata, através da indução de quimiocinas e citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 $\alpha$  (Interleucina-1alfa), IL-1 $\beta$  (Interleucina-1beta) e GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) que coordenam o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e ativação de macrófagos, gerando uma resposta inflamatória local intensa (Weindl et al., 2007).

A infecção por *Candida* pode causar necrose das células epiteliais (ulceração da mucosa oral *in vivo*) tendo como característica a permeabilização da membrana plasmática (Chan et al., 2013). Uma vez lisadas, as células epiteliais liberam uma enzima intracelular, a lactato desidrogenase (LDH). A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima oxidoreductase bastante estável que catalisa a interconversão de piruvato e lactato. Deste modo, o dano celular pode ser quantificado medindo a liberação da LDH (Li et al., 2007b).

Neste sentido, afim de compreender como *C. albicans* é capaz de infectar e persistir em tecidos, modelos diferentes de interação patógeno-hospedeiro têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados (Hiller et al., 2011). Vários modelos *in vitro* de epitélio oral têm sido utilizados com sucesso (Bao et al., 2014; Hagi-Pavli et al., 2014; Schlage et al., 2014). Estes têm a vantagem de permitir análises em qualquer tempo

de infecção e têm sido amplamente empregados nos estudos de avaliação da relação patógeno-hospedeiro (Dongari-Bagtzoglou e Kashleva, 2006a; Hiller et al., 2011; De Ryck et al., 2014; Cavalcanti et al., 2015). Além disso, o uso de modelos *in vitro* possibilita o isolamento de variáveis de interesse, o que muitas vezes não é possível *in vivo*.

Embora exista estudo quanto à expressão de SAPs relacionadas ao desenvolvimento de hifas na presença de glicose (Buu e Chen, 2014), pouco se sabe acerca do efeito da glicose no processo de invasão tecidual utilizando um modelo com células do epitélio oral humano. Deste modo, faz importante avaliar se os níveis de glicose salivar podem levar à uma maior invasão tecidual por *C. albicans*. Sendo assim, este estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre biofilme em contato com células do epitélio oral humano.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro

As leveduras do gênero *Candida* são patógenos oportunistas frequentemente isolados das superfícies mucosas de indivíduos normais. Algumas espécies de *Candida* residem comensalmente e permanecem inofensivos em aproximadamente metade da população mundial. Apesar destes fungos normalmente não causarem danos à saúde do hospedeiro, sob condições predisponentes, tais como as defesas imunitárias comprometidas ou ainda tratamento antibiótico prolongado, estes fungos podem tornar-se patogênicos e desenvolver a condição clínica denominada candidíase. A interação da *Candida albicans* com as células epiteliais é um fator crítico para a manutenção do estado comensal e patogenicidade do fungo, bem como da defesa do hospedeiro (Naglik et al., 2011; Yang et al., 2014; Salvatori et al., 2016).

*Candida albicans* é um fungo dimórfico e pode se apresentar na forma leveduriforme e filamentosa (com a presença de pseudo-hifas ou hifas). Estas três formas diferem não apenas morfológicamente mas, também, no crescimento e adesão destes fungos às superfícies. A transição da forma leveduriforme para pseudo-hifa ou hifa está fortemente associada à invasão tecidual e à infecção clínica. Esta transição pode ser induzida por fatores locais ou sistêmicos (Feller et al., 2014).

As defesas do hospedeiro compreendem as barreiras mecânicas à penetração fúngica (como as superfícies epiteliais) e mecanismos imunitários inatos e adaptativos. São necessárias apenas discretas alterações no estado fisiológico do hospedeiro para induzir a transformação de *Candida albicans* leveduriforme, normalmente inofensiva, em um patógeno perigoso. Deste modo, estudos tem relatado a importância da defesa do hospedeiro na manutenção de *C. albicans* no estado comensal e o potencial de virulência de *C. albicans* na presença de condições predisponentes (van de Veerdonk et al., 2010; Gow et al., 2011; Naglik et al., 2011, 2014).

As células epiteliais constituem a primeira linha de defesa contra microrganismos. Uma vez que, infecções sistêmicas potencialmente fatais podem

surgir por meio da quebra da barreira mucosa, é de suma importância compreender como *C. albicans* interage com as células epiteliais e como este fungo se restringe à superfície da mucosa no estado de saúde. A progressão da infecção das células epiteliais orais por *C. albicans* é caracterizada por três estágios distintos: a adesão, invasão (esta pode ser através de duas vias diferentes, penetração ativa e endocitose induzida) e por fim dano tecidual (Naglik et al., 2011; Wächtler et al., 2012a; Hebecker et al., 2014; Yang et al., 2014).

Em estudo realizado por Wächtler et al. (2011) foi investigado a base molecular das interações de *C. albicans* com o epitélio, através de um ensaio com 26 mutantes de *C. albicans* que não possuíam fatores supostamente importantes para a invasão epitelial (incluindo componentes de sinalização, fatores de adesão, vacúolos) e avaliou a capacidade destes fungos de aderir, bem como de invasão e dano às células epiteliais orais. Os autores corroboraram com o conceito de que a formação de hifas é crítica para a invasão epitelial, sendo que a invasão consiste em uma combinação de fatores: contato entre hifas e células epiteliais, extensão de crescimento de hifas, penetração ativa, expressão de fatores de patogenicidade para mais invasão epitelial, disseminação nos tecidos e, por fim, dano tecidual.

A capacidade de *C. albicans* aderir às células epiteliais é fundamental para colonização e crescimento comensal em superfícies mucosas, enquanto que invasão e dano celular são atividades específicas que ocorrem durante a infecção. Para ocorrer a adesão, é necessário a interação da parede celular fúngica e a superfície das células epiteliais, podendo esta ser não específica (hidrofobicidade) ou específica (proteína-proteína). Trata-se de um processo complexo com envolvimento de diversos tipos de adesinas sobre a superfície celular fúngica que está continuamente sendo modificada (Moreno-Ruiz et al., 2009; Liu e Filler, 2011; Naglik et al., 2011). Além disso, a interação física entre *C. albicans* na forma de levedura e as células epiteliais é um importante estimulador para o desenvolvimento de hifas (Wächtler et al., 2011).

A formação de hifas permite um íntimo contato entre a célula fúngica e as células do hospedeiro. Esta interação resulta no reconhecimento ligante-receptor pelas células do hospedeiro, envelopamento da hifa por uma estrutura derivada da membrana semelhante à pseudópodes e captação da célula fúngica. Este estágio

inicial de formação de hifas, adesão e endocitose é seguido pela fase de invasão, que é caracterizada pela penetração epitelial da hifa patologicamente, levando ao dano tecidual. É importante ressaltar que a invasão é mediada predominantemente por penetração ativa, e não é dependente de mecanismos celulares do hospedeiro, entretanto, estes processos não são mutuamente exclusivos, podendo acontecer ao mesmo tempo (Naglik et al., 2011). Outro aspecto relevante é que a formação de hifas e invasão inicial não são necessariamente suficientes para causar dano celular, uma vez que após adesão e internalização inicial, é necessária uma combinação de penetração ativa da *C. albicans*, extensão da hifa e expressão de novos fatores de patogenicidade para invasão mais profunda dos tecidos (Wächtler et al., 2011).

*C. albicans* se liga às células dos hospedeiros através da utilização de adesinas em sua superfície. A família de adesina mais descrita na literatura como tendo um papel principal na ligação epitelial é a família Als, em especial a Als3. A Als3 é uma proteína específica da hifa que medeia ligação às células epiteliais, células endoteliais e proteínas da matriz extracelular, uma vez que se liga a receptores de E-caderina e N-caderina induzindo, deste modo, endocitose pelo hospedeiro. Neste sentido, outra adesina importante é Hwp1 (Hyphal wall protein 1), que é expressa na superfície das células fúngicas, mais especificamente na superfície das hifas (Liu e Filler, 2011).

Neste sentido, é importante ressaltar que a parede celular fúngica possui diferentes classes de proteínas que podem interagir com ligandos nas células epiteliais. A classe mais abundante de proteína da parede celular são as proteínas glicosilfosfatidilinositol (GPI). Als3 e Hwp1 agem como adesinas diretas e estão relacionados à GPI, contudo, só são expressos nas hifas. Outras proteínas da parede celular independente da morfologia da *Candida* medeiam a adesão das células fúngicas às epiteliais. Neste sentido, a Eap1 é uma proteína GPI e tem homologia estrutural com a família Als (Liu e Filler, 2011; Naglik et al., 2011; Wächtler et al., 2012a).

Li et al. (2007a) avaliaram o papel do gene EAP1 de *C. albicans*. Este gene codifica uma proteína da parede celular ancorada com glicosilfosfatidilinositol, na adesão e formação de biofilme *in vitro* e *in vivo*. Os autores observaram que a eliminação de EAP1 reduziu a adesão celular às células epiteliais e às superfícies de

poliestireno, bem como a expressão de EAP1 foi necessária para a formação de biofilmes de *C. albicans in vitro* e *in vivo*. Fu et al. (2008) avaliaram a expressão do gene *Iff4*, outra proteína GPI, e observaram que a expressão desse gene aumentou a adesão de *C. albicans* às células epiteliais humanas e à superfície de poliestireno, contudo, não houve aumento na adesão às células endoteliais.

No que concerne à invasão de *C. albicans* nos tecidos, este fungo utiliza dois mecanismos distintos de invasão, a endocitose e a penetração ativa. A endocitose é mediada pela células epiteliais, enquanto que a penetração ativa é mediada pelo fungo (Wächtler et al., 2012b). Uma vez que as células fúngicas na forma de levedura não parecem induzir sua captura pelas células epiteliais, fica evidente que a invasão epitelial seja ela passiva ou ativa, é desencadeada por fatores associados a hifas (Naglik et al., 2011; Wächtler et al., 2011, Wächtler et al., 2012).

A endocitose é o processo no qual as proteínas invasinas expressas na superfície das hifas interage com as proteínas de superfície das células epiteliais, desencadeando a formação de pseudópodes e envelopamento das células fúngicas. Trata-se de um processo passivo, uma vez que hifas são endocitadas independentemente de estarem viáveis ou não demonstrando, assim, que o processo é mediado pelas células epiteliais (Hebecker et al., 2014). Em estudo realizado por Park et al. (2005) foi elucidado que a *C. albicans* invade as camadas celulares epiteliais orais induzindo sua própria endocitose. Sendo que a internalização de *C. albicans* é acompanhada pela formação de tubos compostos de microfilamentos das células epiteliais que circundavam as hifas. Deste modo, os autores concluíram que a endocitose induzida e a penetração ativa são mecanismos de invasão claramente distintos, sendo que hifas viáveis de *C. albicans* invadem as células epiteliais orais através de ambas as vias.

Em estudo realizado por Wächtler et al. (2012), os autores objetivaram elucidar a importância relativa da endocitose induzida versus penetração ativa durante processo de invasão epitelial. Nas primeiras 3 h de infecção, a penetração ativa representou aproximadamente 70% do potencial de invasão de *C. albicans*. Além disso, os autores observaram que a endocitose induzida mediada por Als3 contribui consideravelmente para os primeiros pontos de tempo de invasão, enquanto a

penetração ativa representa o modo de invasão epitelial dominante. Apesar da endocitose induzida depender das interações de Als3-E-caderina, os autores observaram que a endocitose também foi induzida independente de E-caderina. Sendo assim, embora a interação Als3-E-caderina represente um mecanismo principal de endocitose induzida, existem outros mecanismos específicos, sendo que estes, bem como os receptores envolvidos, ainda permanecem desconhecidos. Em estudo realizado por Moreno-Ruiz et al. (2009) observou-se ainda que esse processo é mediado pela E-caderina através de um mecanismo que requer clatrina e é actina-dependente, corroborando com Zhao e Villar (2011).

Segundo Zhao e Villar (2011) uma vez que a *C. albicans* é endocitada, ela ganha acesso ao compartimento vacuolar endossomal. Após a internalização, os microrganismos são revestidos por um endossoma ligado à membrana e direcionados para lisossomas para degradação. Os autores observaram que 30% das células de *C. albicans* internalizadas foram circundados por um marcador endocítico inicial (EEA1), porém apenas 10% tornaram-se associados com marcadores endocíticos tardios (LAMP1) ou lisossômicos (cathepsin D). Desta forma, a *C. albicans* resiste à destruição por macrófagos ao interferir na maturação endolisossômica clássica no estágio inicial do endossoma. Deste modo, as hifas endocitadas de *C. albicans* impedem a maturação endolisossomal, o que pode promover o crescimento fúngico intracelular. Esta estratégia de sobrevivência permite que *C. albicans* sobreviva por períodos prolongados dentro das células epiteliais, até que a hifa penetre para fora da célula para infectar células vizinhas, resultando em necrose e dano celular.

As células epiteliais compreendem o primeiro tipo celular da superfície da mucosa, deste modo são as células que primeiro entram em contato com a *Candida albicans* e, portanto, são a primeira linha de defesa contra este patógeno. Os queratinócitos iniciam as respostas imunes inatas e adaptativas contra a *C. albicans*. A ativação epitelial por *C. albicans* resulta na indução de moléculas imunológicas, como citocinas e quimiocinas, tais como fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), interleucina-1alfa (IL-1 $\alpha$ ), Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8). A indução de citocinas está correlacionada com a formação de hifas, uma vez que, cepas de *Candida* que não se diferenciam da forma de levedura

para filamentosa, ou são incapazes de produzir ou manter hifas não induzem respostas imunes (Hebecker et al., 2014).

## **2.2 Glicose Salivar e *Candida albicans***

O nível de glicose salivar pode interferir na susceptibilidade do hospedeiro à infecções orais, tais como a candidíase (Lasisi e Fasanmade, 2012). Neste sentido, pacientes diabéticos apresentam níveis de glicose salivar mais elevados que pacientes não diabéticos (Abikshyeet et al., 2012; Balan et al., 2014; Mascarenhas et al., 2014; Indira et al., 2015), contudo, ainda não está claro como essa alteração na glicose salivar influencia no processo de invasão tecidual.

No estudo desenvolvido por Al-Attas e Amro (2010) foi avaliado a colonização oral por *Candida* spp. em pacientes adultos diabéticos, sua diversidade de espécies, suscetibilidade aos antifúngicos e a influência de fatores locais e sistêmicos do hospedeiro. Foi encontrado que os pacientes diabéticos têm uma maior prevalência de candidíase oral, mas não diferem em densidade quando comparados ao controle. Embora *C. albicans* foi o isolado predominante, uma variedade de outras espécies de *Candida*, com menos susceptibilidade aos antifúngicos azóis, foram identificados em diabéticos. A colonização de leveduras foi maior nos diabéticos tipo 1 que tipo 2, uma vez que os diabéticos tipo 1 apresentaram maiores valores médios de Hemoglobina Glicada (HbA1c) e pior controle glicêmico. A colonização por *Candida* spp. foi significativamente associada com o controle glicêmico, o tipo de diabetes, e pH salivar. De acordo com o autor, a hiperglicemia pode contribuir para o risco de infecção por candidíase, ao aumentar os níveis de glicose salivar, o que pode promover o crescimento de *Candida* spp.

Mascarenhas et al. (2014) realizou uma revisão sistemática com meta-análise de estudos observacionais disponíveis na literatura, bem como resultados inéditos do próprio autor acerca dos níveis de glicose salivar em pacientes diabéticos tipo 2 e em indivíduos saudáveis, além disso analisou estudos de correlação entre os níveis de glicose no saliva e glicemia / Hemoglobina Glicada (HbA1c) a fim de avaliar a eficácia da glicose salivar para estimar a glicemia e HbA1c. Os autores concluíram que a diabetes tipo 2 tem um efeito positivo de médio à forte sobre os níveis de glicose

salivar. Além disso há uma correlação significativa entre concentração de glicose salivar e os valores de glicemia/HbA1c associados, com a força de correlação aumentando à medida que os valores de glicemia/HbA1c aumentam. Além disso, a revisão concluiu que há um aumento significativo de glicose salivar em pacientes diabéticos tipo 2 e uma relação significativa entre a concentração de glicose salivar e os valores da glicemia / HbA1c associados, com força de correlação crescente para valores mais elevados de glicemia/HbAc1.

Singh et al. em 2014, avaliou e comparou os níveis de glicose salivar e plasmática em pacientes diabéticos controlados e não controlados, bem como de um grupo controle (não diabéticos). O estudo confirmou que altos níveis de glicose salivar e plasmática são encontrados nos pacientes diabéticos (controlados e não controlados) e que existe uma relação entre glicose salivar e plasmática nestes pacientes. Ou seja, independente do paciente diabético estar controlado ou não, ele apresenta níveis de glicose salivar mais elevados que pacientes não diabéticos.

Contudo, ainda há na literatura uma divergência sobre a origem da alteração de glicose salivar em pacientes diabéticos. Uma vez que, a hiperglicemia persistente pode levar à alterações microvasculares nos vasos sanguíneos e na membrana basal das glândulas salivares, podendo levar a um aumento do teor de glicose na saliva. Deste modo, a glicose salivar pode não ser diretamente influenciada pela hiperglicemia, mas sim por fatores de confundimento, o grau de controle metabólico e extensão dos danos da glândula salivar. Isto posto, o nível de glicose varia de acordo o tipo de amostra de saliva. O estado da glândula salivar pode influenciar o nível de glicose na saliva (Balan et al., 2014).

Parâmetros salivares como fluxo, capacidade tampão e concentração da glicose na saliva têm sido avaliados em pacientes diabéticos, contudo, observa-se resultados conflitantes que podem estar relacionados às técnicas utilizadas, diferenças na composição da amostra ou hábitos nutricionais destas, além de serem realizados em diferentes localizações geográficas. Além disso, a maioria das informações sobre o fluxo de saliva e diabetes é sobre a forma de tipo 1 e, portanto, mais estudos devem ser realizados relacionados ao tipo 2. Neste sentido, faz-se importante avaliar outros aspectos envolvidos, tais como a avaliação de parâmetros

salivares como pH, variação de fluxo, nível de glicose, capacidade tampão e xerostomia. Bernardi et al. (2007) analisou estas características em saliva estimulada de pacientes diabéticos bem e mal controlados e observou que pacientes diabéticos apresentaram taxa de fluxo salivar e níveis de glicose diferentes do grupo controle, não importando se a diabetes era bem ou mal controlada.

Contudo, como neste estudo foi utilizada saliva estimulada, ainda era necessário entender como se dava a concentração de glicose em pacientes diabéticos e não diabéticos avaliando a saliva não estimulada. Neste contexto, Jurysta et al. (2009) avaliou a concentração e excreção de glicose em saliva não estimulada e mecanicamente estimulada em sujeitos não diabéticos e diabéticos. Como conclusão o estudo obteve que em indivíduos não diabéticos foi observada uma diminuição na concentração de glicose salivar com o aumento do fluxo salivar, mas a taxa de excreção de glicose foi inalterada quando comparada saliva estimulada com saliva não estimulada. Nos pacientes diabéticos, observou-se um aumento no fluxo salivar com concentração de glicose salivar e excreção de glicose inalterada. Tanto a concentração de glicose salivar quanto a excreção foram muito mais elevadas em pacientes diabéticos do que nos controles, seja na saliva não estimulada ou estimulada.

Outro aspecto importante é a prevalência de infecção por *Candida* spp. quando comparada quantitativamente com o transporte de *Candida* na saliva, bem como a relação entre transporte de *Candida* em pacientes diabéticos e não diabéticos. Neste sentido, sabe-se que tanto o transporte de *Candida* quanto a infecção são maiores em pacientes diabéticos do que em pacientes não diabéticos (Lamey et al., 1988). Neste sentido, ainda não se sabe ao certo porque pacientes diabéticos desenvolvem mais candidíase e se faz necessário avaliar se este fato está relacionado com o aumento de glicose salivar.

### 3 PROPOSIÇÃO

#### 3.1 Objetivo geral

Nesse estudo foi avaliado, *in vitro*, os efeitos de duas concentrações de glicose (0,1 mM, simulando a condição da glicose na saliva em condições de saúde e 1,0 mM, simulando a concentração de glicose em condições alteradas de saúde) (Ccahuana-Vásquez e Cury, 2010; Balan et al., 2014; Singh et al., 2014) em um biofilme de *Candida albicans* formado sobre uma monocamada epitelial.

##### 3.1.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliação do dano celular pela detecção de lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células epiteliais
- b) Avaliação da liberação das citocinas pró inflamatórias: Interleucina-1alfa (IL-1 $\alpha$ ), Interleucina-1beta (IL-1 $\beta$ ), Interleucina-6 (IL-6), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) produzidas pelos queratinócitos em resposta à presença de *C. albicans*
- c) Visualização da arquitetura do biofilme de *C. albicans* formado sobre a monocamada de queratinócitos

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Delineamento experimental

No presente estudo os fatores foram a presença de diferentes concentrações de glicose na formação de biofilme de *C. albicans* sobre uma monocamada epitelial. Os grupos estudados foram:

G1: Monocamada epitelial inoculada com células de *C. albicans* cujo meio de cultura continha 1 mM de glicose

G2: Monocamada epitelial inoculada com células de *C. albicans* cujo meio de cultura continha 0.1 mM de glicose

G3: Monocamada epitelial inoculada com *C. albicans* cujo meio de cultura não continha glicose;

G4: Monocamada epitelial

A cepa de referência de *C. albicans* (ATCC 90028) foi inoculada ( $10^5$  céls./poço) sobre monocamada de células epiteliais humanas. Após 16 horas de incubação à 37°C e 10% CO<sub>2</sub>, o meio de cultura (sobrenadante), a monocamada e o biofilme de *C. albicans* foram coletados para as análises. O sobrenadante foi utilizado para a determinação de interleucinas pró inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF e GM-CSF). A quantificação do dano epitelial foi avaliada pela detecção de lactato desidrogenase (LDH) liberada (Li et al., 2007b). A arquitetura do biofilme foi avaliada em microscópio confocal a laser através da hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). O experimento foi realizado em triplicata (n=12) e as análises em duplicata para cada um dos experimentos.

### Meio de cultura e condições de crescimento dos queratinócitos

Queratinócitos orais humanos espontaneamente imortalizados (NOK-SI) (Dias, 2010), foram cultivados em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco®) suplementado com 10% FBS e 1% antibiótico, à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias até que as células atingissem subconfluência (70-80% de confluência), quando então foram semeadas  $10^5$  células/poço em placas de 24 poços para a formação de monocamadas epiteliais.

O meio de cultura dos poços foi trocado a cada 24 horas até que as células atingissem total confluência, quando então, foi realizado a inoculação com *C. albicans*. O experimento foi realizado em triplicata.

### **Inoculação de *C. albicans* sobre queratinócitos**

Culturas de estoque de *C. albicans* (ATCC 90028) mantidas à -80°C foram reativadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA), uma semana antes de cada experimento. No período de 16 horas antes do experimento, estas colônias de *C. albicans* foram semeadas em caldo Low Molecular Weight (LMW) e incubadas sob condições aeróbias, à temperatura de 37°C. Após o período de overnight, o inóculo foi centrifugado, ressuspendido com tampão fosfato-salino (PBS) e as células contadas em câmara de Neubauer, a fim de padronizar o inóculo em 10<sup>5</sup> células/mL. Para realizar a inoculação da monocamada, o meio DMEM foi removido e 1 mL de DMEM contendo 10<sup>5</sup> células/ mL de *C. albicans*, suplementado com glicose ou não, foram dispostos sobre a monocamada epitelial para os grupos G1, G2 e G3. Para o grupo G4 foi realizada a troca do meio sem adição de glicose e *C. albicans*. Uma lamínula foi disposta no fundo do poço de amostras de cada grupo, a fim de que as células e biofilme, pudessem ser levados ao confocal. Após período de 16 horas de incubação, o sobrenadante e os biofilmes/camada celular foram coletados e analisados.

### **Coleta do meio e fixação da monocamada para análise**

Após incubação por 16 horas, o meio de cultura foi coletado e utilizado para quantificação de citocinas pró-inflamatórias e avaliação do dano tecidual foi avaliado pela detecção de LDH. Em seguida, a camada celular e biofilme foram cuidadosamente lavados com PBS, fixados com paraformolaldeído 4% durante o período de 1 hora e, por fim, armazenados em álcool 50°GL até a realização da hibridização do biofilme e sua visualização por microscopia confocal a laser.

### **Análise do dano tecidual pela detecção de lactato desidrogenase (LDH)**

A liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura foi determinada como um indicador de dano celular, tendo como controle negativo a monocamada não infectada grupo G4 (Bertolini et al., 2015). Para tanto, foi utilizado o Kit de detecção de citotoxicidade específico para LDH (MAK066 Sigma Aldrich) contendo L-Lactato desidrogenase (L-LDH), de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante. Foi utilizado uma placa de 96 poços, onde o sobrenadante do meio de cultura previamente coletado, bem como a curva padrão foram lidos com a utilização de espectrofotômetro em um comprimento de onda de 450 nm em intervalos de 5 minutos até que um poço das amostras ultrapasse o valor de absorbância do poço mais concentrado da curva padrão. O experimento foi realizado em duplicata.

### **Análise da liberação de citocinas pró-inflamatórias**

Para a determinação das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF e G-CSF) foi utilizado o kit Milliplex HCYTO60k-05. O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante utilizando a tecnologia Luminex xMAP (Multiple Analyte Profiling) (Moncunill et al., 2013). O experimento fundamenta-se no imunoensaio, onde anticorpos de captura específicos para cada analito encontravam-se ligados à microesferas de látex (coradas com dois fluoróforos). As amostras, bem como os padrões, foram adicionadas aos poços contendo o mix das microesferas acopladas aos anticorpos de captura.

Após a ligação do analito aos anticorpos de captura, um o anticorpo de detecção biotinilado foi adicionado para ligação ao analito específico. Estes foram então incubados com o conjugado reporter estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) para amplificação do sinal. A SA-PE então, ligou-se ao anticorpo biotinilado, emitindo sinal fluorescente. As microesferas foram lidas no equipamento Luminex 200 - Software xPonent/Analyst versão 4.2, este, movimentava as esferas em fila única através de feixes de dois lasers diferentes em um citômetro de fluxo. O primeiro feixe de laser detecta (classifica) a microesfera (baseado no código de cor específico) e o segundo laser quantifica o sinal de reporter em cada microesfera. Ao passarem pelo fluxo celular Luminex, cada microesfera foi identificada e o sinal SA-PE associado a elas foi quantificado. A quantificação das amostras foi determinada a partir da curva padrão,

para tanto, não foi necessária diluição das amostras para dosagem das citocinas. O meio de cultura foi utilizado como background e o resultado final foi obtido em pg/mL.

### **Análise estrutural do biofilme por Microscopia confocal a laser**

Para análise qualitativa do biofilme formado sobre a monocamada de queratinócitos foi utilizada a técnica de hibridização (Wang, 2011; Cavalcanti et al., 2015). Trata-se de uma técnica que se baseia na formação *in vitro* de uma fita de ácido nucléico complementar à sequência de interesse (sonda de DNA) marcada com um fluoróforo. O biofilme foi fixado com paraformaldeído 4% por 1 hora e, posteriormente, armazenado em álcool 50°GL. As amostras foram imersas em solução de lisozima 70.000 U/mL a fim de permeabilizar a parede celular fúngica. Após o período de 10 minutos, as amostras foram lavadas com solução salina e então, pré-incubadas à 46°C imersas na solução tampão de hibridização. Após período de 15 minutos foi adicionado ao poço 5 µL da sonda EUK516 (ACCAGACTTGCCCTCC) marcada com Alexa Fluor 532 e a incubação seguiu por mais 3 horas. As amostras foram então lavadas com tampão de lavagem à 48°C por 15 minutos e posteriormente, o excesso da solução foi removido e as amostras montadas com 10 µL de Mowiol sobre a lamínula. As amostras foram acondicionadas sob abrigo da luz e levadas para visualização em microscópio de varredura confocal a laser no comprimento de onda de 532 nm. As imagens foram capturadas com um sistema CLSM (Leica Microsystems CMS, Mannheim, Alemanha) 27, em intervalos de 1 µm no eixo Z. Estas, foram reconstruídas no programa ImageJ a fim de obtermos uma visão tridimensional do biofilme. Foram escolhidos 5 sítios aleatórios em cada extremidade e ao centro dos espécimes. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle sem infecção G4.

### **Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância por meio de um modelo linear generalizado misto. A adequação do modelo foi avaliada por meio da aderência dos resíduos à distribuição gaussiana o que foi avaliado por meio do teste de Shapiro-Wilk, dos coeficientes de assimetria e curtose e de diagramas (histograma e QQplot). Variáveis significativas de acordo com a análise de variância tiveram as médias

comparadas duas a duas por meio do teste de Tukey-Kramer. Os dados foram analisados por meio do sistema SAS e em todos os testes estatísticos foi arbitrado o nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) e intervalo de confiança de 95%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Liberação de Lactato Desidrogenase

A avaliação da liberação de lactato desidrogenase mostrou que não houve diferença estatística entre os grupos, demonstrando que a adição de glicose não interferiu na liberação de LDH (tabela 1), mesmo considerando a alta concentração de 1mM.

Tabela 1. Comparação da liberação de lactato desidrogenase (miliunidades)

Grupos	Média ± Desvio Padrão (miliunidades)	Interv. Conf. (95%)		
		Superior	Inferior	
G1	0,003±0,003	0,026	-0,020	A
G2	0,001±0,008	0,022	-0,020	A
G3	-0,005±0,003	0,021	-0,032	A
G4	0,013±0,002	0,017	0,010	A

Médias com letras iguais não diferem entre si (teste F; Tukey-Kramer  $p < 0,05$ )

A comparação de médias entre os grupos para liberação de LDH é ilustrada na figura 1.

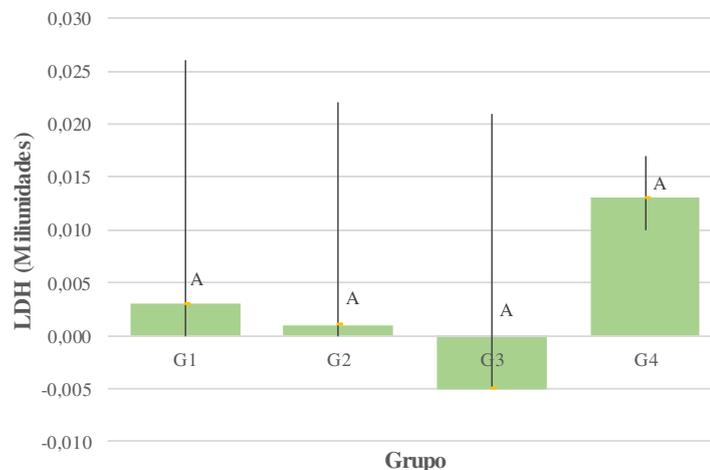


Figura 1. Valores de liberação de lactato desidrogenase entre os grupos, média±desvio padrão. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si, nível de significância de 5%.

### 5.1. Liberação de Citocinas pró-inflamatórias

Em relação a liberação da citocina IL-1 $\alpha$ , observou-se que a citocina foi modulada após inoculação com *C. albicans*. O grupo G1 foi estatisticamente mais

elevado que o grupo G3 e G4, contudo, esta diferença não foi observada entre o grupo G1 e G2, demonstrando assim que o aumento da concentração de glicose no grupo experimental não foi suficiente para alterar a liberação da citocina IL-1 $\alpha$  (tabela 2).

Tabela 2. Comparação da liberação de IL-1 $\alpha$  (pg/mL) entre os grupos, média $\pm$ desvio padrão; intervalo de confiança 95%

Grupos	Média $\pm$ Desvio Padrão (pg/mL)	Interv. Conf. (95%)		
		Superior	Inferior	
G1	26,937 $\pm$ 1,512	30,692	23,181	A
G2	22,353 $\pm$ 2,144	27,679	17,027	AB
G3	18,227 $\pm$ 3,068	25,847	10,607	B
G4	2,837 $\pm$ 0,898	5,066	0,607	C

Médias com letras iguais não diferem entre si (teste F; Tukey-Kramer  $p < 0,05$ )

A comparação de médias entre os grupos para liberação de IL-1 $\alpha$  é ilustrada por meio da figura 2.

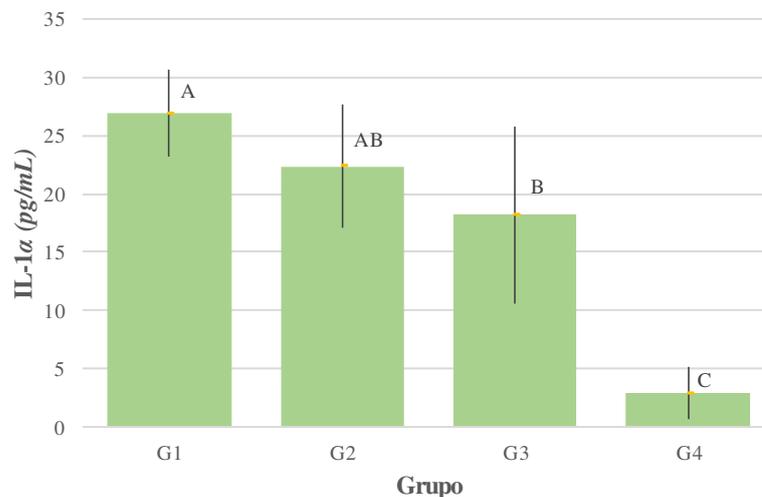


Figura 2. Valores de IL-1 $\alpha$  (pg/mL) entre os grupos, média $\pm$ desvio padrão. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si ( $p > 0,05$ )

Quanto à liberação da citocina IL-1 $\beta$ , o grupo contendo 0.1mM de glicose (G2) foi estatisticamente maior quando comparado aos grupos G3 e G4 ( $p < 0,05$ ), contudo, novamente não houve diferença estatística entre os grupos G1 e G2. Deste modo, entende-se que a diferença de glicose adicionada nos grupos G1 e G2 ( $p > 0,05$ ) não

foi suficiente para os diferenciar entre si, mas suficiente para diferenciar o grupo G2 do G3 e G4 (tabela 3).

Tabela 3. Comparação da IL-1 $\beta$  (pg/mL) entre os grupos média $\pm$ desvio padrão; intervalo de confiança 95%

Grupos	Média $\pm$ Desvio padrão (pg/mL)	Interv. Conf. (95%)		
		Superior	Inferior	
G1	1,025 $\pm$ 0,134	2,232	-0,182	AB
G2	1,150 $\pm$ 0,042	1,531	0,769	A
G3	0,850 $\pm$ 0,035	0,936	0,764	B
G4	0,840 $\pm$ 0,030	0,915	0,765	B

Médias com letras iguais não diferem entre si (teste F; Tukey-Kramer  $p < 0,05$ )

Os resultados para IL-1 $\beta$  são ilustrados na figura 3.

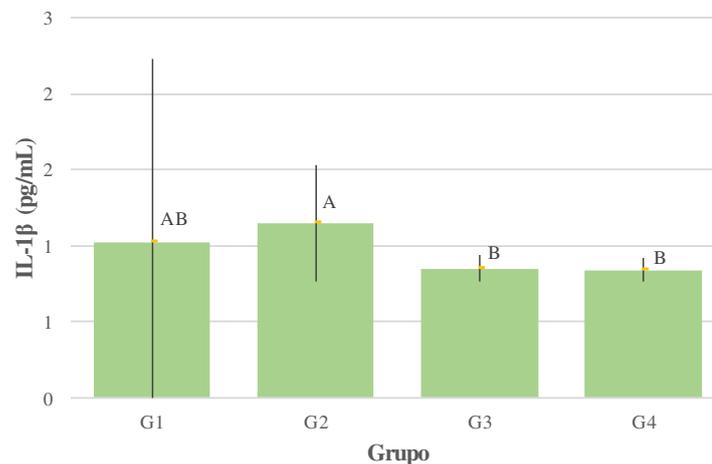


Figura 3. Valores de IL-1 $\beta$  (pg/mL) entre os grupos, média $\pm$ desvio padrão. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

A citocina IL-6 foi modulada positivamente em relação à inoculação, uma vez que os grupos G1, G2 e G3 não diferiram entre si, contudo, todos diferiram estatisticamente do grupo G4 que apresentou a menor liberação de IL-6. Resultado este esperado considerando que essa liberação foi dada pela monocamada sem o biofilme de *C. albicans*. (tabela 4).

Tabela 4. Comparação da IL-6 entre os grupos (média±desvio padrão; intervalo de confiança)

Grupos	Média± Desvio padrão (pg/mL)	Interv. Conf. (95%)		
		Superior	Inferior	
G1	6,037±0,388	7,000	5,074	A
G2	6,147±0,206	6,658	5,635	A
G3	5,153±0,456	6,286	4,020	A
G4	4,013±0,437	5,098	2,929	B

Médias com letras iguais não diferem entre si (teste F; Tukey-Kramer  $p < 0,05$ )

A figura 4 ilustra as médias para liberação de IL-6 entre os grupos.

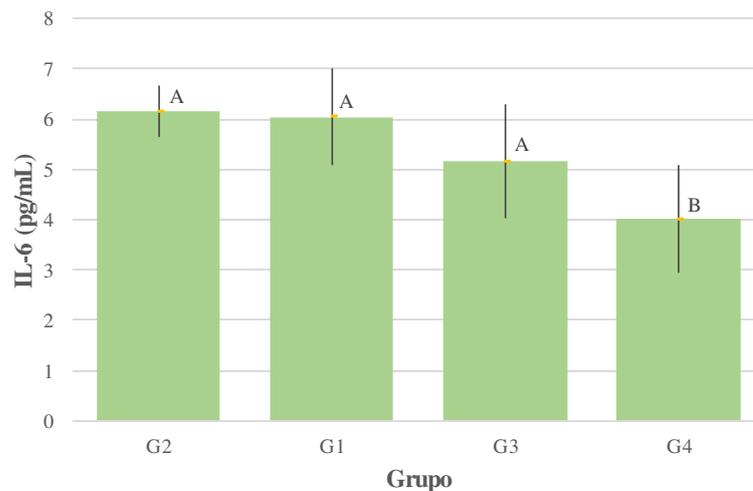


Figura 4. Valores de IL-6 (pg/mL) entre os grupos, média±desvio padrão. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Em relação à liberação de G-CSF observou-se que o grupo G2 liberou mais a referida citocina, com diferença estatisticamente significativa, em relação ao grupo G4, entretanto, não se obteve diferença entre os grupos inoculados com *C. albicans* G1, G2 e G3 (tabela 5). Demonstrando assim que a presença do fungo foi mais importante na liberação de G-CSF, em detrimento à adição de glicose ou não.

Tabela 5. Comparação da liberação de G-CSF (pg/mL) média±desvio padrão; intervalo de confiança 95%

Grupos	Média ± Desvio padrão	Interv. Conf. (95%)		
		Superior	Inferior	
G1	0,825±0,134	2,032	-0,382	AB
G2	0,857±0,110	1,129	0,584	A
G3	0,570±0,000	-	-	AB
G4	0,510±0,121	0,811	0,209	B

Médias com letras iguais não diferem entre si (teste F; Tukey-Kramer  $p < 0,05$ )

A figura 5 ilustra as médias entre os grupos para liberação de G-CSF nos grupos avaliados.

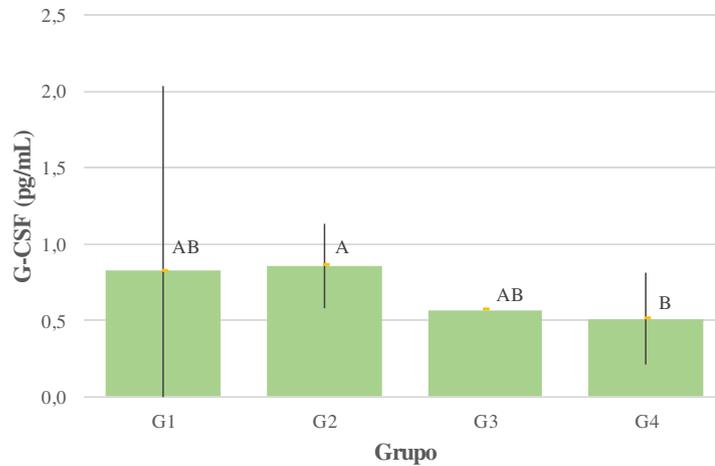


Figura 5. Valores de G-CSF (pg/mL) entre os grupos, média±desvio padrão. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si ( $p>0,05$ )

Quanto à citocina GM-CSF, não se obteve diferença estatística entre os três grupos infectados, demonstrando mais uma vez que a adição de glicose em si não foi capaz de induzir maior liberação de GM-CSF. Contudo, é importante observar que quando comparados ao grupo sem inoculação, o grupo com adição de 0.1mM de glicose foi o único grupo que diferiu com uma média mais elevada e estatisticamente significativa (tabela 6).

Tabela 6. Comparação da liberação de GM-CSF (pg/mL) entre os grupos média±desvio padrão; intervalo de confiança 95%

Grupos	Média± Desvio padrão (pg/mL)	Lim. Conf. (95%)		p<0,0378
		Superior	Inferior	
G1	7,440±0,737	9,270	5,610	AB
G2	8,423±0,437	9,510	7,337	A
G3	6,880±1,838	11,445	2,315	AB
G4	5,347±0,472	6,520	4,173	B

Médias com letras iguais não diferem entre si (teste F; Tukey-Kramer  $p<0,05$ )

A comparação de medias de liberação de GM-CSF entre os grupos estudados é ilustrada por meio da figura 6.

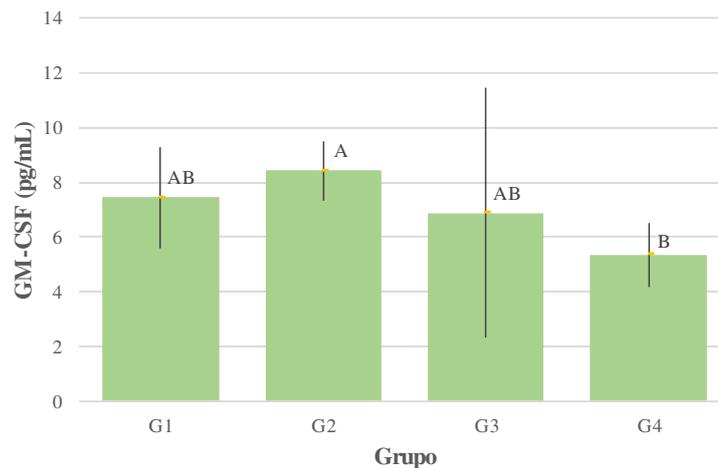


Figura 4. Valores de GM-CSF (pg/mL) entre os grupos, média±desvio padrão. Barras com letras iguais indicam médias que não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

### 5.3. Arquitetura do biofilme de *C. albicans*

Quando observado as imagens de microscopia confocal a laser do biofilme de *C. albicans*, nota-se que o biofilme com adição de 0.1mM de glicose parece ser levemente mais espesso. Contudo, tal afirmativa não pode ser realizada uma vez que se trata de uma análise qualitativa. Mais estudos devem ser realizados a fim de calcular a biomassa dos biofilmes. A figura 7 ilustra o biofilme de *C. albicans* nos grupos G1(A), G2(B) e G3(C) respectivamente. Como no grupo G4 a *C. albicans* era ausente, ao levar ao microscópio nenhum sinal de fluorescência foi emitido.

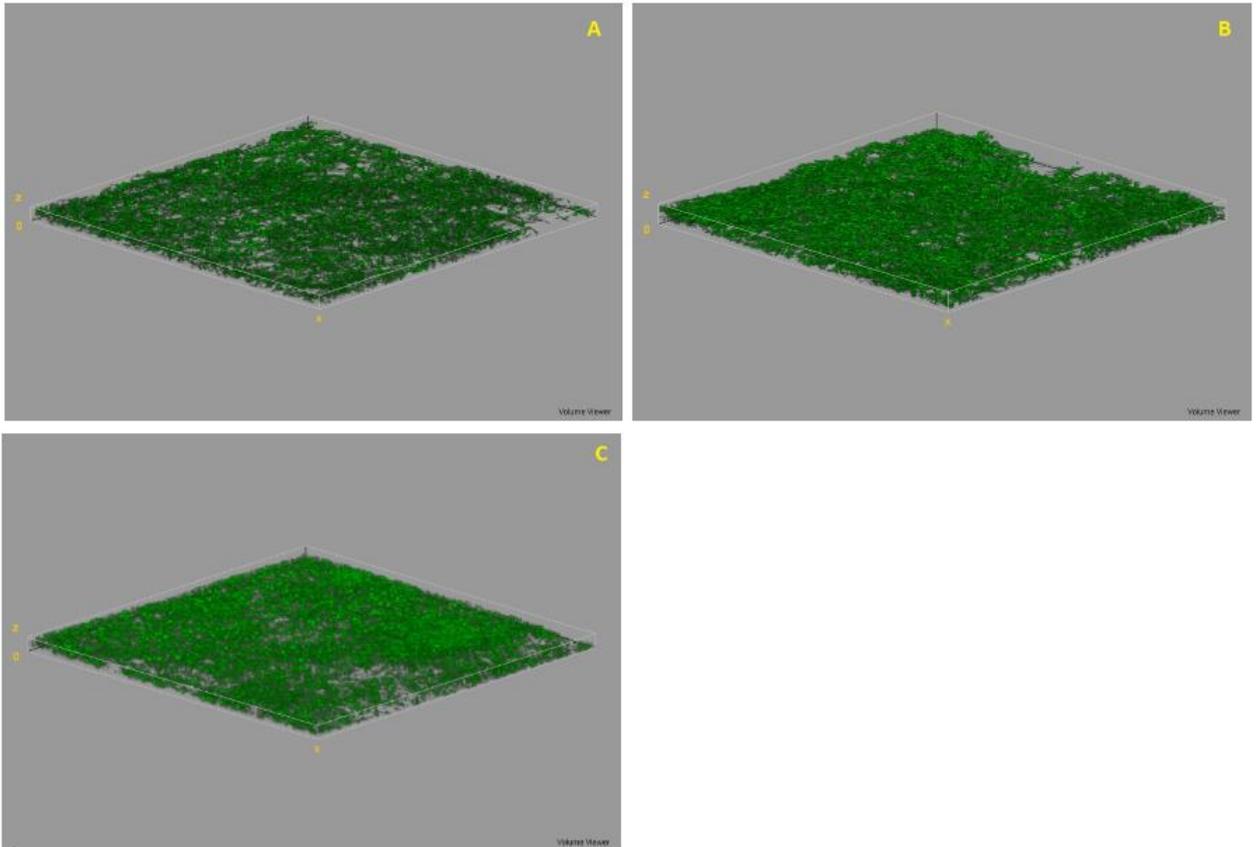


Figura 7. Imagens de microscopia confocal a laser, visualização dos biofilmes nos grupos G1(A), G2(B) e G3(C), respectivamente. O grupo G4, por não ter sido inoculado, não houve emissão de fluorescência.

## 6 DISCUSSÃO

Apesar das medidas preventivas e de tratamento estarem bem estabelecidas para complicações microvasculares em pacientes diabéticos, pouca atenção é dada para os casos de infecções, embora existam evidências sugerindo maior susceptibilidade a infecções e pior prognóstico para esses pacientes quando acometidos por uma infecção. Várias patologias infecciosas têm sido relacionadas com a diabetes, entre elas a candidíase (Fuji et al., 2016; Pearson-Stuttard et al., 2016).

A colonização por *Candida* spp. em pacientes diabéticos é mais elevada que em pacientes não diabéticos, e está associada a vários patógenos, principalmente *Candida albicans* (Muller et al., 2005; Al-Attas e Amro, 2010; Pallavan et al., 2014; Sampath et al., 2016). Além disso, tem sido reportado na literatura que a glicose salivar em pacientes diabéticos é mais elevada do que em pacientes não diabéticos e, tal aumento independe se a glicemia plasmática do paciente diabético está controlada ou não (Bernardi et al., 2007). Deste modo, o presente estudo avaliou se o aumento da glicose salivar poderia estar relacionado com a maior taxa de infecção fúngica nesses pacientes.

Isto posto, se faz importante ressaltar que as superfícies colonizadas por *C. albicans* diferem em relação ao pH, fonte de carbono e os tipos de células imunes presentes. Além disso, a *C. albicans* tem a capacidade de crescer em ambiente pobre em glicose, contudo, nestes casos ela utiliza outras fontes de carbono em associação associadas à glicose. Sabe-se que o crescimento em fontes alternativas de carbono induz a remodelação da parede celular de fungos e a modulação proteômica e de secretoma, afetando deste modo a adesão, virulência e formação de biofilme deste fungo (Ene et al., 2012, Ene et al., 2013). Os polissacarídeos presentes na parede celular da *Candida* têm papel fundamental reconhecimento deste pelas células imunes do hospedeiro e na indução da produção de citocinas. Desta forma, está bem estabelecido na literatura que a fonte de carbono é um fator importante na interação *Candida* e hospedeiro (Fleck et al., 2011; Ene et al., 2012; Austin et al., 2014), contudo

ainda não está totalmente elucidado qual o impacto das diferentes concentrações das fontes de carbono utilizadas pela *C. albicans* durante processo de invasão tecidual.

As células de *C. albicans* promovem morte celular por dois mecanismos distintos, necrose e apoptose. A apoptose está relacionada aos momentos iniciais da infecção enquanto a necrose nos estágios mais tardios (Villar e Zhao, 2010). A necrose é um tipo de morte celular caracterizada pelo aumento de volume intracelular e ruptura da membrana plasmática, fazendo com que haja liberação do conteúdo intracelular para o meio extracelular, dentre as enzimas liberadas pode-se destacar a lactato desidrogenase (LDH). Deste modo, o dano celular sob diferentes condições, pode ser quantificado em cultura de células medindo a liberação de LDH (Chan et al., 2013) no meio de cultura.

Uma vez que as células fúngicas possuem formação de hifas e secretam grandes quantidades de enzimas hidrolíticas, as células epiteliais estão mais propensas a sofrerem necrose. Além disso, Buu e Chen (2014) descreveram previamente que, na presença de glicose 1% e a 0,1% (nível de glicose da corrente sanguínea) as células fúngicas exibiram uma proporção semelhante de transição de levedura para hifa. Nossos resultados corroboraram com o referido estudo, uma vez que, a liberação de lactato desidrogenase não diferiu entre os grupos avaliados. Deste modo, a adição ou não de glicose não interferiu no dano celular sofrido pelas células epiteliais.

A candidíase é caracterizada pela invasão do epitélio oral por hifas que causam danos teciduais liberando mediadores inflamatórios que iniciam e sustentam a inflamação local (Feller et al., 2014). Queratinócitos, fibroblastos e leucócitos, são algumas das células que expressam o receptor para IL-17 (IL-17R). Após a ativação, a sinalização intracelular de IL-17R induz a produção de citocinas e quimiocinas. Além de manter a função de barreira e proporcionar um ponto de ancoragem para a colonização de *C. albicans*, as células epiteliais também desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro ao iniciar as respostas imunes inatas e adaptativas. A ativação epitelial por *C. albicans* resulta na indução de moléculas o imunitárias incluindo IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF e GM-CSF. Resultando no

recrutamento de células do sistema imunológico, em especial os neutrófilos (Feller et al., 2014; Hebecker et al., 2014).

Uma resposta imunológica equilibrada é crucial para a proteção das superfícies mucosas que estão em contato com patógenos (Schaller et al., 2002). No nosso estudo, foi observado que a presença de *C. albicans* modulou a liberação de todas as citocinas avaliadas. Contudo, os grupos G1 e G2 não diferiram estatisticamente entre si para nenhuma das citocinas estudadas, demonstrando que a presença do fungo desencadeou resposta inflamatória, contudo esta resposta não foi alterada na presença de diferentes concentrações de glicose. O grupo G4, como já bem descrito na literatura (Dongari-Bagtzoglou et al.) apresentou as menores médias para liberação das citocinas pró-inflamatórias avaliadas.

A IL-1 $\alpha$  é produzida pelos queratinócitos e é expressa em níveis mais elevados no tecido epitelial do que outros tecidos. Sua importância na cascata da resposta imunológica está bem estabelecida na literatura (Bando et al., 2007; Hebecker et al., 2014; Naglik et al., 2014), uma vez que sua liberação controla a imunidade inata em células epiteliais. A liberação de IL-1 $\alpha$  no epitélio oral pode atuar como um sistema de vigilância imune inata e um sistema de alerta para leucócitos. No presente estudo a IL-1 $\alpha$  foi modulada pela presença do fungo, apresentando uma maior liberação em todos os grupos infectados, em detrimento ao grupo G4. Contudo entre os grupos com diferentes concentrações de glicose, não foi observado diferenças estatísticas, demonstrando que a resposta imune não foi aumentada com o aumento da concentração de glicose.

Neste sentido, é importante ressaltar que a IL-1 $\beta$  tem papel importante no processo imunológico, em especial no recrutamento de neutrófilos para o local de infecção (van de Veerdonk et al., 2010). A liberação de citocina IL-1 $\beta$  no presente estudo, também foi modulada na presença da *C. albicans*, porém os grupos G1 e G2 se mostraram estatisticamente iguais. Sugerindo mais uma vez que a alteração na concentração de glicose não é um determinante no processo de invasão tecidual.

Quando às citocinas GM-CSF, G-CSF e IL-6, os grupos G1, G2 e G3 não tiveram diferença estatística. Isto demonstra que a presença de *Candida albicans* foi

mais importante na liberação de citocinas (Schaller et al., 2002; Dongari-Bagtzoglou et al., 2004; Li e Dongari-Bagtzoglou, 2009; Feller et al., 2014; Hebecker et al., 2014) do que a adição de glicose, uma vez que o grupo G4 se mostrou estatisticamente diferente dos demais.

Além disso, o grupo inoculado com adição de 0.1 mM de glicose foi estatisticamente mais elevado quando comparado ao grupo G4 para as citocinas G-CSF e GM-CSF enquanto que o grupo G1 não teve diferença estatísticas entre os referidos grupos. Demonstrando assim, que a adição de 1 mM de glicose liberou citocinas basalmente, semelhante ao grupo G4, sendo que a adição de 0.1mM de glicose gerou maior resposta imune quando comparada aos grupos sem adição de glicose . Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que o baixo nível de glicose é mais potente para promover a transformação de leveduras em hifas e na indução da expressão de SAP5 e SAP6. Deste modo, supõe-se que a concentração de glicose pode regular a expressão de outros fatores virulentos durante o desenvolvimento de hifas de *C. albicans* (Buu e Chen, 2014).

Em relação à estrutura do biofilme, foi observado que o grupo G2 demonstrou um biofilme mais denso, espesso e com mais células filamentosas que os grupos G1 e G3. Sendo assim, acredita-se que a adição de glicose 0,1 mM promove maior diferenciação e crescimento de *C. albicans* do que a adição de 1mM de glicose. Contudo, esta maior proliferação e diferenciação celular fúngica, não parece alterar sua capacidade de invasão na monocamada epitelial, uma vez que, não houve aumento de LDH liberada entre os grupos inoculados avaliados, bem como a liberação de citocinas foi igual para os grupos com adição de glicose.

A partir dos dados supracitados, propõe-se que outros mecanismos possam estar envolvidos com a alta taxa de candidíase em pacientes diabéticos. Dentro deste contexto, é importante ressaltar que a hiperglicemia persistente pode levar a alterações microvasculares nos vasos sanguíneos e na membrana basal das glândulas salivares, podendo levar a um aumento do teor de glicose na saliva. Deste modo, a glicose salivar pode não ser diretamente influenciada pela hiperglicemia, mas sim por fatores de confundimento como a extensão dos danos da glândula salivar (López-Pintor et al., 2016).

Também é importante ressaltar que outros modelos de estudo podem fornecer respostas acerca da relação patógeno-hospedeiro mais específicas. Dentro eles, pode-se citar o modelo de epitélio 3D (Dongari-Bagtzoglou e Kashleva, 2006), que trata-se de um epitélio estratificado muito semelhante ao encontrado *in vivo*, especialmente importante nos estudos de invasão em camadas de tecidos mais profundos. Neste, além de queratinócitos, fibroblastos, o modelo pode ser suplementado com células imunes, permitindo assim, uma melhor análise da interação das células epiteliais e imunológicas durante as infecções por *Candida*. Mais estudos devem ser realizados em modelos 3D a fim de avaliar dano tecidual e resposta imune em diferentes concentrações de glicose.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados conclui-se que:

A glicose parece não afetar diretamente o comportamento da *C. albicans* durante o processo de invasão tecidual. Outros mecanismos podem estar envolvidos fazendo com que seja necessária a realização de outros estudos.

- a) A adição de glicose não foi capaz de alterar a liberação de LDH nos grupos estudados.
- b) A dosagem de citocinas não diferiu entre os grupos G1 e G2 para nenhuma citocina avaliada.
- c) O biofilme formado na concentração da glicose salivar aparenta ser discretamente mais espesso quando comparado ao biofilme formado com alta concentração de glicose ou, ainda, sem glicose. Contudo, uma análise quantitativa deve ser realizada para ser feita tal afirmação.

## 8 REFERÊNCIAS

- Abikshyeet P, Ramesh V, Oza N. Glucose estimation in the salivary secretion of diabetes mellitus patients. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2012;5(1):149–54.
- Al-Attas SA, Amro SO. Candidal colonization, strain diversity, and antifungal susceptibility among adult diabetic patients. *Ann Saudi Med.* 2010;30(2):101–8.
- Austin PD, Hand KS, Elia M. Factors influencing *Candida albicans* growth in parenteral nutrition with and without lipid emulsion: Using an established framework to inform maximum duration of infusion policy decisions. *Clin Nutr [Internet]. Elsevier Ltd;* 2014;33(3):489–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.06.019>
- Balan P, Babu SG, Sucheta KN, Shetty SR, Rangare AL, Castelino RL, et al. Can saliva offer an advantage in monitoring of diabetes mellitus? - A case control study. *J Clin Exp Dent.* 2014;6(4):335–8.
- Bando M, Hiroshima Y, Kataoka M, Shinohara Y, Herzberg MC, Ross KF, et al. Interleukin-1 $\alpha$  regulates antimicrobial peptide expression in human keratinocytes. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:532–7.
- Bao K, Akguel B, Bostanci N. Establishment and characterization of immortalized gingival epithelial and fibroblastic cell lines for the development of organotypic cultures. *Cells Tissues Organs.* 2014;199(1):228–37.
- Bernardi MJ, Reis A, Loguercio AD, Kehrig R, Leite MF, Nicolau J. Study of the buffering capacity, pH and salivary flow rate in type 2 well-controlled and poorly controlled diabetic patients. *Oral Health Prev Dent [Internet].* 2007;5(1):73–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17366764>
- Bertolini MM, Xu H, Sobue T, Nobile CJ, Del Bel Cury AA, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida-streptococcal* mucosal biofilms display distinct structural and virulence characteristics depending on growth conditions and hyphal morphotypes. *Mol Oral Microbiol.* 2015;30(4):307–322.
- Buu L-M, Chen Y-C. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Biomed Sci.* 2014;21:1–9.
- Cavalcanti YW, Morse DJ, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson M, et al. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling [Internet].* 2015;31(1):27–38. Available from: <http://www.tandfonline.com/loi/gbif20>
- Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res [Internet].* 2010;24(2):135–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20658029>

- Chan FKM, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*. 2013;979:65–70.
- Dias. Influence of different buffers (HEPES/MOPS) on keratinocyte cell viability and microbial growth. Danen EHJ, editor. *PLoS One*. 2010 May 6;125(5):e10503.
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc [Internet]*. 2006;1(4):2012–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17487190>
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Cunha Villar C. Bioactive interleukin-1a is cytolytically released from *Candida albicans*-infected oral epithelial cells.
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H, Villar CC. Bioactive interleukin-1alpha is cytolytically released from *Candida albicans*-infected oral epithelial cells. *Med Mycol [Internet]*. 2004 Dec;42(6):531–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15682642>
- Ene I V., Adya AK, Wehmeier S, Brand AC, MacCallum DM, Gow NAR, et al. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. *Cell Microbiol [Internet]*. 2012 Sep;14(9):1319–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3465787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ene I V., Cheng S-C, Netea MG, Brown AJP. Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. *Infect Immun [Internet]*. 2013 Jan;81(1):238–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115042>
- Feller L, Khammissa RAG, Chandran R, Altini M, Lemmer J. Oral candidosis in relation to oral immunity. *J Oral Pathol Med [Internet]*. 2014 Sep;43(8):563–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24118267>
- Fleck CB, Schöbel F, Brock M. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. *Int J Med Microbiol [Internet]*. Elsevier GmbH.; 2011 Jun;301(5):400–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422111000245>
- Fu Y, Luo G, Spellberg BJ, Edwards JE, Ibrahim AS. Gene overexpression/suppression analysis of candidate virulence factors of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell [Internet]*. 2008 Mar;7(3):483–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178776>
- Fuji S, Löffler J, Savani BN, Einsele H, Kapp M. Hyperglycemia as a possible risk factor for mold infections-the potential preventative role of intensified glucose control in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant [Internet]*. 2016 Dec 12;1(October):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941771>

- Gow NAR, Hube B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2012 Aug;15(4):406–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609181>
- Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011 Dec 12;10(2):112–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158429>
- Hagi-Pavli E, Williams DM, Rowland JL, Thornhill M, Cruchley AT. Characterizing the immunological effects of oral healthcare ingredients using an in vitro reconstructed human epithelial model. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2014 Dec;74(1):139–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25290854>
- Han T-L, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol* [Internet]. 2011 Aug;48(8):747–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21513811>
- Hebecker B, Naglik JR, Hube B, Jacobsen ID. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2014 Jul;12(7):867–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24803204>
- Hiller E, Zavrel M, Hauser N, Sohn K, Burger-Kentischer A, Lemuth K, et al. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host—focus on the function of cell wall proteins. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2011 Jun;301(5):384–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571590>
- Indira M, Chandrashekar P, Kattappagari KK, Chandra LPK, Chitturi RT, Bv RR. Evaluation of salivary glucose, amylase, and total protein in Type 2 diabetes mellitus patients. *Indian J Dent Res* [Internet]. 2015;26(3):271–5. Available from: <http://www.ijdr.in/article.asp?issn=0970-9290;year=2015;volume=26;issue=3;page=271;epage=275;aulast=Indira>
- Javed F, Ahmed HB, Mehmood A, Saeed A, Al-Hezaimi K, Samaranayake LP. Association between glycemic status and oral *Candida* carriage in patients with prediabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2014 Jan;117(1):53–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332327>
- Jurysta C, Bulur N, Oguzhan B, Satman I, Yilmaz TM, Malaisse WJ, et al. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2009;2009(1):430426. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19503844>
- Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranayake LP, Macfarlane TW, Frier BM.

Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol* [Internet]. 1988 Aug;17(7):354–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3145969>

- Lasisi TJ, Fasanmade AA. Comparative analysis of salivary glucose and electrolytes in diabetic individuals with periodontitis. *Ann Ibadan Postgrad Med* [Internet]. 2012 Jun;10(1):25–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25161403>
- Li F, Svarovsky MJ, Karlsson AJ, Wagner JP, Marchillo K, Oshel P, et al. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2007a Jun;6(6):931–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17416898>
- Li L, Dongari-Bagtzoglou A. Epithelial GM-CSF induction by *Candida glabrata*. *J Dent Res* [Internet]. 2009 Aug;88(8):746–51. Available from: <http://jdr.sagepub.com/supplemental>.
- Li L, Kashleva H, Dongari-Bagtzoglou A. Cytotoxic and cytokine-inducing properties of *Candida glabrata* in single and mixed oral infection models. *Microb Pathog* [Internet]. 2007b Apr;42(4):138–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17306958>
- Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryot Cell* [Internet]. 2011 Feb;10(2):168–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115738>
- López-Pintor RM, Casañas E, González-Serrano J, Serrano J, Ramírez L, de Arriba L, et al. Xerostomia, Hyposalivation, and Salivary Flow in Diabetes Patients. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016;2016(1):4372852. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27478847>
- López ME, Colloca ME, Páez RG, Schallmach JN, Koss MA, Chervonagura A. Salivary characteristics of diabetic children. *Braz Dent J* [Internet]. 2003;14(1):26–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656461>
- Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol* [Internet]. 2011 Jun;301(5):417–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21555244>
- Mascarenhas P, Fatela B, Barahona I. Effect of diabetes mellitus type 2 on salivary glucose--a systematic review and meta-analysis of observational studies. *PLoS One* [Internet]. 2014;9(7):1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25025218>
- Moncunill G, Aponte JJ, Nhabomba AJ, Dobaño C. Performance of multiplex commercial kits to quantify cytokine and chemokine responses in culture supernatants from *Plasmodium falciparum* stimulations. *PLoS One* [Internet].

2013;8(1):e52587. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23300981>

Moreno-Ruiz E, Galán-Díez M, Zhu W, Fernández-Ruiz E, D'Enfert C, Filler SG, et al. *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol* [Internet]. 2009 Aug;11(8):1179–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416270>

Muller LMAJ, Gorter KJ, Hak E, Goudzwaard WL, Schellevis FG, Hoepelman AIM, et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2005 Aug 1;41(3):281–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16007521>

Naglik JR, Moyes DL, Wächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect* [Internet]. 2011 Nov;13(12–13):963–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801848>

Naglik JR, Richardson JP, Moyes DL. *Candida albicans* pathogenicity and epithelial immunity. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 Aug;10(8):e1004257. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25121985>

Pallavan B, Ramesh V, Dhanasekaran BP, Oza N, Indu S, Govindarajan V. Comparison and correlation of candidal colonization in diabetic patients and normal individuals. *J Diabetes Metab Disord* [Internet]. 2014;13(1):66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991533>

Park H, Myers CL, Sheppard DC, Phan QT, Sanchez AA, Edwards JE, et al. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. *Cell Microbiol*. 2005;7(4):499–510.

Pearson-Stuttard J, Blundell S, Harris T, Cook DG, Critchley J. Diabetes and infection: Assessing the association with glycaemic control in population-based studies. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;4(2):148–58. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00379-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00379-4)

De Ryck T, Grootaert C, Jaspaert L, Kerckhof F-M, Van Gele M, De Schrijver J, et al. Development of an oral mucosa model to study host-microbiome interactions during wound healing. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2014 Aug;98(15):6831–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24917376>

Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in *Candida albicans*-mediated Oral Diseases. *J Dent Res* [Internet]. 2016;95(4):365–71. Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/95/4/365?etoc>

Sampath A, Weerasekera M, Gunasekara C, Dilhari A, Bulugahapitiya U, Fernando N. A sensitive and a rapid multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Candida* species in concentrated oral rinse specimens in patients with diabetes. *Acta Odontol Scand* [Internet]. Informa UK Limited, trading as

Taylor & Francis Group; 2016 Dec 14;[Epub ahead of print]:1–10. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1080/00016357.2016.1265146>

Satish BNVS, Srikala P, Maharudrappa B, Awanti SM, Kumar P, Hugar D. Saliva: A tool in assessing glucose levels in Diabetes Mellitus. *J Int oral Heal JIOH* [Internet]. 2014 Apr;6(2):114–7. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876711>

Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J Invest Dermatol* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2002 Apr;118(4):652–7. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01699.x>

Schlage WK, Iskandar AR, Kostadinova R, Xiang Y, Sewer A, Majeed S, et al. In vitro systems toxicology approach to investigate the effects of repeated cigarette smoke exposure on human buccal and gingival organotypic epithelial tissue cultures. *Toxicol Mech Methods* [Internet]. 2014;24(7):1537–6516. Available from: <http://informahealthcare.com/txm>

Singh N, Agrawal R, Nair PP, Sargaiyan V, Bhushan P, Radhika N. Comparison of Salivary and Plasma Glucose Level in Type II Diabetic Patients. *J Res Adv Dent*. 2014;31(1):263–8.

Steele C, Wormley FL. Immunology of fungal infections: lessons learned from animal models. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2012 Aug;15(4):413–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763286>

Vautier S, MacCallum DM, Brown GD. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine* [Internet]. 2012 Apr;58(1):89–99. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924922>

van de Veerdonk FL, Kullberg B-J, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* [Internet]. 2010 Oct;16(5):453–9. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20711079>

Villar CC, Zhao XR. *Candida albicans* induces early apoptosis followed by secondary necrosis in oral epithelial cells. *Mol Oral Microbiol* [Internet]. 2010 Jun;25(3):215–25. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20536749>

Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: Dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One*. 2012a;.

Wächtler B, Citiulo F, Jablonowski N, Förster S, Dalle F, Schaller M, et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS One* [Internet]. 2012b;7(5):e36952. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22606314>

- Wächtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One* [Internet]. 2011 Feb 23;6(2):e17046. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407800>
- Wang P. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*C. albicans* directly in a variety of clinical specimens using fluorescent in situ hybridisation. *Mycoses* [Internet]. 2011 Jul;54(4):331–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20070532>
- Weindl G, Naglik JR, Kaesler S, Biedermann T, Hube B, Korting HC, et al. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 Dec;117(12):3664–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992260>
- Williams DW, Jordan RPC, Wei X-Q, Alves CT, Wise MP, Wilson MJ, et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2013 Oct 21;5(22434):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24155995>
- Yang W, Yan L, Wu C, Zhao X, Tang J. Fungal invasion of epithelial cells. *Microbiol Res* [Internet]. 2014 Nov;169(11):803–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24670964>
- Zhao XR, Villar CC. Trafficking of *Candida albicans* through oral epithelial endocytic compartments. *Med Mycol* [Internet]. 2011 Feb;49(2):212–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20854227>