

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**O PADRÃO GLICÊMICO SANGUÍNEO INTERFERE
NO METABOLISMO DE BIOFILMES DE *Candida*
SOBRE SUPERFÍCIES ABIÓTICAS?**

Isis Morais Bezerra Muniz

SAPIENTIA AEDIFICAT

2019

ISIS MORAIS BEZERRA MUNIZ

**O PADRÃO GLICÊMICO SANGUÍNEO INTERFERE NO
METABOLISMO DE BIOFILMES DE *Candida* SOBRE
SUPERFÍCIES ABIÓTICAS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida

João Pessoa

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

BIBLIOTECÁRIO:

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M966p Muniz, Isis Morais Bezerra.

O PADRÃO GLICÊMICO SANGUÍNEO INTERFERE NO METABOLISMO
DE BIOFILMES DE Candida SOBRE SUPERFÍCIES ABIÓTICAS? /
Isis Morais Bezerra Muniz. - João Pessoa, 2019.
53 f. : il.

Orientação: Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. candida. 2. biofilmes. 3. saliva. 4. Diabetes
Mellitus. I. de Almeida, Leopoldina de Fátima Dantas.
II. Título.

UFPB/BC

ISIS MORAIS BEZERRA MUNIZ

**O PADRÃO GLICÊMICO SANGUÍNEO INTERFERE NO
METABOLISMO DE BIOFILMES DE *Candida* SOBRE
SUPERFÍCIES ABIÓTICAS?**

Banca Examinadora



3º Examinador

Prof. Dra. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida
Orientador – UFPB



2º Examinador

Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
Examinador - UFPB



1º Examinador

Prof Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Examinador - Externo

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba- UFPB e ao Núcleo de Medicina Tropical- NUMETROP, por ceder seus espaços e dependências para realização deste trabalho.

Ao Grupo de Pesquisa em Odontologia e Clínica Integrada- GPOCI, por todo incentivo e ensinamentos.

Ao Centro Odontológico de Cruz das Armas (COCA) e seus pacientes que concordaram em participar da pesquisa, tornando possível a realização deste trabalho.

À Deus e aos meus Guias, por estarem sempre me protegendo.

Aos amigos de laboratório pelo auxílio e contribuições no decorrer destes dois anos de mestrado.

Às amigas construídas nesta pós-graduação, as quais foram essenciais nesta caminhada. Agradeço em especial a Arella, por sua amizade, companheirismo e parceria, tornando meus dias mais leves, divertidos e produtivos.

Aos meus pais, que são minha base e fortaleza, àqueles com os quais sei que posso contar, independente de tudo. Agradeço por estarem comigo, me apoiando nos momentos mais difíceis e reavivando minhas forças quando as mesmas pareciam estar esgotadas.

Ao meu irmão, Yuri, em quem me inspiro, exemplo de profissionalismo, dedicação e inteligência.

Ao meu marido, Bruno, pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Às minhas amigas de infância, pela amizade e incentivo.

À minha psicóloga, Vanessa, pelo profissionalismo e presteza nos momentos que precisei de sua ajuda.

Aos Professores Leopoldina e Yuri pelos conhecimentos, paciência e dedicação.

Este trabalho teve o apoio financeiro concedido pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Nº 1757970).

EPIGRAFE

“Se alguém te oferecer uma oportunidade incrível, mas você não tem certeza se consegue fazer, diga sim - e depois aprenda como fazer.” Richard Branson.

RESUMO

A *Candida* é o principal patógeno fúngico dos seres humanos, sendo a espécie *albicans* mais prevalente em infecções bucais, como a candidíase bucal. Em indivíduos imunocomprometidos, como portadores de Diabetes Mellitus, a *C. albicans* pode proliferar sobre mucosas e superfícies abióticas, promovendo maior suscetibilidade à instalação de outras infecções locais e/ou sistêmicas. O déficit do controle glicêmico nestes pacientes pode promover a alteração da patogenicidade do biofilme, tornando a candidíase mais prevalente e predispondo estes indivíduos a diversas alterações na cavidade bucal. Assim, avaliou-se a influência de padrões glicêmicos sanguíneos no desenvolvimento de biofilme de *Candida albicans* (ATCC 90028) em superfícies abióticas de titânio e resina acrílica. Foi realizada coleta salivar estimulada de indivíduos com as condições e concentrações glicêmicas sanguíneas pré-estabelecidas, considerando-se indivíduos normoglicêmicos (≤ 120 mg/dL)- NG e hiperglicêmicos (>120 mg/dL)- HG. Posteriormente, a saliva foi filtrada e utilizada para o cultivo de biofilmes (n=12/grupo) de *C. albicans* sobre as referidas superfícies, os quais foram analisados nos períodos de 24 e 72 h de cultivo. Das 95 amostras salivares coletadas, 49 foram coletadas de pacientes hiperglicêmicos e 46 normoglicêmicos. Foi realizada a caracterização da amostra de indivíduos doadores de saliva e o biofilme analisado quanto a viabilidade celular (UFC/mL), dosagem de Proteínas Totais (PT), atividade de fosfolipase e morfologia dos biofilmes por meio de microscopia ótica de fluorescência com Calcofluor White (CFW). A análise estatística das variáveis numéricas foi realizada por meio do teste Mann-Whitney ($\alpha=5\%$) e a morfologia dos biofilmes determinada de forma qualitativa. A amostra dos indivíduos doadores de saliva (n= 95) foi composta por 40 indivíduos do sexo masculino e 55 feminino, com média de idade de 51,3 ($\pm 11,2$) anos. Quando comparados entre grupos (NG x HG) e entre tempos (24 x 72h) não foi verificada diferença estatisticamente significativa em relação a nenhum dos parâmetros avaliados. Para os resultados sobre as superfícies de resina acrílica a contagem de UFC/mL determinou medianas de 6,4 e 6,5 para análises de 24 e 72 h respectivamente, sem diferença ($p>0,05$) entre os grupos (NG x HG). A produção de PT determinou de medianas 0,3 g/dL e 2,1 g/dL para análises de 24 e 72 h respectivamente, sem diferença entre os grupos (NG x HG).

A atividade de fosfolipases determinou medianas de 0,6 mm para ambas análises de 24 e 72 h, sem diferença entre os grupos (NG x HG). Para os resultados sobre as superfícies em titânio a contagem de UFC/mL determinou medianas de 6,5 para as análises de 24 e 72 h. A produção de PT determinou de medianas -0,7 g/dL e 0,2 g/dL para análises de 24 e 72 h respectivamente. A atividade de fosfolipases determinou medianas de 0,6 mm para ambas análises de 24 e 72 h, sem diferença entre os grupos (NG x HG) para todas as análises citadas. As concentrações glicêmicas sanguíneas não influenciaram o metabolismo do biofilme da *C. albicans* em superfícies abióticas. Os resultados do presente estudo podem ser relevantes para que novas terapias sejam desenvolvidas voltadas ao controle de infecções por *C. albicans* e seus agravos.

Palavras-chave: *Candida*, biofilmes, saliva, Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

Candida is the main fungal pathogen in humans, and the species *albicans* is the most prevalent in oral infections, such as oral candidiasis. In immunocompromised individuals, those with Diabetes Mellitus, *C. albicans* can proliferate on mucous and abiotic surfaces, promoting bigger susceptibility to other local and/or systemic infections. The deficit of glycemic control in these patients can promote alteration of the biofilm pathogenicity, making candidiasis more prevalent, predisposing these individuals to several alterations in the oral cavity. Thus, the influence of blood glycemic patterns on the development of *Candida albicans* biofilm (ATCC 90028) on abiotic surfaces of titanium and acrylic resin was evaluated. Stimulated salivary collection was performed from individuals with pre-established bloody glycemic conditions and concentrations, considering normoglycemic individuals (≤ 120 mg / dL) - NG and hyperglycemic individuals (> 120 mg / dL) - HG. Subsequently, the saliva was filtered and used for the cultivation of *C. albicans* biofilms (n = 12 / group) on these surfaces, which were analyzed at 24 and 72 hours of cultivation. Of the 95 salivary samples collected, 49 were collected from hyperglycemic patients and 46 normoglycemic patients. Saliva donors were characterized and biofilm analyzed for cell viability (CFU/mL), Total Protein dosage (PT), phospholipase activity and biofilm morphology by fluorescence optical microscopy with Calcofluor White (CFW). Statistical analysis of the numerical variables was performed using the Mann-Whitney test (α -5%) and the biofilm morphology determined qualitatively. The sample of saliva donors (n = 95) was composed of 40 males and 55 females, with a mean age of 51.3 ($\pm 11,2$) years. When compared between groups (NG x HG) and between times (24 x 72h) there was no statistically significant difference in relation to any of the evaluated parameters. For the results on acrylic resin surfaces the CFU/mL count determined medians of 6.4 and 6.5 for 24 and 72 h analysis respectively, with no difference ($p > 0,05$) between groups (NG x HG). The PT production determined from medians 0.3 g/dL and 2.1 g/dL for 24 and 72 h analysis, respectively, with no difference between groups (NG x HG). Phospholipase activity determined medians of 0.6 mm for both 24 and 72 h analyzes, with no difference between groups (NG x HG). For the results on titanium surfaces the CFU/mL count determined medians of 6.5 for the 24 and 72 h analyzes. The PT production determined from medians - 0.7 g/dL and 0.2 g/dL for 24 and 72 h analysis respectively. Phospholipase activity determined medians of 0.6 mm for both 24 and 72 h analyzes, with no difference between groups (NG x HG) for all analyzes cited. Blood glycemic concentrations did not influence *C. albicans* biofilm metabolism on abiotic surfaces. The results of the present study may be relevant for the development of new therapies aimed at controlling *C. albicans* infections and their diseases.

Keywords: *Candida*. Biofilms. Saliva. Diabetes Mellitus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	CAPÍTULO 1	5
	Resumo	6
	Abstract	7
	Introdução	8
	Materiais e Métodos	10
	Considerações éticas	10
	Coleta da saliva	10
	Caracterização da amostra de indivíduos participantes	11
	Manipulação das amostras salivares	11
	Preparação dos espécimes	11
	Microrganismo envolvido	12
	Desenvolvimento dos biofilmes e tratamentos	12
	Análise da Viabilidade Celular (UFC/mL)	13
	Produção de Proteínas Totais	13
	Avaliação da atividade de Fosfolipases	14
	Fluorescência	14
	Análise dos dados	15
	Resultados	15
	Discussão	20
	Conclusão	25
	Referências	25
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	29
4	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	ANEXO	35
	ANEXO 1- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba- UFPB (CEP/CCS-UFPB)	35
	APÊNDICES	39
	APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	39
	APÊNDICE B: Fotografias das placas de Petri, da atividade de fosfolipase por <i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	42

1. INTRODUÇÃO

Levantamentos de base populacional possibilitam o conhecimento sobre as condições de saúde e doença de alta prevalência, de forma que políticas públicas de saúde e seus respectivos planejamentos sejam direcionados para a minimização dos agravos a saúde determinados por estes achados. A expectativa de vida vem aumentando, tornando ainda mais desafiador o cuidado com a saúde geral e bucal (Cavalcanti et al., 2018).

O último levantamento de saúde bucal realizado no Brasil, em 2010, demonstrou elevada prevalência (92%) de perda dentária na população idosa (65 a 74 anos). Detectou-se que grande parte dos indivíduos da faixa etária adulta havia necessidade de próteses dentárias, sendo 41,3% de prótese parcial em um arco e 26,1% de prótese parcial nos dois arcos. A maior parte dos idosos (76,5%) utilizavam algum tipo de prótese dentária superior e apresentavam situação periodontal insatisfatória (SB Brasil, 2010).

Tendo em vista a condição bucal da população brasileira, com elevados indicadores referentes ao edentulismo, doenças periodontais e necessidade de próteses (SB Brasil, 2010), destaca-se a importância do conhecimento e prevenção de infecções fúngicas e bacterianas capazes de se proliferarem sobre superfícies protéticas e outros dispositivos, como implantes dentários (Cavalcanti et al., 2014; Ellepola et al., 2017; Gauch et al., 2018).

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum em usuários de prótese, sendo a *C. albicans* seu principal agente etiológico. Esse fungo possui capacidade de colonização sobre superfícies como próteses e dispositivos médicos, invasão do epitélio, aderência às mucosas, além de influenciar as defesas do hospedeiro, devido mecanismos específicos de virulência, como a produção de fosfolipases e proteinases (Jin et al., 2004; Thein et al., 2007; Ellepola et al., 2013; 2014; 2017; Gauch et al., 2018).

Com o crescente aumento do número de reabilitações orais por meio da instalação de implantes dentários, seja para perdas parciais ou totais, é necessário o controle de doenças biofilme-dependentes como a peri-mucosite.

Essa é uma inflamação reversível, sem perda óssea, ao contrário da peri-implantite, devido a colonização subgengival por periodontopatógenos anaeróbios, podendo ocasionar a perda do implante (Aguirre-Zorzano et al., 2015; Lee et al., 2017; Nazir et al., 2018). O titânio, material que compõe os implantes, pode ser passível de colonização por microrganismos, assim como o esmalte dentário (Cavalcanti et al., 2014; Gurgel et al., 2017).

As infecções por *C. albicans* ocorrem predominantemente em indivíduos imunocomprometidos como submetidos a tratamento antineoplásico e terapia antibiótica de largo espectro, portadores de deficiências nutricionais, com distúrbios em glândulas salivares, tabagistas, usuários frequentes de corticóides inalatórios, infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e diabéticos não compensados (Jin et al., 2004; Ellepola et al., 2013; 2014). Fatores locais como má higiene, próteses mal adaptadas e diminuição do fluxo salivar também levam ao desenvolvimento da infecção fúngica (Silva et al., 2012; López-Pintor et al., 2016; Gurgel et al., 2017; Gauch et al., 2018).

A Diabetes Melitus é um distúrbio endócrino, crônico, em que os níveis de glicose estão aumentados na corrente sanguínea, devido a incapacidade do pâncreas em exercer sua função, não produzindo insulina ou produzindo em quantidade insuficiente (Diabetes tipo 1), ou devido o corpo não utilizar de forma eficaz a insulina, gerando resistência a mesma (Diabetes tipo 2). Quando não controlada, a Diabetes Melitus causa hiperglicemia e predispõe os indivíduos a alterações cardiovasculares, hepáticas, renais, oculares e bucais, principalmente (International Diabetes Federation, 2017; Hu et al., 2018).

Particularmente, em pacientes com distúrbios no controle glicêmico, observam-se efeitos que afetam a produção e secreção das glândulas salivares. Pode haver também aumento da concentração de componentes salivares proteicos como lactoferrina, mieloperoxidase e peroxidase salivar, além de albumina e IgA secretora (Dodds et al., 2000; Nazir et al., 2018). Ainda devido o comprometimento do sistema de defesa, há maior susceptibilidade às doenças periodontais e peri-implantares, influenciando na progressão e longevidade de

tratamentos reabilitadores, como próteses implantossuportadas (Aguirre-Zorzano et al., 2015; Gurgel et al., 2017; Nazir et al., 2018).

A saliva humana é caracterizada como um fluido, produzido pelas glândulas salivares, composto por água (99,5%), proteínas (0,3%), enzimas e sais mineiras (0,2%) (Zeng et al., 2017). Possui funções relacionadas a mecanismos fisiológicos, auxiliando na manutenção da saúde das mucosas (Nazir et al., 2018), portanto quando há redução do fluxo salivar, fato que ocorre frequentemente em pacientes diabéticos, pode impactar na ocorrência de lesões de cáries, desconforto e infecções orais oportunistas, devido a capacidade de tamponamento e atividade antimicrobiana serem reduzidas (Dodds et al., 2000; Silva et al., 2012).

Desta forma, a literatura relata que pacientes diabéticos possuem maior prevalência de doenças bucais quando comparados a não diabéticos, com destaque para candidíase bucal, apresentando a *C. albicans* como espécie mais prevalente, especialmente a medida que a idade avança (Bezerra et al., 2019; Ferizi et al., 2018; Uppu et al., 2018).

A proliferação dos microrganismos que compõem o biofilme bucal pode ser afetada pela composição salivar, principalmente em relação às proteínas, que mantêm a homeostase e modulam este mecanismo (Oncul et al., 2015; Hemadi et al., 2017).

Logo, em decorrência dos efeitos da interação *C. albicans*, Diabetes Mellitus e alterações salivares, a compreensão das condições do hospedeiro, bem como a virulência do fungo são importantes, para que terapias direcionadas a este tipo de paciente sejam implementadas e ações de prevenção sejam mais efetivas (Silva et al., 2012; Ellepola et al., 2014).

Desta forma, uma vez que a Diabetes Mellitus acarreta em prejuízos aos indivíduos e ao sistema de saúde, a monitorização do controle glicêmico e seus impactos devem ser estudadas de forma a minimizar os possíveis agravos (Nazir et al., 2018).

O presente trabalho avaliou a influência dos padrões glicêmicos de pacientes com glicemia sanguínea considerados normoglicêmicos (≤ 120 mg/dL) e hiperglicêmicos (> 120 mg/dL) (valores adaptados baseados segundo o Atlas da Federation International Diabetes (IDF- 2019), estando os indivíduos alimentados), em biofilme de *C. albicans* nas superfícies abióticas de titânio e resina acrílica, verificando se a glicemia sanguínea promove reflexos na saliva, impactando o desenvolvimento do biofilme.

2. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Archives of Oral Biology”.

A concentração de glicose sanguínea interfere na proliferação e metabolismo de biofilmes de *Candida albicans* sobre superfícies abióticas?

Isis Morais Bezerra^a, Arella Cristina Muniz Brito^a, Maria Heloísa de Souza Borges^b, Yuri Wanderley Cavalcanti^c, Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida^{c*}

A– Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

B– Curso de Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba.

C– Departamento de Odontologia e Clínica Social e do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba.

*Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde - Campus I, Departamento de Odontologia Clínica e Social.

Universidade Federal da Paraíba - Campus I

Castelo Branco

58051900 - João Pessoa, PB – Brasil

leopoldinalmeida@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Avaliar a interferência de padrões glicêmicos em biofilme de *Candida albicans* (ATCC 90028) sobre superfícies abióticas de resina acrílica PMMA e titânio. **Materiais e métodos:** Amostras salivares foram coletadas de forma estimulada de 46 indivíduos normoglicêmicos (concentração glicêmica ≤ 120 mg/dL) e 49 hiperglicêmicos (concentração glicêmica >120 mg/dL), produzindo-se em seguida *pools* salivares de acordo com a condição glicêmica. Biofilmes de *C. albicans* (1×10^6 UFC/mL) foram desenvolvidos sobre espécimes de resina acrílica e titânio após formação de película salivar adquirida (60 minutos 37°C) a partir da saliva humana. Os biofilmes ($n=12/\text{grupo}$) foram analisados após 24 e 72 h de proliferação, com troca do meio de cultura a cada 24 h. Foram analisados a viabilidade celular (UFC/mL), dosagem de Proteínas Totais (PT), atividade de fosfolipase e morfologia dos biofilmes por fluorescência. Os dados de UFC/mL, PT e fosfolipase foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ($\alpha=5\%$) e a fluorescência por método qualitativo, comparando-se todos os testes entre grupos e tempos. **Resultados:** Verificou-se não haver diferenças estatisticamente significativa entre os grupos normoglicêmicos x hiperglicêmicos em 24 ou 72 h, assim como não foi observada diferenças entre os tempos 24 x 72h para os normoglicêmicos e para os hiperglicêmicos ($p>0,05$), em ambos os biofilmes desenvolvidos sobre as superfícies de resina acrílica e titânio. **Conclusão:** A concentração de glicose sanguínea não influenciou a proliferação e o metabolismo de biofilmes de *C. albicans* desenvolvidos sobre superfícies abióticas.

Palavras-chave: *Candida albicans*, Saliva, glicemia, Implantes dentários, Prótese dentária

Abstract

Objective: To evaluate the effect of glycemic patterns in *Candida albicans* (ATCC 90028) (CA) biofilm on abiotic surfaces of PMMA acrylic resin and titanium.

Materials and methods: Stimulated salivary samples were collected from 46 normoglycemic individual (glycemic concentration ≤ 120 mg / dL) and 49 hyperglycemic individuals (glycemic concentration >120 mg / dL), after salivary pools were produced accordingly with the glycemic condition. *C. albicans* biofilms (1×10^6 CFU / mL) were developed on acrylic resin and titanium specimens after salivary pellicle formation (60 minutes 37° C) from human saliva. The biofilms (n= 12/group) were analyzed after 24 and 72h of proliferation, with culture medium changed every 24h. Cell viability (CFU mL), Total Protein dosage (PT), phospholipase activity and biofilm morphology by fluorescence were analyzed. CFU/ mL, PT and phospholipase data were analyzed by Mann-Whitney test ($\alpha = 5\%$) and fluorescence by qualitative method, comparing all tests between groups and times. **Results:** There were no statistically significant differences between normoglycemic x hyperglycemic groups at 24 or 72 h, and no differences were observed between 24 x 72h for normoglycemic and hyperglycemic groups ($p > 0.05$) in both biofilms developed on acrylic resin and titanium surfaces. **Conclusion:** The concentration of blood glucose did not influence the proliferation and metabolism of *C. albicans* biofilms developed on abiotic surfaces.

Key-words: *Candida albicans*, Saliva, Blood glucose, Dental Implants, Dental Prosthesis

Introdução

A Diabetes Mellitus é um distúrbio metabólico, prevalente mundialmente, em que há deficiência absoluta ou relativa na produção de insulina, ou resistência insulínica, levando a hiperglicemia. Segundo a Federação Internacional de diabetes, 32 milhões de indivíduos são portadores de Diabetes na América Central e América do Sul. Estima-se que em 2045 esse número aumentará em 55% (International Diabetes Federation, 2019).

Devido ao imunocomprometimento, provocado pelo metabolismo descompensado da glicose, a Diabetes Mellitus pode causar doenças cardiovasculares, oculares, nefro e neuropatias, além de alterações orais como aumento da predisposição à lesões de cárie dentária, mudanças no paladar, disfunção salivar e candidíase (International Diabetes Federation, 2017; Ferizi et al., 2018). Essas comorbidades promovem danos aos tecidos, aumentando a morbidade dos pacientes, exigindo assim o acompanhamento regular por equipe multiprofissional, evitando maiores complicações (Gupta et al., 2015; International Diabetes Federation, 2017).

É mais comum que a medição glicêmica seja realizada por meio de exames sanguíneos, entretanto como a Diabetes Mellitus acomete os indivíduos de forma sistêmica, a concentração de glicose presente no sangue pode ser refletida na saliva, dado que a mesma é um biofluido, sendo, também um elemento para diagnósticos (Ravindran et al., 2015; Gupta et al., 2015; Sharma et al., 2018).

A presença de glicose pode afetar a formação do biofilme, de forma que quanto maior a concentração de glicose salivar, maiores são as chances de infecção e maior a virulência do biofilme formado (Bezerra et al., 2019).

A *C. albicans* possui um papel importante na patogenicidade do biofilme, devido sua capacidade de morfogênese, aderência a superfícies, como estruturas protéticas e implantes, e a produção de fosfolipases, enzimas envolvidas diretamente na invasão do epitélio (Ellepola et al., 2013; 2017; Gauch et al., 2018; Bezerra et al., 2019). Relata-se que indivíduos diabéticos possuem maior

colonização por *C. albicans*, somando-se ao fato da concentração de glicose elevada, a candidíase bucal possui alta prevalência nestes indivíduos (Javed et al., 2017; Bezerra et al., 2019). Quando o fungo realiza sua morfogênese, há um rompimento da homeostase, aumentando a complexidade do biofilme (Bezerra et al., 2019).

Doenças sistêmicas podem causar alterações qualitativas e quantitativas na saliva (Malicka et al., 2015; Uppu et al., 2018). A hiperglicemia pode levar a alterações nas glândulas salivares, desregulando suas funções, devido alterações na membrana basal e em seus componentes (Malicka et al., 2015; Bhattacharyya et al., 2018). Diante disto, alterações na concentração de enzimas e proteínas da saliva, como histatinas, mucina, lactoperoxidase, mieloperoxidase, defensinas, peptídeos, lactoferrina, IgA secretora e albuminas podem predispor os diabéticos à infecções (Alves et al., 2012, Hemadi et al., 2017; Uppu et al., 2018).

O acúmulo de biofilme ao redor de implantes e próteses gera resposta inflamatória aguda, prejudicando a osseointegração, assim como exerce influência direta no controle glicêmico, embora outros fatores, como a deficiência na higiene, também podem contribuir para instalação de infecções (Monje et al., 2016; Heitz-Mayfield e Salvi, 2018).

Estudos têm sugerido maiores concentrações de glicose favorecendo o metabolismo da *C. albicans*, assim como também apontam maior susceptibilidade de pacientes diabéticos à infecções bucais, especialmente àqueles que fazem uso de próteses (Javed et al., 2017; Misha et al., 2019). Portanto, faz-se necessário verificar se a saliva constitui um fator relacionado ao desenvolvimento dos biofilmes, de forma a desenvolver estratégias para combater estas infecções

Assim, avaliou-se a interferência de padrões glicêmicos em biofilme de *C. albicans* nas superfícies abióticas de titânio e resina acrílica, verificando se a glicemia sanguínea promove reflexos na saliva, impactando o desenvolvimento do biofilme.

Materiais e Métodos

Considerações Éticas

O presente trabalho foi realizado de acordo com a legislação vigente (466/12) do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e com os princípios da Declaração de Helsinki. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba-UFPB (CEP/CCS-UFPB), sob CAAE n.º 97144618.3.0000.5188.

Coleta de Saliva

Primeiramente, foi realizada a medição glicêmica, por meio do teste da glicemia capilar, utilizando glicosímetro (Accu Chek Active, Roche, Brasil), conforme as instruções do fabricante. Em seguida, realizou-se a coleta salivar, empregando-se o estímulo do fluxo salivar, com uso de filme de parafina (Parafilm M; American Can Co, Neenah, WI, USA) como método. O participante foi orientado a mascar uma amostra de filme de parafina durante 2 minutos e em seguida a coleta da saliva foi realizada em tubos estéreis de 15 mL, durante 2 minutos adicionais (Justino et al., 2017). As amostras foram codificadas de acordo com o grupo pertencente, armazenadas em ambiente refrigerado portátil e levadas ao Laboratório de Microbiologia Oral onde foram manipuladas e armazenadas.

Amostras salivares de 95 pacientes foram obtidas, sendo 46 normoglicêmicos e 49 hiperglicêmicos. A coleta foi realizada na sala de espera para o atendimento odontológico, a maior parte em período vespertino, aproximadamente 2h após refeição.

Foram incluídos indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 35 e 70 anos, que não faziam uso de antibióticos ou antifúngicos. Não foram realizados exames bucais e pacientes que faziam uso de próteses, aparelhos ortodônticos e fumantes não foram excluídos da pesquisa.

A coleta salivar foi realizada em pacientes atendidos pelo Centro Odontológico de Cruz das Armas (COCA), localizado no bairro de Cruz das Armas (Av. Cruz das Armas, s/n, João Pessoa, PB, CEP: 58087100, Brasil). Todos os indivíduos foram inseridos no estudo após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

O critério para diagnóstico da Diabetes utilizado foi baseado em valores adaptados do Atlas da Federação Internacional de Diabetes (2019): normoglicêmicos (≤ 120 mg/dL) e hiperglicêmicos (> 120 mg/dL) de valores sanguíneos, entretanto medidos em pacientes alimentados.

Caracterização da amostra de indivíduos participantes

Os pacientes participantes da pesquisa foram caracterizados quanto ao sexo e idade média, além da categorização em normoglicêmico e hiperglicêmico.

Manipulação das amostras salivares

As amostras salivares foram centrifugadas por 8 minutos (4.500 g, 10 °C), o sobrenadante esterilizado por sistema de filtração (KASVI® ; 0,22 μ m) e em seguida armazenadas a -4°C em 10% de DMSO. Após, foram produzidos *pools* salivares de acordo com a condição glicêmica. As amostras foram utilizadas para formação da película salivar sobre a superfície dos espécimes. Para tanto, foram descongeladas à temperatura ambiente, sendo ao fim do estudo, descartadas juntamente ao lixo biológico e contaminado.

Preparação dos Espécimes

Foram utilizados espécimes de titânio e resina acrílica a base de polimetilmetacrilato (PMMA). Os espécimes de titânio, fabricados de titânio tipo IV comercialmente puro (1,3 x 1,3 x 0,2 cm), foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os espécimes de resina acrílica PMMA (TDV, Santa Catarina, Brasil) foram confeccionados de acordo com as recomendações do fabricante para dosagem e manipulação do pó acrílico e líquido monomérico.

Ainda durante a fase de trabalho, a resina foi inserida em matriz metálica com dimensões de 10 mm de diâmetro por 2 mm de espessura (Bertolini et al., 2014). Em seguida foram esterilizados por óxido de etileno.

O perfil de rugosidade de superfície dos espécimes de resina acrílica e titânio foram analisados para alocação dos mesmos em grupos com rugosidade semelhantes. Este perfil geométrico superficial foi avaliado por perfilometria óptica em Perfilômetro CCI MP (Taylor Hobson), com aumento de 20x, na área total do espécime, considerando-se os padrões de medição xy (1024x1024 pixel), xyz (512x512 pixel) e z (256x256 pixel). A velocidade foi estabelecida em 3x e os valores de rugosidade medidos em μm .

Microrganismo envolvido

Reativou-se cepa de referência de *C. albicans* (ATCC 90028), em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA), durante 24 h, a 37 °C, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspendidas em 5 mL de caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após incubação a 37° C, por 24 h, o conjunto foi centrifugado e as células suspendidas em 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%).

Com auxílio do espectrofotômetro (LGL Scientific 0741/16, Brasil), foi determinada a concentração de células, utilizando comprimento de onda de 600 nm, e densidade óptica de 0,1 contendo aproximadamente $1,0 \times 10^6$ células/mL.

Desenvolvimento dos Biofilmes e tratamentos

Os espécimes (n=12/grupo) foram inseridos horizontalmente em placas de 24 poços (KASVI®) e submetidos a formação da película salivar humana, de acordo com cada grupo (normoglicêmicos e hiperglicêmicos), permanecendo em estufa (Callmex, Florianópolis, Brasil) por 60 minutos, a 37°C. O inóculo foi semeado e as amostras incubadas a 37° C, por 24 e 72h, com troca do meio de cultura (RPMI 1640) a cada 24h. Ao meio de cultura foi adicionado 10% de saliva, de acordo com a condição glicêmica pré-estabelecida.

As placas com os espécimes de titânio foram incubadas em microaerofilia (37°C), com o objetivo de simular o ambiente peri-implantar.

Análise da Viabilidade Celular (UFC/mL)

Para análise da viabilidade celular, os espécimes (n=12/grupo) foram transferidos para tubos contendo 1,0 mL de solução salina estéril, submetidos à agitação em vórtex por 60 segundos, seguida da diluição seriada das alíquotas para determinação do número de microrganismos viáveis (10^{-1} até 10^{-6}).

Alíquotas de 10 μ L de cada diluição seriada foram semeadas em placas de ágar sabouraud dextrose (Merck KGaA, Alemanha), em triplicata. As placas foram então incubadas a 37°C por 48 h para posterior contagem de colônias viáveis. A contagem do número de células viáveis foi realizada e os valores multiplicados pela diluição seriada e convertidos em escala logarítmica. Os dados foram expressos em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Produção de Proteínas Totais

A dosagem de Proteínas Totais foi realizada por meio do Ensaio do Ponto Final, utilizando o ensaio de biureto. Os espécimes (n=12/grupo) foram lavados com solução salina estéril e submetidos à agitação em vórtex por 120 segundos. Em seguida, foram centrifugados por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Para ressuspensão foi acrescentado 50 μ L de Hidróxido de Sódio (NaOH) à 1 M, vortexado e centrifugado por 10 segundos, para lise celular. De acordo com as recomendações do fabricante, foram adicionados em tubos, 20 μ L das amostras e 1 mL do reagente biureto. Em um tubo sem amostra, para definir o padrão foram adicionados 20 μ L do padrão do teste e para o branco, 20 μ L de solução salina. As amostras foram incubadas por 10 minutos à 37°C. Após, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro e a absorbância determinada a 495 nm. A dosagem de Proteínas Totais foi calculada multiplicando a absorbância do teste pelo fator de calibração, definido a partir do padrão do teste (albumina bovina 4 g/dL).

Avaliação da atividade de Fosfolipases

A produção de fosfolipase (n=12/grupo) foi realizada de acordo com o método proposto por Price et al. (1982). A base do meio de cultivo foi preparada utilizando 10 g de peptona, 30 g de glicose, 57,3 g de cloreto de sódio, 0,55 g de cloreto de cálcio e 20 g de ágar para 1L de água destilada. O meio foi esterilizado em autoclave, resfriado a 50°C e adicionados 80 mL de emulsão de gema de ovo com 0,15% de telurito de potássio (Laborclin Produtos Pinhais, PR, Brazil). Após o cultivo dos biofilmes de *C. albicans* (ATCC 90028), as células foram removidas das superfícies e alíquotas de 20 uL inoculadas no meio de cultura a base de gema de ovo durante 7 dias a 37 °C.

Finalizado o tempo de incubação, o diâmetro das zonas hialinas ao redor das colônias foram mensuradas em mm, com auxílio de um paquímetro diretamente das placas de petri. A atividade da fosfolipase (valor de PZ/PH) foi medida em termos de razão entre o diâmetro total da colônia e a zona de precipitação. A atividade foi categorizada em 3 escores: PZ/PH <0,64 (fortemente positiva), 0,64 <PZ/PH <1 (positiva) E PZ/PH =1 (ausência de atividade).

Fluorescência

Para avaliação da morfologia da *C. albicans* foi utilizada microscopia de fluorescência com fluoróforo Calcofluor White (CFW). Os biofilmes desenvolvidos sobre as superfícies dos espécimes de resina acrílica e titânio (n=4/ grupo) foram analisados quanto a sua estrutura utilizando microscopia de fluorescência (EVOS™ FL Imaging System – ThermoFisher Scientific).

As amostras foram fixadas em solução tampão de formalina a 10% (v/v) (EasyPath) e em seguida, o biofilme foi marcado com Calcofluor White (1% (v/v) (Sigma-Aldrich) (excitação 380 nm/ emissão 475 nm) previamente diluído em solução salina 0,9%. Alíquotas de 20uL do CFW foram inseridas sobre as amostras (Cavalcanti et al., 2016). As imagens foram obtidas em 40x de aumento da objetiva em campo claro. A análise foi realizada de forma qualitativa. O

procedimento foi realizado em sala escura, e as amostras foram mantidas sob proteção da luz.

Análise dos dados

O software SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM, Chicago, IL, USA) foi empregado para análise dos dados. Após análise da normalidade (teste de ShapiroWilk) e homocedasticidade (teste de Levene), considerando 5% significância. Foram considerados os fatores de variação grupo (SA x DA) e tempo (24h x 72h). Assim, os valores de UFC/mL, dosagem de Proteínas Totais, produção de fosfolipase foram realizadas utilizando-se o teste de Mann-Whitney ($\alpha < 5\%$). A morfologia foi avaliada qualitativamente.

Resultados

A amostra de doadores de saliva foi composta por 95 indivíduos, sendo 55 do sexo feminino e 40 do sexo masculino, com idade média de 51,3 anos ($\pm 11,28$). As respectivas amostras salivares dos participantes foram utilizadas, sendo 46 normoglicêmicos e 49 hiperglicêmicos. O volume salivar final dos pacientes normoglicêmicos foi 99,7 g/mL e hiperglicêmicos 98,45 g/mL, sendo assim, no que se refere ao fluxo salivar (mL/min), não houve diferença entre os grupos normo e hiperglicêmicos ($p = 0,75$) (dado não apresentado).

A viabilidade celular do biofilme, avaliada a partir da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), determinou que não houve diferença entre os tempos de 24 e 72h ($p > 0,05$) para os normoglicêmicos, assim como para os hiperglicêmicos. Quando comparados entre os grupos de acordo com o padrão de glicemia, também não houve diferença em 24 ou 72h de cultivo ($p > 0,05$), tanto para os espécimes de resina acrílica como para os espécimes de titânio (figuras 1.a e 1.b).

Os valores de mediana obtidos sobre as superfícies de resina acrílica foram de 6,4 UFC/mL e 6,5 UFC/mL para as análises de 24 e 72h

respectivamente, não havendo diferenças entre os grupos em ambos tempos de cultivo. Sobre as superfícies de titânio o valor de mediana foi de 6,5 UFC/mL para análise 24h e de 72h não havendo diferenças entre os grupos (NG x HG).

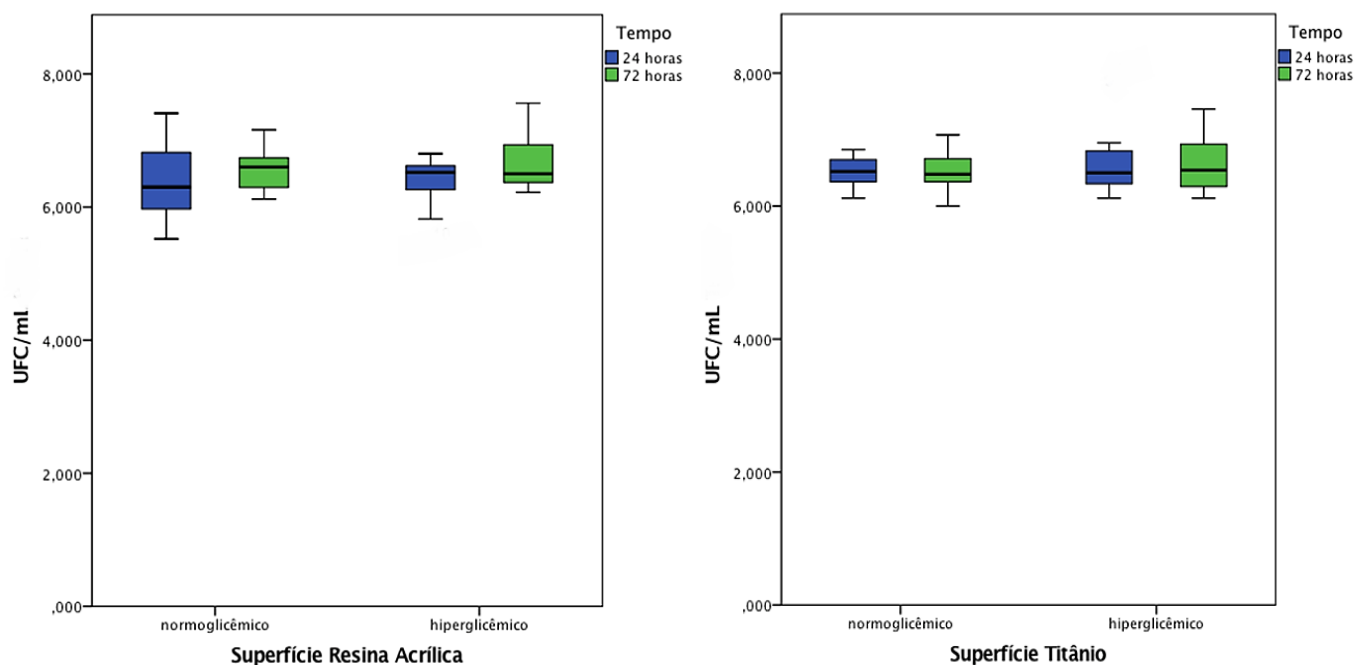


Figura 1.a e 1.b- Viabilidade celular (UFC/mL) dos biofilmes cultivados por 24 e 72h (n=12/grupo) sobre superfícies de Resina acrílica (a) e Titânio (b). Mann Whitney, $p>0,05$. **Diagrama de caixas onde: cada caixa contém 50% dos dados do grupo; os limites inferiores e superiores das caixas representam os percentis 25 e 75, respectivamente; as extremidades das antenas representam os valores mínimo e máximo do grupo; e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana.

Quanto à dosagem de Proteínas Totais, determinada pela absorvância, verificou-se que não houve diferença entre os tempos de 24 e 72h ($p>0,05$) para os normoglicêmicos, assim como para os hiperglicêmicos. Da mesma forma, quando comparados entre os grupos, também não houve diferença em 24 ou 72h de cultivo ($p>0,05$), verificando-se valores próximos quanto à produção de Proteínas Totais, tanto para os espécimes de resina acrílica como para os espécimes de titânio (figuras 2.a e 2.b). Os valores de mediana sobre as

superfícies de resina acrílica foram 0,3 g/dL e 2,1 g/dL para as análise de 24 e 72h respectivamente. Para as superfícies de titânio as medianas foram -0,7 g/dL em 24h e 0,2 g/dL em 72h de cultivo, sem diferença entres os grupos para ambas as superfícies.

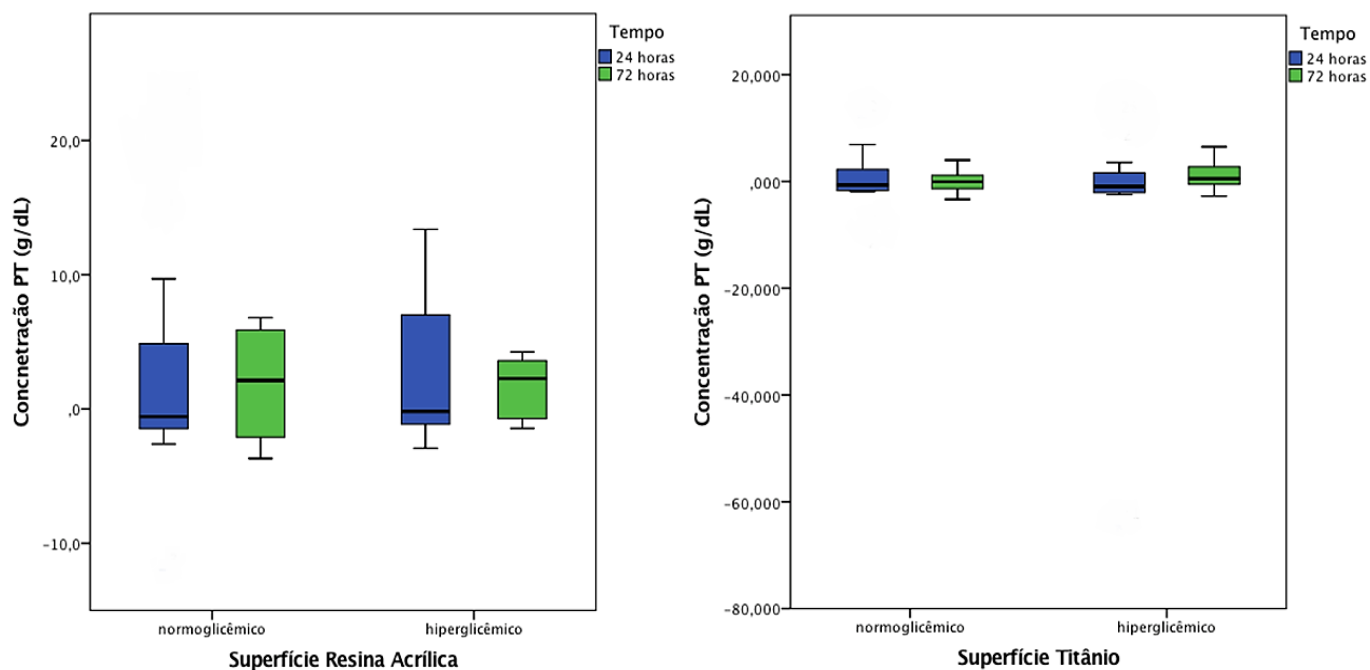


Figura 2.a e 2.b- Produção de Proteínas Totais pelos biofilmes cultivados por 24 e 72h (n=12/grupo) sobre superfícies de Resina acrílica (a) e Titânio (b). Mann Whitney, $p > 0,05$. **Diagrama de caixas onde: cada caixa contém 50% dos dados do grupo; os limites inferiores e superiores das caixas representam os percentis 25 e 75, respectivamente; as extremidades das antenas representam os valores mínimo e máximo do grupo; e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana.

Para a atividade de fosfolipase por *C. albicans*, verificou-se atividade fortemente positiva (Pz valor (PZ/PH) < 0,64), verificando os biofilmes analisados com alta atividade destas enzimas. Este resultado de atividade dos biofilmes foi verificado para os espécimes de resina acrílica e titânio, sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparados entre grupos e entre tempos (24 x 72h) (figuras 3. e 3.b). Não houveram variações detectáveis para a

razão, com valor mediano de 0,6mm para ambos os materiais, nas análises as 24 e 72h.

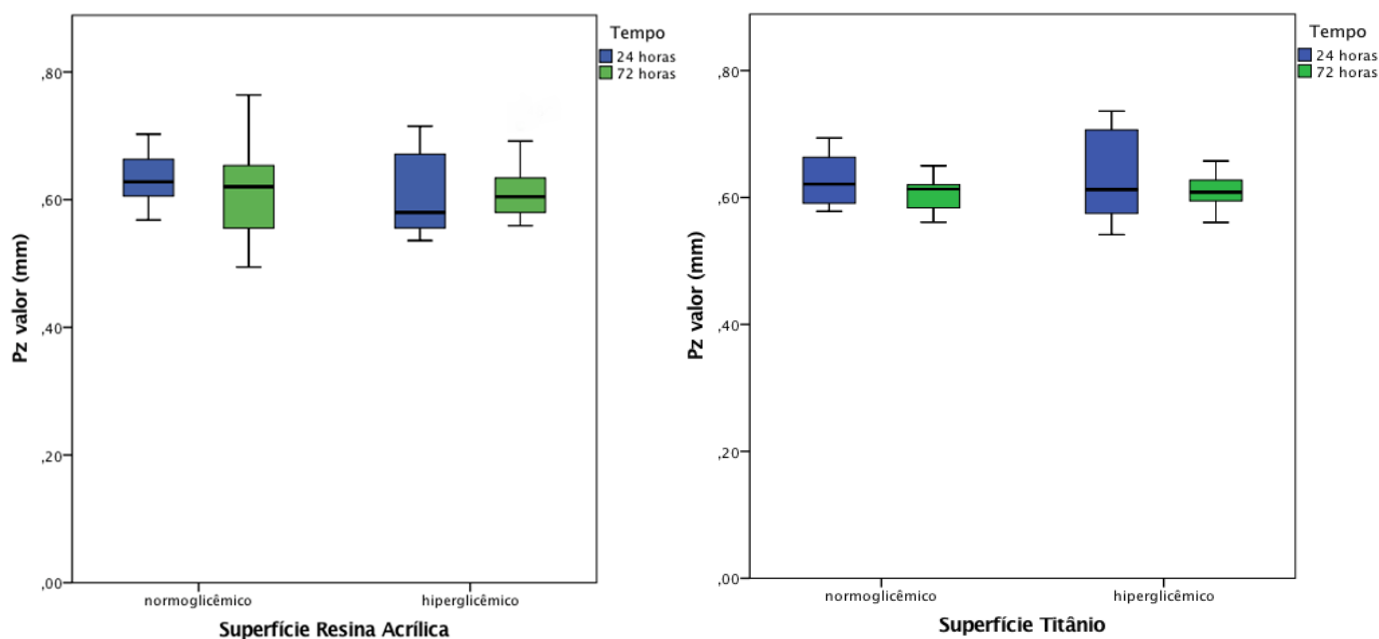


Figura 3.a 3.b- Produção de fosfolipase- Pz valor (mm) dos biofilmes cultivados por 24 e 72h (n=12/grupo) sobre superfícies de Resina acrílica (a) e Titânio (b). Mann Whitney, $p>0,05$. **Diagrama de caixas onde: cada caixa contém 50% dos dados do grupo; os limites inferiores e superiores das caixas representam os percentis 25 e 75, respectivamente; as extremidades das antenas representam os valores mínimo e máximo do grupo; e a linha horizontal no interior da caixa representa a mediana.

A microscopia de fluorescência, nos espécimes de resina acrílica, revelou aglomerações celulares com predomínio de hifas e pseudo-hifas em ambos os grupos e tempos avaliados. As hifas apresentam-se como células alongadas, ocupando uma maior proporção de área, já os conídeos, encontrados em pequena quantidade nas imagens, apresentavam forma ovóide, ocupando menor área. Para o grupo normoglicêmico, no tempo de 24h, observou-se menor proporção de proliferação das hifas e pseudo-hifas, já no grupo hiperglicêmico, ligeiro aumento da biomassa em ambos os tempos. As hifas, pseudo-hifas e colônias apresentaram-se fluorescentemente “azul-esbranquiçadas” quando expostas à luz ultravioleta (figura 4).

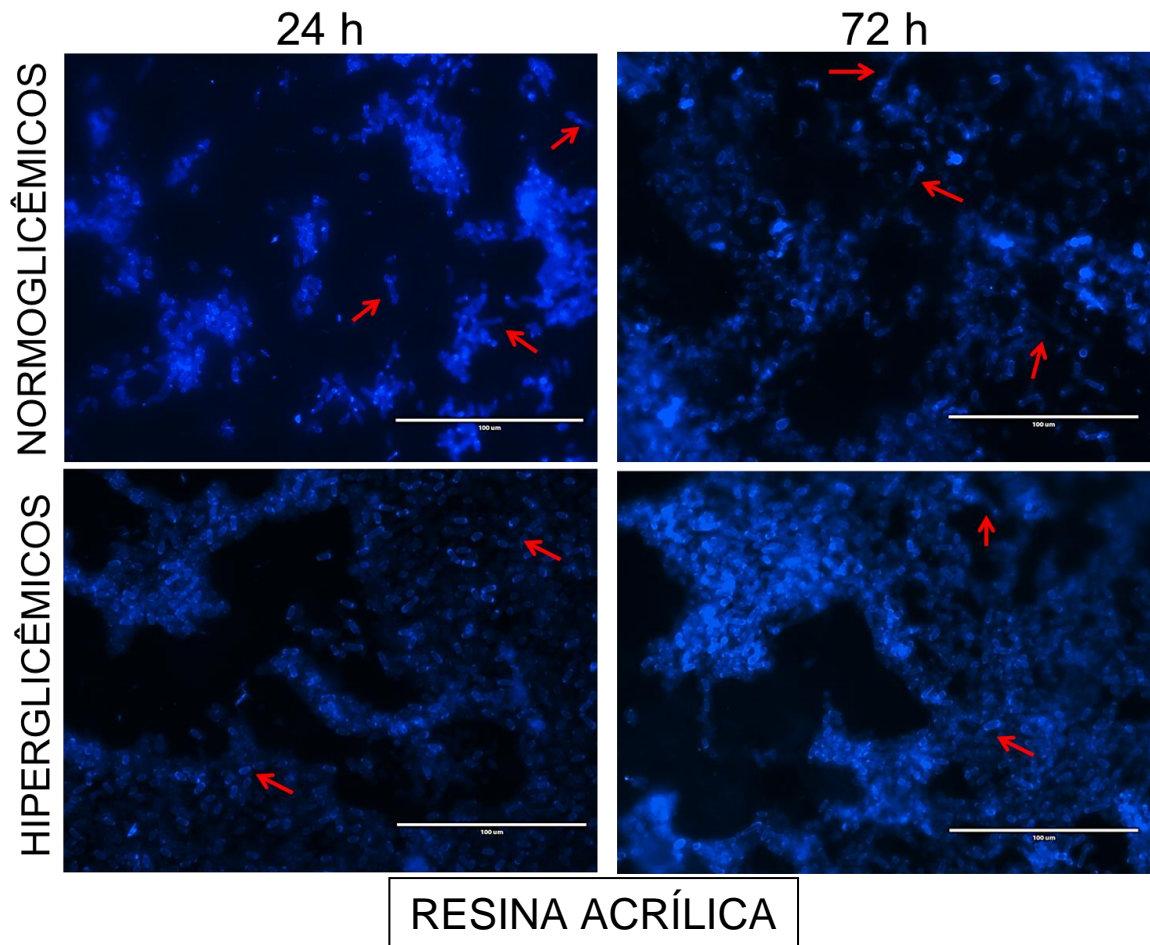


Figura 4- Fotomicrografias de biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 90028) desenvolvidos sobre superfícies de resina acrílica de acordo com a condição glicêmica, nos tempos de 24 e 72h. Imagens são visualizadas por microscopia de fluorescência nos canais azul (CFW). Células de *Candida albicans* são visualizadas na cor azul. As imagens são visualizadas no aumento de 40x, representativos de 5 campos de cada amostra. As setas vermelhas apontam hifas de *C. albicans*.

Para os espécimes de titânio, observou-se na microscopia de fluorescência, biomassa densa e distribuída uniformemente com predomínio de hifas ou pseudo-hifas, em ambos os grupos e tempos avaliados. Nas imagens é possível observar o aspecto filamentososo das hifas, ocupando uma grande área. As hifas, pseudo-hifas e colônias apresentaram-se fluorescentemente “azul-esbranquiçadas” quando expostas à luz ultravioleta como indicado nas setas vermelhas (figura 5).

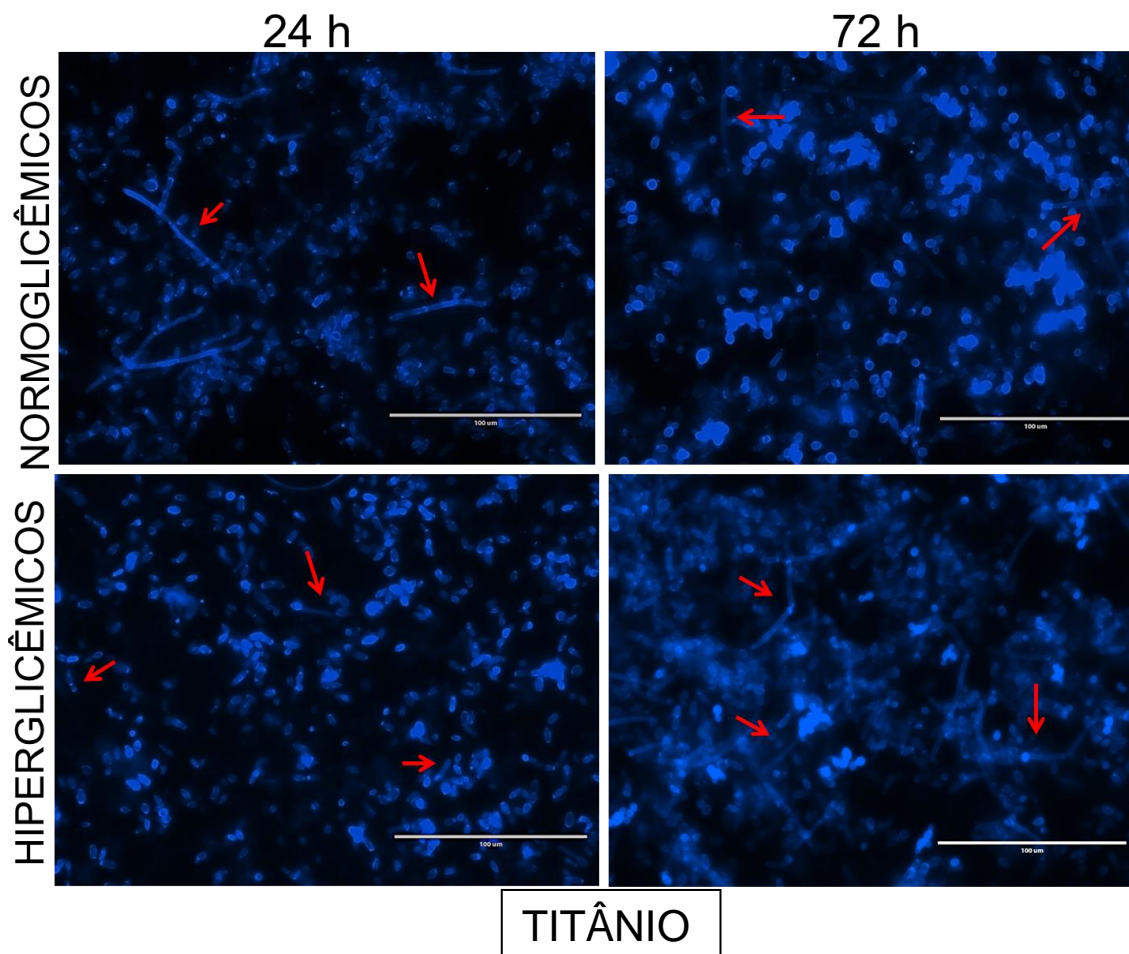


Figura 5- Fotomicrografias de biofilmes de *Candida albicans* (ATCC 90028) desenvolvidos sobre superfícies de titânio de acordo com a condição glicêmica, nos tempos de 24 e 72h. Imagens são visualizadas por microscopia de fluorescência nos canais azul (CFW). Células de *Candida albicans* são visualizadas na cor azul. As imagens são visualizadas no aumento de 40x, representativos de 5 campos de cada amostra. As setas vermelhas apontam hifas de *C. albicans*.

Discussão

O ambiente bucal também é afetado pelas desordens metabólicas, visto que níveis de glicose sanguíneos refletidos na saliva podem criar um ambiente com condições favoráveis a colonização e proliferação de microrganismos na mucosa e em superfícies, como estruturas protéticas e implantes (Bhattacharyya et al., 2018; Heitz-Mayfield e Salvi, 2018; Uppu et al., 2018). Tendo em vista a

virulência e capacidade de colonização da *C. albicans* em diversas estruturas, biofilmes de *C. albicans* foram cultivados sobre superfícies de resina acrílica e titânio, utilizando saliva humana de pacientes normoglicêmicos e hiperglicêmicos, simulando condições clínicas frequentes de infecções com envolvimento deste fungo, como estomatite protética e perimucosite.

Verificou-se que o tempo de cultivo dos biofilmes, bem como o perfil glicêmico sanguíneo, o qual pode ser refletido pela saliva, não determinou efeitos distintos na adesão e metabolismo do biofilme. Este achado pode ser decorrente do fato da glicemia sanguínea dos pacientes não possuírem valores muito elevados (acima de 250 mg/dL), já que a glicose elevada predispõe a proliferação dos microrganismos (Bezerra et al., 2019; Gulia et al., 2018). Avaliações nesta temática são frequentes (Dodds et al., 2000; Vasconcelos et al., 2010; Gupta et al., 2015; Abd-Elraheem et al., 2017; Aitken-Saavedra et al., 2018; Bhattacharyya et al., 2018; Ferizi et al., 2018; Uppu et al., 2018) entretanto ainda controversas.

A produção de fosfolipases, enzimas que degradam a membrana celular, conferem à *C. albicans* a capacidade de instalação das infecções (Ellepola et al., 2016; 2017; Aitken-Saavedra et al., 2018). Verificou-se que o biofilme apresentou atividade fortemente positiva, não havendo interferência do padrão glicêmico para este fator de virulência. Isto se deve ao fato de o valor da glicemia não ser alto a nível de promover grandes alterações (Gulia et al., 2018) ou com um aumento da insulina sanguínea não compatível a um distúrbio crônico. Indica-se que as enzimas produzidas foram capazes de hidrolisar os fosfolipídeos de maneira uniforme (Ellepola et al., 2016). Ausência de diferença para produção de fosfolipases foi observada quando comparados indivíduos saudáveis com grupos de pacientes diabéticos e usuários de próteses (Ellepola et al., 2016).

Por meio de amostras salivares, é possível avaliação de seu conteúdo proteico, assim como também encontram-se proteínas adsorvidas na matriz extracelular do biofilme (Izumi et al., 2015; Malicka et al., 2015; Hemadi et al., 2017; Uppu et al., 2018). A avaliação da produção de proteínas totais neste estudo, não apresentou diferença, corroborando os achados de Uppu et al.

(2018). Foi sugerido que o resultado encontrado para o aumento da concentração de proteínas em outro estudo seja devido mecanismos específicos da doença relacionados à membrana basal (Dodds et al., 2000).

É reconhecido que componentes sanguíneos são refletidos na saliva, sendo as proteínas salivares um exemplo (Gupta et al., 2015; Lopes et al., 2015; Ravindran et al., 2015; Sharma et al., 2018). Porém, apesar das glândulas salivares secretarem conteúdo proteico, os componentes presentes na saliva mostram-se em menor concentração, quando comparados ao sangue (Lopes et al., 2015) e, conseqüentemente, isto é refletido no biofilme.

A disponibilidade de glicose favorece o desenvolvimento do biofilme, tornando-o mais complexo. Relata-se que quanto maior a concentração de glicose maior a viabilidade e acidez do biofilme, em estudo *in vitro* (Bezerra et al., 2019). Nas imagens obtidas por fluorescência, verificou-se aumento da biomassa sobre superfícies de resina acrílica no grupo hiperglicêmico, podendo-se sugerir que o valor de glicose mais elevada e a rugosidade de superfície da resina tenha influenciado na adesão do microrganismo (Gulia et al., 2018; Bezerra et al., 2019). Destaca-se que a patogenicidade de biofilmes pode diferir, apesar da semelhança na densidade celular (Bezerra et al., 2019), fato não observado pelo estudo.

A *C. albicans* pode estar relacionada à doenças peri-implantares, por ser um microrganismo de coagregação ao biofilme que se forma ao redor dos implantes, além de que quando associada a outras espécies tornam-se mais virulentas (Cavalcanti et al., 2014; Bezerra et al., 2019). Casos em que a osteointegração não ocorre de maneira satisfatória constituem nichos para instalação microbiana (Gurgel et al., 2017). Além do biofilme, outros fatores como rugosidade das superfícies, higiene deficiente, histórico de doença periodontal e tabagismo podem contribuir para doenças periimplantares (Cavalcanti et al., 2014; Gurgel et al., 2017).

Os biofilmes aderidos sobre as superfícies de titânio não foram afetados pelo padrão glicêmico, porém sabe-se que fatores sistêmicos relacionados aos indivíduos podem estar associados a periimplantite (Gurgel et al., 2017). Por isso,

comparações devem ser cautelosas (Gulia et al., 2018), visto que os resultados trazidos pelos autores deste presente estudo são *in vitro*. É sugerido pela literatura que a alteração glicêmica interfira na angiogênese e na cicatrização, comprometendo os implantes instalados (International Diabetes Federation, 2017; Hu et al., 2018), entretanto ainda há uma lacuna na literatura no que se refere a osseointegração em pacientes diabéticos, necessitando de mais evidências (Heitz-Mayfield e Salvi, 2018; Hu et al., 2018).

Relata-se o baixo controle glicêmico como motivo de maior formação de biofilme em indivíduos diabéticos (Bezerra et al., 2019; Gulia et al., 2018, Uppu et al., 2018). A formação do biofilme depende de alguns fatores, como o tipo de saliva utilizado, bem como o substrato e os microrganismos envolvidos. Na cavidade bucal, têm-se além da saliva, a interação de outros microrganismos que não estão envolvidos no biofilme influenciando na formação do mesmo (Gulia et al., 2018). Neste estudo foi utilizada saliva humana filtrada para formação da película salivar, além da incorporação da mesma no meio, buscando reproduzir a presença de proteínas e imunoglobinas da cavidade bucal.

Os resultados obtidos neste presente estudo estão relacionados à metodologia e amostra utilizada, logo refletem características da mesma. Sendo assim, existem algumas limitações, como apenas uma monocamada de biofilme uniespécie, além do bom controle glicêmico dos indivíduos, mesmo àqueles considerados hiperglicêmicos no momento do teste capilar, supondo-se que parte deste grupo estivesse compensado, podendo ter ocorrido apenas um pico de glicemia no momento da medição, devido a ansiedade prévia ao atendimento odontológico, por exemplo.

Tendo ciência disto, a realização da medição da hemoglobina glicada (HbA1c), poderia auxiliar na obtenção de informações mais concretas sobre o controle da doença, podendo talvez, identificar diferenças entre os participantes do estudo.

Diante do exposto, destaca-se a presença de saliva no biofilme desenvolvido, semelhante à cavidade oral, como um diferencial do estudo e a

importância da avaliação de outros fatores como perfil inflamatório das células salivares, pH salivar, fatores nutricionais, hábitos nocivos a exemplo do fumo, ansiedade prévia ao atendimento odontológico e exame para diagnóstico de lesões cariosas, que também influenciam na arquitetura do biofilme e na susceptibilidade do hospedeiro (Nazir et al., 2018).

Conclusão

A concentração de glicose, avaliada por meio da glicemia, não influencia a proliferação e o metabolismo do biofilme de *C. albicans* sobre superfícies abióticas no modelo empregado.

Financiamento: IMB recebeu um apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). ACMB recebeu apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Em conformidade com padrões éticos.

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências:

Abd-Elraheem, S. E., El Saeed, A. M., & Mansour, H. H. (2017). Salivary changes in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Syndr*, 11(Suppl 2), S637-S641. <https://doi:10.1016/j.dsx.2017.04.018>.

Aitken-Saavedra, J., Lund, R. G., González, J., Huenchunao, R., Perez-Vallespir, I., Morales-Bozo, I., Urzúa, B., Tarquinio, S. C., Maturana-Ramírez, A., Martos, J., Fernandez-Ramires, R., & Molina-Berríos, A. (2018). Diversity, frequency and antifungal resistance of *Candida* species in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Odontol Scand*, 76(8), 580-586. <http://doi:10.1080/00016357.2018.1484154>.

Alves, C., Menezes, R., & Brandão, M. (2012). Salivary flow and dental caries in Brazilian youth with type 1 diabetes mellitus. *Indian J Dent Res*, 23(6), 758-62. [http://doi: 10.4103/0970-9290.111254](http://doi:10.4103/0970-9290.111254).

Andreola, P., Demathé, A., Galafassi, D., Elsemann, E. B., Elsemann, R. B., & Gazzoni, A. F. (2016). Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Revista de Odontologia da UNESP*, 45(4), 219-226. <https://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.26115>.

Bertolini, M. M., Portela, M. B., Curvelo, J. A., Soares, R. M., Lourenço, E. J., & Telles, D. M. (2014). Resins-based denture soft lining materials modified by chlorhexidine salt incorporation: an in vitro analysis of antifungal activity, drug release and hardness. *Dent Mater*, 30(8), 793-8. [http://doi: 10.1016/j.dental.2014.05.004](http://doi:10.1016/j.dental.2014.05.004).

Bhattacharyya, A., Chandra, S., Singh, A., Raj, V., & Gupta, B. (2018). Salivary glucose levels and oral candidal carriage in Type 2 diabetics. *J Oral Biol Craniofac Res*, 8(3), 158-164. [http://doi: 10.1016/j.jobcr.2016.11.004](http://doi:10.1016/j.jobcr.2016.11.004).

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. (2019). Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. *J Investig Clin Dent*, 10(3), e12412. <http://doi:10.1111/jicd.12412>.

Cavalcanti, I. M. G., Ricomini Filho, A. P., Lucena-Ferreira, S. C., da Silva, W. J., Paes Leme, A. F., Senna, P. M., & Del Bel Cury, A. A. (2014). Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol*, 59(7), 695-703. [http://doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.04.001](http://doi:10.1016/j.archoralbio.2014.04.001).

Cavalcanti, Y. W., Wilson, M., Lewis, M., Del Bel Cury, A. A., Silva, W. J., & Williams, D. W. (2016). Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling*, 32(2), 123-134. <http://dx.doi.org/10.1080/08927014.2015.1125472>

Costa-Orlandi, C. B., Sardi, J. C. O., Pitangui, N. S., de Oliveira, H. C., Scorzoni, L., Galeane, M. C., Medina-Alarcón, K. P., Melo, W. C. M. A., Marcelino, M. Y., Braz, J. D., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2017). Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *J Fungi (Basel)*, 3(2), pii: E22. [http://doi: 10.3390/jof3020022](http://doi:10.3390/jof3020022).

Dodds, M. W., Yeh, C. K., & Johnson, D. A. (2000). Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol*, 28(5), 373-81. PubMed PMID: 11014514.

Ellepola, A. N., Joseph, B. K., & Khan, Z. U. (2013). Changes in the cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, and healthy individuals following limited exposure to chlorhexidine gluconate. *Med Princ Pract*, 22(3), 250-254. <http://doi: 10.1159/000345641>.

Ellepola, A. N., Samaranayake, L. P., & Khan, Z. U. (2016). Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Braz J Microbiol*, 47(4), 911-916. <http://doi:10.1016/j.bjm.2016.06.009>.

Ellepola, K., Liu, Y., Cao, T., Koo, H., & Seneviratne, C. J. (2017). Bacterial GtfB Augments *Candida albicans* Accumulation in Cross-Kingdom Biofilms. *J Dent Res*, 96(10), 1129-1135. <http://doi: 10.1177/0022034517714414>.

Ferizi, L., Dragidella, F., Spahiu, L., Begzati, A., & Kotori, V. (2018). The Influence of Type 1 Diabetes Mellitus on Dental Caries and Salivary Composition. *Int J Dent*, 2018:5780916. <http://doi: 10.1155/2018/5780916>.

Gauch, L. M. R., Pedrosa, S. S., Silveira-Gomes, F., Esteves, R. A., & Marques-da-Silva, S. H. (2018). Isolation of *Candida spp.* from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol*, 49(1), 148-151. <http://doi: 10.1016/j.bjm.2017.07.001>.

Gulia, S., Bhatt, V., Shetty, M., Prasad, K. D., & Gupta, P. (2018). Effect of Type II Diabetes Mellitus, *Candida Albicans* and *Streptococcus Mutans* on the Biofilm Formation on Prosthetic Materials. *J Contemp Dent Pract*, 19(12), 1538-1545. PubMed PMID: 30713186.

Gupta, S., Sandhu, S. V., Bansal, H., & Sharma, D. (2015). Comparison of salivary and serum glucose levels in diabetic patients. *J Diabetes Sci Technol*, 9(1): 91-96. <http://doi: 10.1177/1932296814552673>.

Gurgel, B. C. V., Montenegro, S. C. L., Dantas, P. M. C., Pascoal, A. L. B., Lima, K. C., & Calderon, P. D. S. (2017). Frequency of peri-implant diseases and associated factors. *Clin Oral Implants Res*, 28(10), 1211-1217. <http://doi: 10.1111/clr.12944>.

Heitz-Mayfield, L. J. A., & Salvi, G. E. (2018). Peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*, 45(Suppl 20), S237–S245. <http://doi: 10.1111/jcpe.12953>.

Hemadi, A. S., Huang, R., Zhou, Y., & Zou, J. (2017). Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci*, 9(11), 1-8. [http:// doi: 10.1038/ijos.2017.35](http://doi:10.1038/ijos.2017.35).

Hu, X. F., Wang, L., Xiang, G., Lei, W., & Feng, Y. F. (2018). Angiogenesis impairment by the NADPH oxidase-triggered oxidative stress at the bone-implant interface: Critical mechanisms and therapeutic targets for implant failure under hyperglycemic conditions in diabetes. *Acta Biomater*, 73, 470-487. [http:// doi:10.1016/j.actbio.2018.04.008](http://doi:10.1016/j.actbio.2018.04.008).

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2017. Brussels: Belgium. [accessed 2019 Aug 12]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Ninth edition 2019. Brussels: Belgium. [accessed 2019 Nov 25]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>

Izumi, M., Zhang, B. X., Dean, D. D., Lin, A. L., Saunders, M. J., Hazuda, H. P., & Yeh, C. K. (2015). Secretion of salivary statherin is compromised in uncontrolled diabetic patients. *BBA Clin*, 3, 135-140. PubMed PMID: 25793156

Javed, F., Al-Kheraif, A. A., Kellesarian, S.V., Vohra, F., & Romanos, G. E. (2017). Oral *Candida* carriage and species prevalence in denture stomatitis patients with and without diabetes. *J Biol Regul Homeost Agents*, 31(2), 343-346. PMID: 28685534.

Justino, A. B., Teixeira, R. R., Peixoto, L. G., Jaramillo, O. L. B., & Espindola, F. S. (2017). Effect of saliva collection methods and oral hygiene on salivary biomarkers. *Scand J Clin Lab Invest*, 77(6), 415-422. [http:// doi: 10.1080/00365513.2017.1334261](http://doi:10.1080/00365513.2017.1334261).

Lopes RF, Rama LMPL, Teixeira AMMB. Origem, composição, processos de recolha e conservação da saliva para análise de biomarcadores relevantes no controle da resposta ao exercício. In: *Annals of Research in Sport and Physical Activity*, nº 6, 2015. Coimbra. Portugal: Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física. p. 45-58

Malicka, B., Kaczmarek, U., & Skośkiewicz-Malinowska, K. (2015). Selected antibacterial factors in the saliva of diabetic patients. *Arch Oral Biol*, 60(3), 425-431. [http:// doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.07.010](http://doi:10.1016/j.archoralbio.2014.07.010).

Mishra, N., Trivedi, A., Gajdhar, S. S., Bhagwat, H., Khutwad, G. K., Mall, P. E., Kulkarni, D. (2019). Correlation of Blood Glucose Levels, Salivary Glucose Levels and Oral Colony Forming Units of *Candida albicans* in Type 2 Diabetes Mellitus

Patients. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 20(4), 494-495. <http://doi:10.5005/jp-journals-0000-0000>.

Monje, A., Aranda, L., Diaz, K. T., Alarcón, M. A., Bagramian, R. A., Wang, H. L., & Catena, A. (2016). Impact of Maintenance Therapy for the Prevention of Peri-implant Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*, 95(4), 372-9. <http://doi:10.1177/0022034515622432>.

Nazir, M. A., AlGhamdi, L., AlKadi, M., AlBejan, N., AlRashoudi, L., & AlHussan, M. (2018). The burden of Diabetes, Its Oral Complications and Their Prevention and Management. *Open Access Maced J Med Sci*, 6(8), 1545-1553. <http://doi:10.3889/oamjms.2018.294>.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. (1982). Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20(1), 7-14. PubMed PMID:7038928.

Ravindran, R., Gopinathan, D. M., & Sukumaran, S. (2015). Estimation of Salivary Glucose and Glycogen Content in Exfoliated Buccal Mucosal Cells of Patients with Type II Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res*, 9(5), 89-93. <http://doi:10.7860/JCDR/2015/11633.5971>.

Sharma, S. K., Singh, N., Thimmaraju, K. V., & Tilak, M. (2018). A Comparative Study on Salivary Glucose Level in Diabetic Patients and Healthy Individuals. *National Journal of Laboratory Medicine*, 7(3), 1-4. [http:// DOI: 10.7860/NJLM/2018/36967:2290](http://DOI:10.7860/NJLM/2018/36967:2290).

Uppu, K., Sahana, S., Madu, G. P., Vasa, A. A., Nalluri, S., & Raghavendra, K. J. (2018). Estimation of Salivary Glucose, Calcium, Phosphorus, Alkaline Phosphatase, and Immunoglobulin A among Diabetic and Nondiabetic Children: A Case-Control Study. *Int J Clin Pediatr Dent*, 11(2), 71-78. [http:// doi: 10.5005/jp-journals-10005-1488](http://doi:10.5005/jp-journals-10005-1488).

Vasconcelos, A. C., Soares, M. S., Almeida, P. C., & Soares, T. C. (2010). Comparative study of the concentration of salivary and blood glucose in type 2 diabetic patients. *J Oral Sci*, 52(2), 293-298. PubMed PMID: 20587956.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A saliva é um biofluido que permite a avaliação de componentes presentes na cavidade bucal e na corrente sanguínea, com a vantagem de sua coleta ser um método menos invasivo, com menos custos, além não exigir nenhuma habilidade especial, facilitando em alguns casos, como àqueles estudos que necessitam de amostras em grandes quantidades (Lopes et al., 2015; Gupta et al., 2015; Bhattacharyya et al., 2018; Sharma et al., 2018).

A Diabetes Mellitus acomete mundialmente 463 milhões de indivíduos, e suas estimativas são que sua incidência e prevalência continuem a aumentar, fato que gera preocupação devido suas complicações que vão desde problemas de saúde bucal à alterações cardiovasculares (International Diabetes Federation, 2019). As consequências da doença contribuem para o aumento da morbidade nos indivíduos, acarretadas principalmente pela hiperinsulinemia, tornando os indivíduos mais susceptíveis a infecções (Gupta et al., 2015; International Diabetes Federation, 2019; Uppu et al., 2018).

A *C. albicans* é um fungo oportunista, com diversos fatores de virulência, como a produção de enzimas extracelulares, como fosfolipases e proteinases (Ellepola et al., 2014). A ausência de controle glicêmico persistente em pacientes diabéticos ocasiona alterações nos vasos sanguíneos e glândulas salivares (Bhattacharyya et al., 2018), por isso mais estudos vêm sendo realizados, buscando um melhor entendimento das particularidades individuais que esta doença pode causar, visto que os resultados não são unânimes (Dodds et al., 2000; Vasconcelos et al., 2010; Gupta et al., 2015; Abd-Elraheem et al., 2017; Aitken-Saavedra et al., 2018; Bhattacharyya et al., 2018; Ferizi et al., 2018; Uppu et al., 2018).

A utilização de saliva humana para formação da película salivar e sua incorporação ao meio constituem um diferencial deste estudo. A utilização de metodologias diferentes (Izumi et al., 2015), a exemplo da realização de coleta não estimulada de outros estudos (Dodds et al., 2000; Malicka et al., 2015), idade

e tamanho da amostra são fatores que devem considerados na análise dos resultados. Além disso, deve-se considerar que este estudo realizou as análises nos biofilmes e não nas amostras salivares.

Aponta-se que o biofilme maduro (72 h) não é influenciado pelo padrão glicêmico (Cavalcanti et al., 2016), o qual foi verificado também neste presente estudo, em que não observou-se diferença no crescimento do biofilme nos diferentes períodos de avaliação, tipos de superfícies e película salivar.

Este estudo tem impacto por ampliar a compreensão da hiperglicemia e sua influência em aspectos relacionados a cavidade bucal e ao fluido salivar, auxiliando na redução dos agravos. Além disso, reafirma-se a capacidade de utilização da saliva como um método de avaliação do estado de saúde dos indivíduos.

Tem-se como perspectivas a realização de uma revisão sistemática buscando responder a seguinte pergunta: Indivíduos diabéticos comparados a não diabéticos possuem maior prevalência de Candidíase bucal?

Em resumo, os achados mostram uma metodologia útil e promissora para estudos futuros, podendo-se incluir a realização da citologia bucal e do exame da hemoglobina glicada (HbA1c) para rastreamento da diabetes e exame clínico bucal dos pacientes para avaliação de lesões cariosas.

4. CONCLUSÃO

A concentração de glicose sanguínea não influencia a proliferação e o metabolismo do biofilme de *C. albicans* sobre superfícies abióticas na metodologia utilizada.

REFERÊNCIAS*

Aguirre-Zorzano LA, Estefanía-Fresco R, Telletxea O, Bravo M. Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(11): 1338-44.

Aitken-Saavedra J, Lund RG, González J, Huenchunao R, Perez-Vallespir I, Morales-Bozo I, *et al.* Diversity, frequency and antifungal resistance of *Candida* species in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Odontol Scand.* 2018; 76(8): 580-586.

Alves C, Menezes R, Brandão M. Salivary flow and dental caries in Brazilian youth with type 1 diabetes mellitus. *Indian J Dent Res.* 2012; 23(6): 758-62.

Bezerra NVF, Brito ACM, de Medeiros MMD, de França Leite KL, Bezerra IM, de Almeida LFD, *et al.* Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. *J Investig Clin Dent.* 2019;10(3): e12412.

Bhattacharyya A, Chandra S, Singh A, Raj V, Gupta B. Salivary glucose levels and oral candidal carriage in Type 2 diabetics. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2018; 8(3): 158-164.

Cavalcanti IMG, Ricomini Filho AP, Lucena-Ferreira SC, da Silva WJ, Paes Leme AF, Senna PM, *et al.* Salivary pellicle composition and multispecies biofilm developed on titanium nitrided by cold plasma. *Arch Oral Biol.* 2014; 59(7): 695-703.

Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Williams D, Senna PM, Del Bel Cury AA, *et al.* Salivary pellicles equalise surfaces' charges and modulate the virulence of *Candida albicans* biofilm. *Arch Oral Biol.* 2016; 66: 129-140.

Cavalcanti YW, de Almeida LFD, Probst LV, Cavalcante DB, Frias AC, Bulgareli JV, *et al.* Factors that influence the Oral Impact on Daily Performance of elderly people in Brazil: a cross-sectional population-based study. *Qual Life Res;* no prelo 2018.

Dodds MW, Yeh CK, Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000; 28(5): 373-81.

Ellepola AN, Joseph BK, Khan ZU. Changes in the cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, and healthy individuals

following limited exposure to chlorhexidine gluconate. *Med Princ Pract.* 2013; 22(3): 250-4.

Ellepola AN, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses.* 2014; 57(9): 553-9.

Ellepola K, Liu Y, Cao T, Koo H, Seneviratne CJ. Bacterial GtfB augments *candida albicans* accumulation in cross-kingdom biofilms. *J Dent Res.* 2017; 96(10): 1129-1135.

Ferizi L, Dragidella F, Spahiu L, Begzati A, Kotori V. The influence of type 1 diabetes mellitus on dental caries and salivary composition. *Int J Dent.* 2018; 2018: 5780916.

Gauch LMR, Pedrosa SS, Silveira-Gomes F, Esteves RA, Marques-da-Silva SH. Isolation of *Candida spp.* from denture-related stomatitis in Pará, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2018; 49(1): 148-151.

Gupta S, Sandhu SV, Bansal H, Sharma D. Comparison of salivary and serum glucose levels in diabetic patients. *J Diabetes Sci Technol.* 2015; 9(1): 91-6.

Gurgel BCV, Montenegro SCL, Dantas PMC, Pascoal ALB, Lima KC, Calderon PDS. Frequency of peri-implant diseases and associated factors. *Clin Oral Implants Res.* 2017; 28(10): 1211-1217.

Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci.* 2017; 9(11): 1-8.

Hu XF, Wang L, Xiang G, Lei W, Feng YF. Angiogenesis impairment by the NADPH oxidase-triggered oxidative stress at the bone-implant interface: Critical mechanisms and therapeutic targets for implant failure under hyperglycemic conditions in diabetes. *Acta Biomater.* 2018; 73: 470-487.

International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2017. Brussels: Belgium. [accessed 2019 Aug 12]. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>

Jin Y, Samaranayake LP, Samaranayake Y, Yip HK. Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars. *Arch Oral Biol.* 2004; 49(10): 789-98.

Justino AB, Teixeira RR, Peixoto LG, Jaramillo OLB, Espindola FS. Effect of saliva collection methods and oral hygiene on salivary biomarkers. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017; 77(6): 415-422.

Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017; 62: 1-12.

Lopes RF, Rama LMPL, Teixeira AMMB. Origem, composição, processos de recolha e conservação da saliva para análise de biomarcadores relevantes no controle da resposta ao exercício. In: *Annals of Research in Sport and Physical Activity*, nº 6, 2015. Coimbra. Portugal: Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física. p. 45-58

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*. 2016; 2016: 4372852.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília, DF: SVS; 2012.

Nazir MA, AlGhamdi L, AlKadi M, AlBejan N, AlRashoudi L, AlHussan M. The burden of Diabetes, Its Oral Complications and Their Prevention and Management. *Open Access Maced J Med Sci*. 2018; 6(8): 1545-1553.

Oncul B, Karakis D, Dogruman Al F. The effect of two artificial salivas on the adhesion of *Candida albicans* to heat-polymerized acrylic resin. *J Adv Prosthodont*. 2015; 7(2): 93-7.

Sharma SK, Singh N, Thimmaraju KV, Tilak M. A Comparative Study on Salivary Glucose Level in Diabetic Patients and Healthy Individuals. *National Journal of Laboratory Medicine*. 2018; 7(3): 1-4.

Silva MP, Chibebe Junior J, Jorjão AL, Machado AK, Oliveira LD, Junqueira JC, *et al*. Influence of artificial saliva in biofilm formation of *Candida albicans* in vitro. *Braz Oral Res*. 2012; 26(1): 24-8.

Swierkot K, Lottholz P, Flores-de-Jacoby L, Mengel R. Mucositis, peri-implantitis, implant success, and survival of implants in patients with treated generalized aggressive periodontitis: 3- to 16-year results of a prospective long-term cohort study. *J Periodontol*. 2012; 83(10): 1213-25.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Characteristics of dual species *Candida* biofilms on denture acrylic surfaces. *Arch Oral Biol*. 2007; 52(12): 1200-8.

Uppu K, Sahana S, Madu GP, Vasa AA, Nalluri S, Raghavendra KJ. Estimation of Salivary Glucose, Calcium, Phosphorus, Alkaline Phosphatase, and Immunoglobulin A among Diabetic and Nondiabetic Children: A Case-Control Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018; 11(2): 71-78.

Zeng Q, Zheng L, Zhou J, Xiao H, Zheng J, Zhou Z. Effect of alcohol stimulation on salivary pellicle formation on human tooth enamel surface and its lubricating performance. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2017; 75: 567-573.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

ANEXO

ANEXO 1- Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba- UFPB (CEP/CCS-UFPB)

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito do padrão salivar em biofilmes de *Candida* nas superfícies abióticas

Pesquisador: Isis morais bezerra

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 97144618.3.0000.5188

Instituição Proponente: Universidade Federal da Paraíba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.923.473

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa egresso do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA, do CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, da UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, da aluna ISIS MORAIS BEZERRA, sob orientação da Profª. Dra. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a interferência de diferentes padrões salivares no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* em superfícies de titânio e resina acrílica.

Objetivos Secundários:

- Avaliar como o padrão salivar de pacientes normosistêmicos (120 mg/dL) e diabéticos (> 120 mg/dL), influenciam no desenvolvimento de biofilmes de *C. albicans* em superfícies de titânio e resina acrílica.
- Verificar se fatores do hospedeiro influenciam na instalação e evolução das doenças biofilme-dependentes;
- Avaliar a patogenicidade do biofilme de *C. albicans* por meio dos tipos salivares selecionados;

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Continuação do Parecer: 2.923.473

- Verificar se há diferenças na adesão e metabolismo celular do fungo em relação a rugosidade de superfície dos espécimes;
- Avaliar capacidade de formação do biofilme nos dois espécimes selecionados;
- Avaliar a viabilidade da *C. albicans*; - Realizar a dosagem de proteínas totais nos biofilmes submetidos aos variados padrões salivares;
- Avaliar mudanças no padrão de produção de fosfatase por *C. albicans* nos biofilmes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

De acordo com a metodologia proposta, observa-se que os riscos aos quais os participantes estão expostos são os mínimos, pois a coleta salivar será realizada no local do atendimento odontológico, em condições padrão de biossegurança e pelos pesquisadores envolvidos na pesquisa.

Benefícios:

Os benefícios advindos dos resultados da pesquisa auxiliaram no tratamento de doenças orais como a candidíase ou peri-implantite. Apesar de ser um estudo com Interface laboratorial, o mesmo se propõe a determinar condições clínicas que possam interferir no tratamento destas patologias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto apresenta coerência científica, mostrando relevância para a academia, haja vista a ampliação do conhecimento, onde se busca, principalmente, avaliar a interferência de diferentes padrões salivares no desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* em superfícies de titânio e resina acrílica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de Apresentação Obrigatória, foram anexados tempestivamente.

Recomendações:

RECOMENDAMOS QUE AO TÉRMINO DA PESQUISA A PESQUISADORA RESPONSÁVEL ENCAMINHE AO COMITÊ DE ÉTICA PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, RELATÓRIO FINAL E DOCUMENTO DEVOLUTIVO

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOÃO PESSOA
Telefone: (83)3218-7791 Fax: (83)3218-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

Continuação do Parecer: 2.923.473

FORAM DIVULGADOS JUNTO A INSTITUIÇÃO ONDE OS MESMOS FORAM COLETADOS, AMBOS EM PDF, VIA PLATAFORMA BRASIL, ATRAVÉS DE NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista o cumprimento das formalidades éticas e legais, somos de parecer favorável a execução do presente projeto, da forma como se apresenta, salvo melhor juízo.

Considerações Finais a critério do CEP:

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES BASICAS_DO_P RQJETO_1211083.pdf	30/08/2018 11:28:21		Aceito
Folha de Rosto	FR_isis.pdf	30/08/2018 11:25:44	isis morais bezerra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ppgocertidao.pdf	30/08/2018 10:21:23	isis morais bezerra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaococa.pdf	30/08/2018 10:18:12	isis morais bezerra	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaonumetrop.pdf	30/08/2018 10:17:33	isis morais bezerra	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodecompromisso.pdf	30/08/2018 10:16:29	isis morais bezerra	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	materialbiologico.pdf	30/08/2018 10:15:48	isis morais bezerra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto.pdf	30/08/2018 10:15:24	isis morais bezerra	Aceito

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 2.923.473

Investigador	Projeto.pdf	30/08/2018 10:15:24	Isis morals bezerra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	30/08/2018 10:15:02	Isis morals bezerra	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	30/08/2018 10:13:55	Isis morals bezerra	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	30/08/2018 10:13:35	Isis morals bezerra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 27 de Setembro de 2018

Assinado por:

Eliane Marques Duarte de Sousa
(Coordenador(a))

Endereço: UNIVERSITARIO S/N
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900
UF: PB Município: JOAO PESSOA
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

APÊNDICE

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Esta pesquisa intitula-se “Efeito do padrão salivar em biofilmes de *Candida* nas superfícies abióticas”, e está sendo desenvolvida pesquisadora responsável Isis Morais Bezerra, aluna do Programa de Pós Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, com a colaboração de Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida e Arella Cristina Muniz Brito, professora e aluna, respectivamente, do Programa de Pós Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba. O objetivo da presente pesquisa é avaliar a interferência de diferentes padrões salivares no desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*, *in vitro*, em superfícies de titânio e resina acrílica e tem por finalidade verificar como os fatores do hospedeiro implicam no desenvolvimento deste fungo.

A sua participação na pesquisa é voluntária e, portanto, o (a) senhor (a) não é obrigado (a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo pesquisador (a). Caso decida não participar da pesquisa, ou resolver a qualquer momento desistir de participar, não sofrerá nenhum dano ou prejuízo.

Para o desenvolvimento desta pesquisa será executado o procedimento de coleta salivar:

- O material biológico doado (saliva) será coletado pela pesquisadora responsável Isis Morais Bezerra, aluna do Programa de Pós Graduação/ UFPB (mestrado);
- Considerando que o procedimento de coleta salivar será realizado diante do paciente apresentar as características necessárias para a pesquisa (pacientes normosistêmicos (≤ 120 mg/dL) e diabéticos diabéticos (> 120 mg/dL)), relata-se que os possíveis riscos decorrentes do procedimento serão minimizados.

Fui informado que:

1) O objetivo da presente pesquisa é avaliar a interferência de diferentes padrões salivares no desenvolvimento do biofilme de *Candida albicans*, *in vitro*, em superfícies de titânio e resina acrílica e tem por finalidade verificar como os fatores do hospedeiro implicam no desenvolvimento deste fungo.

2) O procedimento de coleta da saliva será realizado pela equipe de pesquisadores. A coleta será realizada por meio do “ato de cuspir” em recipientes trazidos pela própria equipe. Uma espécie de filme, cortado em pequenos pedaços será entregue e o mesmo mascado por 2 minutos, como se fosse um chiclete. Após, a saliva será coletada por 2 minutos a mais.

3) Fica registrado, que fui informado de que essas informações, dados e material serão usadas pelo (a) responsável pela pesquisa com propósitos científicos.

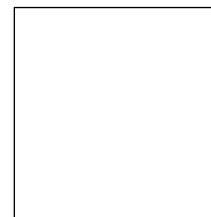
- 4) A participação nesta pesquisa será voluntária não sendo oferecido nenhum tipo de pagamento ou troca de serviço perante autorização.
 - 5) Há total liberdade em não participar da pesquisa, sem nenhum prejuízo ao atendimento que estou recebendo no Centro Odontológico de Cruz das Armas, localizado no bairro de Cruz das Armas (Av. Cruz das Armas, s/n, João Pessoa, PB, CEP: 58087100).
 - 6) Estou ciente que esta pesquisa não irá interferir no tratamento que foi planejado.
 - 7) Potenciais riscos de engasgo ou deglutição serão prevenidos pela equipe de pesquisadores, com a explicação prévia do procedimento. Mesmo assim, a equipe está apta a intervir se qualquer intercorrência acontecer durante a coleta da saliva, sendo os risco minimizados.
 - 8) Minha identidade será mantida em sigilo e que tenho total liberdade para solicitar maiores esclarecimentos antes e durante o desenvolvimento da pesquisa e consultar o Comitê de Ética em Pesquisa para qualquer informação sobre o projeto.
 - 9) Estou ciente que não terei benefício direto com este estudo, mas estou disposto a autorizar minha participação para que os resultados encontrados possam ajudar outras pessoas.
- Desta forma, confirmo que recebi de maneira clara, todas as informações necessárias ao meu consentimento.

Por este instrumento particular, declaro para os devidos fins éticos e legais, que eu,, anos, RG nº, residente à, nº....., na cidade de, Estado de fui informado e concordo voluntariamente com a participação na pesquisa “Efeito do padrão salivar em biofilmes de *Candida* nas superfícies abióticas”. E declaro que tomei ciência e que fui esclarecido(a) de maneira a não restarem quaisquer dúvidas sobre minha participação no estudo, de acordo com os termos acima relacionados.

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
Centro de Ciências da Saúde - 1º andar
Campus I - Cidade Universitária - CEP: 58.051-900 - João Pessoa-PB
Telefones para contato:
Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa: (83) 3216 7791
e-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

Pesquisador responsável: Isis Morais Bezerra
Programa de Pós Graduação em Odontologia
Centro de Ciências da Saúde
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil
CEP: 58051-900

Tel: (83) 999718054
Email: isismoraisbezerra@hotmail.com



Assinatura do participante

Polegar
Direito

Assinatura Pesquisador Responsável (Isis Morais Bezerra)

APÊNDICE B- Fotografias das placas de Petri, da atividade de fosfolipase por *C. albicans* (ATCC 90028)

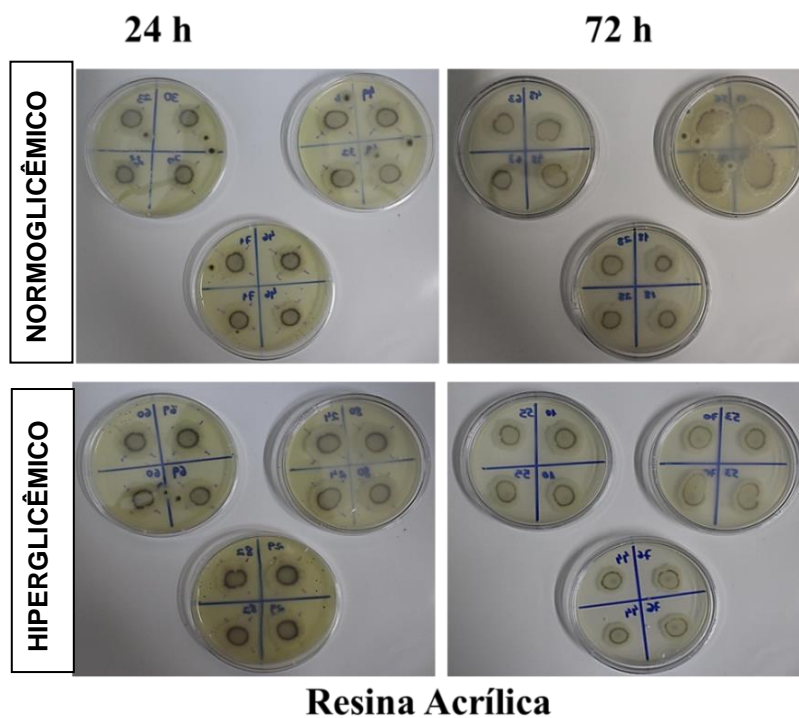


Figura 6- Fotografias de Placas de Petri com crescimento dos biofilmes *C. albicans* (ATCC 90028), em meio de cultura a base de gema de ovo, de acordo com a condição glicêmica, cultivados por 24 e 72h (n=12/grupo) e desenvolvidos sobre superfícies de Resina acrílica para verificação da atividade de fosfolipase.

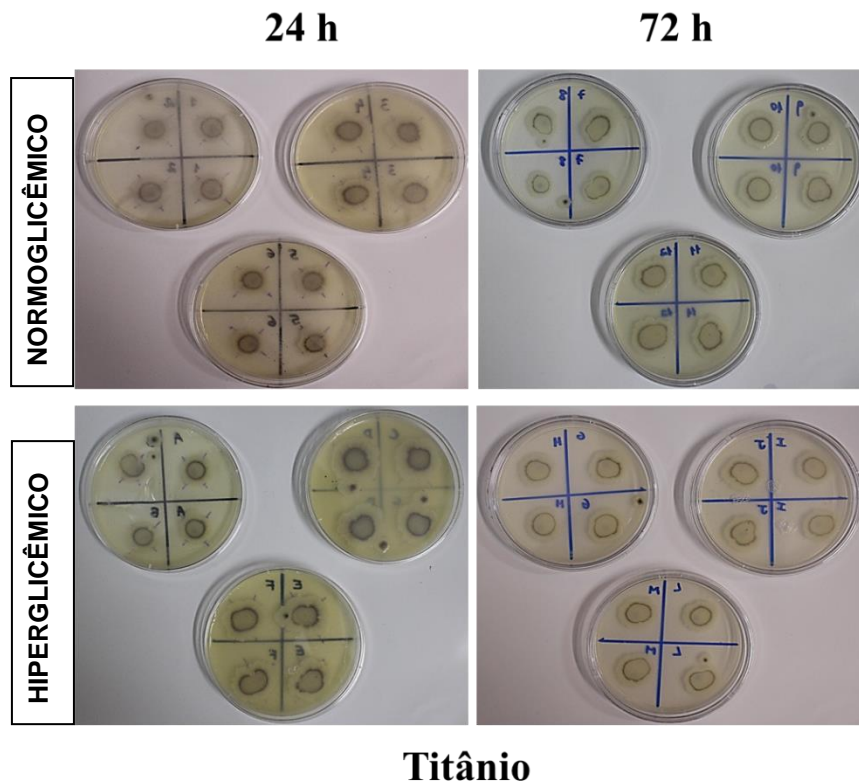


Figura 7- Fotografias de Placas de Petri com crescimento dos biofilmes *C. albicans* (ATCC 90028), em meio de cultura a base de gema de ovo, de acordo com a condição glicêmica, cultivados por 24 e 72h (n=12/grupo) e desenvolvidos sobre superfícies de Titânio para verificação da atividade de fosfolipase.