

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

**PATOGENICIDADE DE BIOFILMES MISTOS DE
Candida albicans E *Streptococcus oralis* EM
MODELO MURINO SUBMETIDO AO DIABETES
ALOXÂNICO E À TERAPIA COM FLUCONAZOL**

Arella Cristina Muniz Brito

2023

ARELLA CRISTINA MUNIZ BRITO

**PATOGENICIDADE DE BIOFILMES MISTOS DE *Candida albicans* E
Streptococcus oralis EM MODELO MURINO SUBMETIDO AO DIABETES
ALOXÂNICO E À TERAPIA COM FLUCONAZOL**

**PATHOGENICITY OF MIXED BIOFILMS OF *Candida albicans* AND
Streptococcus oralis IN A MURINE MODEL SUBJECTED TO ALLOXANIC
DIABETES AND FLUCONAZOLE THERAPY**

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

Orientador: Prof. Dr. Yuri Wanderley
Cavalcanti

João Pessoa
2023



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE TESE DO DOUTORADO

NÚMERO DA DEFESA: 014

2023

Aos vinte e nove dias do mês de novembro do ano de 2023, às 14:00 horas, no auditório do CCS, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelas professores doutores: YURI WANDERLEY CAVALCANTI (Orientador(a) e Presidente), LEOPOLDINA DE F DANTAS DE ALMEIDA (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB), ADRIANO FRANCISCO ALVES (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB), DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e PEDRO PAULO CHAVES DE SOUZA (membro externo ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB), a fim de argüírem o (a) doutorando (a) ARELLA CRISTINA MUNIZ BRITO, com relação ao seu trabalho final de curso de doutorado (Tese), sob o título “Efeito do diabetes aloxânico e da terapia com fluconazol na patogenicidade de biofilmes mistos de Candida albicans e Streptococcus oralis em modelo murino”. Aberta a sessão pelo presidente da mesma, coube a(o) candidata(o), na forma regimental, expor o tema de sua Tese, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionado pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 2º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 3º Examinador (membro vinculado ao PPGO): Conceito “Aprovado”; 4º Examinador (membro vinculado ao PPGO): Conceito “Aprovado” e 5º Examinador (Orientador(a) e presidente): Conceito “Aprovado”. O que resultou em conceito final igual: “APROVADO”, o que permite a(o) candidata(o) fazer jus ao título de Doutor em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da(o) candidata(o) durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo presidente, pelos demais membros da banca e pela(o) candidata(o).

1º Examinador – Membro Externo

2º Examinador – Membro Externo

3º Examinador – Membro Interno

4º Examinador – Membro Interno

5º Examinador – Presidente

Candidata(o)

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B862p Brito, Arella Cristina Muniz.

Patogenicidade de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus oralis* em modelo murino submetido ao diabetes aloxânico e à terapia com fluconazol / Arella Cristina Muniz Brito. - João Pessoa, 2023.

91 f. : il.

Orientação: Yuri Wanderley Cavalcanti. Tese
(Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Diabetes mellitus. 2. Aloxano. 3. Fluconazol. 4. Candidíase. I. Cavalcanti, Yuri Wanderley. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616.379-008.64(043)

Elaborado por CHRISTIANE CASTRO LIMA DA SILVA - CRB-15/865

Informações Complementares:

Título em outro idioma: PATHOGENICITY OF MIXED BIOFILMS OF *Candida albicans* AND *Streptococcus oralis* IN A MURINE MODEL SUBJECTED TO **ALLOXANIC DIABETES AND FLUCONAZOLE THERAPY**

Palavras-chave em outro idioma: Diabetes mellitus. Alloxan. Fluconazole.

Candidiasis, Oral. Candidiasis.

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos Tecidos Buco-Maxilo-Faciais

Banca examinadora: Yuri Wanderley Cavalcanti (Orientador, UFPB); Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida (UFPB); Adriano Francisco Alves (UFPB); Danyel Elias da Cruz Perez (UFPE); Pedro Paulo Chaves de Souza (UFG).

Data de defesa: 29-11-2023

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

- ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5482-9592>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/9463588142125402>

ARELLA CRISTINA MUNIZ BRITO

**PATOGENICIDADE DE BIOFILMES MISTOS DE *Candida albicans* E
Streptococcus oralis EM MODELO MURINO SUBMETIDO AO DIABETES
ALOXÂNICO E À TERAPIA COM FLUCONAZOL**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Tese apresentada em sessão pública no dia 29 de novembro de 2023.

Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti
Orientador - UFPB

Profa. Dra. Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida
Examinador - UFPB

Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
Examinador - UFPB

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez
Examinador - UFPE

Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza
Examinador - UFG

DEDICATÓRIA

À minha avó Nadir *in memoriam* e aos
meus pais, André e Ana, por serem
minhas grandes inspirações e os
meus maiores incentivadores Dedico-
lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as bênçãos e por ser minha fonte de força, determinação e perseverança.

À minha família por ser meu porto seguro, pelo amor incondicional e apoio. Aos meus queridos pais, Ana Muniz e André Fiquene, por nunca terem medido esforços, por sempre terem acreditado na minha educação. Muito obrigada por todo incentivo e dedicação para conclusão de mais essa etapa. Ao meu irmão André Brito, às minhas avós, Nadir Muniz *in memoriam* e Marília Fiquene. Aos meus demais familiares, pelo apoio constante, incentivo e torcida.

Ao meu orientador Yuri Wanderley Cavalcanti pela disponibilidade, paciência e por compartilhar tantos conhecimentos comigo ao longo da pós-graduação. Agradeço pela confiança e apoio na idealização e execução desta tese.

À professora Leopoldina Almeida pelos ensinamentos, confiança e por disponibilizar meios para alcançar os resultados deste trabalho e a toda equipe do Núcleo de Medicina Tropical (Numetrop).

Ao professor Adriano Francisco Alves e toda equipe do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX) por viabilizar a realização desta pesquisa, assim como por todo auxílio na coleta e interpretação dos dados.

Meus sinceros agradecimentos à Jannerson Pontes, Maria Heloísa Borges, Naldo Gomes, Rayne Rocha e Beatriz Rodrigues por toda ajuda e apoio na execução das etapas deste trabalho.

Aos professores: Wallace Blohem Pessoa, Livia Araújo Alves, Danyel Perez e Pedro Souza pelas contribuições na qualificação deste trabalho.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação.

A todos os funcionários dos laboratórios da UFPB que me auxiliaram na realização do presente trabalho.

Aos amigos que fiz na pós-graduação Isis Morais, Hugo Dantas e José Viana e a todos os amigos pessoais que e me ajudaram a enfrentar os desafios dessa jornada além da convivência e apoio mútuo.

A todos os demais que contribuíram de maneira direta e indireta na minha formação.

À Pró-reitoria de pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB pelo apoio financeiro, processo nº 23047.025768/2021-15 e à CAPES, ao PPGO-UFPB e à Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional recebido.

EPÍGRAFE

“Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
Apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
Se tornar um autor da própria história”

Fernando Pessoa

RESUMO

Diabetes mellitus e candidíase oral apresentam alta prevalência. Portadores de diabetes mellitus, podem apresentar maiores taxas de colonização e invasão fúngica devido a suas condições sistêmicas. Entretanto, o quanto essa inter-relação pode ser prejudicial, permanece como um tópico de relevância científica. Avaliou-se o efeito do diabetes mellitus induzido pela aloxana e do tratamento com fluconazol na virulência e patogenicidade da coinfeção de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus oralis* em modelo animal. Ratos Wistar machos (n=24) foram distribuídos em: grupo não-diabético e sem tratamento (CTR, n=6), grupo não-diabético e tratado com fluconazol (FLU, n=6), grupo diabéticos e sem tratamento (DCTR, n=6), grupo diabéticos e tratados com fluconazol (DFLU, n=6). Os grupos diabéticos receberam dosagens de 120 a 240 mg/kg de aloxana antes do período de coinfeção. A hiperglicemia foi confirmada partir de 250 mg/dL em jejum. O protocolo de coinfeção seguiu com administração de prednisolona 100 mg/Kg e suspensões de *C. albicans* ATCC 90028 e *S. oralis* ATCC 35037 inoculadas via *swab* na cavidade oral e administradas *ad libitum* na água. Animais tratados com fluconazol receberam a dose de 10 mg/kg a cada 12 horas. Os grupos não-tratados receberam administração de solução salina 0,9%. Ao final do período experimental, todos os animais foram eutanasiados e os tecidos coletados foram observados macroscopicamente quanto à presença ou ausência de lesões na língua e microscopicamente por métodos histoquímicos de Hematoxilina-eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) para avaliar alterações no palato, língua e pâncreas. Também foi realizada a extração e quantificação do DNA de *C. albicans* da língua, assim como a expressão gênica para SAP6 e HWP1 por meio da *Real-time RT-qPCR*. Os dados foram analisados por ANOVA *one-way* e teste de *Tukey* ($\alpha= 5\%$). Foram observadas lesões nas línguas dos animais do grupo DCTR. Os grupos apresentaram áreas eritematosas na superfície lingual. Nos cortes histológicos, o grupo DCTR apresentou mais alterações em relação aos demais grupos, com destaque da invasão epitelial por hifas e hiperqueratose na língua além de redução epitelial e presença de úlcera com vasos dilatados no palato. Todos os animais diabéticos apresentaram destruição das células β nas Ilhotas de Langerhans. A quantificação relativa de DNA de *C. albicans* nas línguas dos animais indicaram que houve diferença entre o grupo DCTR ($3,45\pm0,93$) e os

demais ($p < 0,05$). No restante dos grupos não houve diferenças ($p > 0,05$). A expressão gênica de SAP6 variou entre $1,00 \pm 0,29$ no grupo não diabético tratado com fluconazol a $1,16 \pm 0,38$ para o grupo diabético não tratado com fluconazol, o que indicou que não houve diferença significativa nos grupos avaliados ($p > 0,05$). Em relação à expressão gênica de HWP1, observou-se que houve diferença entre os grupos dos animais saudáveis e os animais diabéticos ($p < 0,05$). A partir dos resultados encontrados, os grupos diabéticos não tratados com fluconazol apresentaram maior número de alterações macroscópicas e histológicas, assim como maior quantificação de *C. albicans* e expressão gênica para HWP1. O tratamento com fluconazol foi efetivo para reduzir a invasão fúngica. A presente pesquisa contribui para novos estudos que possam considerar o diabetes aloxânico e o tratamento com fluconazol para avaliar os efeitos da candidíase oral em modelos murinos.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Aloxano; Fluconazol; Candidíase; Streptococcus oralis.

ABSTRACT

Diabetes mellitus and oral candidiasis are diseases that have a high prevalence. Diabetic individuals may have higher rates of fungal colonization and invasion due to their systemic conditions. However, the extent to which this interrelationship can be harmful to the host remains a topic of scientific relevance. The effect of diabetes mellitus induced by alloxan and treatment with fluconazole on the virulence and pathogenicity of co-infection of mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus oralis* in an animal model was evaluated. Male Wistar rats (n=24) were distributed into: non-diabetic and untreated group (CTR, n=6), non-diabetic and fluconazole-treated group (FLU, n=6), diabetic and untreated group (DCTR, n=6), diabetic group treated with fluconazole (DFLU, n=6). The diabetic groups received doses of 120 to 240 mg/kg of alloxan before the coinfection period. Hyperglycemia was confirmed from 250 mg/dL fasting glucose. The coinfection protocol followed with doses of prednisolone 100 mg/kg and suspensions of *C. albicans* ATCC 90028 and *S. oralis* ATCC 35037 inoculated via swab into the oral cavity and administered *ad libitum* in water. Animals treated with fluconazole received a dose of 10 mg/kg every 12 hours. The control groups received administration of 0.9% saline solution. At the end of the experimental period, all animals were euthanized and observed macroscopically for the presence or absence of lesions on the tongue and microscopically using histochemical methods of Hematoxylin-eosin (HE) and Periodic Acid-Schiff (PAS) to evaluate changes in the palate, tongue and pancreas. The extraction and quantification of *C. albicans* DNA from the tongue was also carried out, as well as gene expression for SAP6 and HWP1 using Real-time RT-qPCR. Data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey test ($\alpha = 5\%$). Lesions were observed on the tongues of animals in the DCTR group. The groups presented erythematous areas on the surface. In histological sections, the DCTR group showed more changes in relation to the other groups, with emphasis on epithelial invasion by hyphae and hyperkeratosis on the tongue, as well as epithelial reduction and the presence of an ulcer with dilated vessels on the palate. All diabetic animals showed destruction of β cells in the Islets of Langerhans. The relative quantification of *C. albicans* DNA in the animals' tongues indicated that there was a difference between the DCTR group (3.45 ± 0.93) and the others ($p < 0.05$). In the rest of the groups there were no differences ($p > 0.05$). SAP6 gene expression

ranged from 1.00 ± 0.29 in the non-diabetic group treated with fluconazole to 1.16 ± 0.38 for the diabetic group not treated with fluconazole, which indicated that there was no significant difference in the groups evaluated ($p > 0.05$). Regarding HWP1 gene expression, it was observed that there was a difference between the groups of healthy animals and diabetic animals ($p < 0.05$). From the results found, the diabetic groups not treated with fluconazole showed a greater number of macroscopic and histological changes, as well as greater quantification of *C. albicans* and gene expression for HWP1. Treatment with fluconazole was effective in reducing fungal invasion. The present research contributes to new studies that may consider alloxan diabetes and fluconazole treatment to evaluate the effects of oral candidiasis in murine models.

Keywords: Diabetes mellitus. Alloxan. Fluconazole. Candidiasis, Oral. Candidiasis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL	Microlitro
5-FC	5-flucitosina
ACT 1	Gene de <i>housekeeping</i> da actina
ALS1	Sequência semelhante à aglutinina 1
ALS3	Sequência semelhante à aglutinina 3
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
Ct	Comparação do limiar de fluorescência
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFG1	Fator de elongação 1
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GLU-2	Transportador de glicose 2
HE	Hematoxilina-Eosina
HWP1	Proteína de parede hifal 1
ICR	<i>Institute of Cancer Research</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IP	Via Intraperitoneal
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba
Kg	Kilograma
LABIPEX	Laboratório de Imunopatologia Experimental
M	Molar
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	Centro Nacional de informações sobre biotecnologia
Numetrop	Núcleo de Medicina Tropical
OSF	<i>Open Science Framework</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial Hidrogeniônico

qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real
SAP6	Aspartil Proteinase Secretada 6
spp.	Espécies
TriZol	Tiocianato de guanidina e fenol
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UPA	Unidade de Produção de Animais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 DIABETES MELLITUS.....	3
2.2 CANDIDÍASE ORAL E SUA INTER-RELAÇÃO COM O DIABETES MELLITUS.....	4
2.3 <i>Candida albicans</i> : FATORES DE VIRULÊNCIA, PATOGENICIDADE E ASSOCIAÇÕES EM BIOFILMES MISTOS	5
2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE BIOFILME <i>in vivo</i>	7
2.5 DIABETES ALOXÂNICO.....	9
2.6 TRATAMENTO COM FLUCONAZOL	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 GERAL	14
3.2 ESPECÍFICOS.....	14
4. ARTIGO 1 - Interação patógeno-hospedeiro em modelo de candidíase oral desenvolvido em murinos: um estudo bibliométrico.....	15
5. ARTIGO 2 - Patogenicidade de biofilmes mistos de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus oralis</i> em modelo murino submetido ao diabetes aloxânico e à terapia com fluconazol.....	34
6. CONSIDERAÇÃO GERAIS.....	65
7. CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO.....	76

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma das doenças crônicas não transmissíveis mais prevalentes nos dias atuais, pois afeta cerca de 537 milhões de adultos entre 20-79 anos (International Diabetes Federation, 2021). Esta condição resulta principalmente na hiperglicemia, ou seja, altos níveis de glicose sanguínea (Arneth et al., 2019). Como resultado desses níveis elevados, os indivíduos portadores de diabetes podem desenvolver um estado inflamatório, fadiga e complicações como retinopatia, doenças cardiovasculares, nefropatias e comorbidades bucais (International Diabetes Federation, 2021).

Dentre as principais doenças na cavidade bucal, destaca-se a relação bidirecional do diabetes mellitus com a doença periodontal (Hererera et al., 2023) e também a interação da hiperglicemia com candidíase oral (Al-Janabi et al., 2023). Do ponto de vista clínico, os pacientes que apresentam altos níveis glicêmicos podem apresentar redução na atividade de neutrófilos, modificações salivares e um aumento de *Candida* spp. (Mussi et al., 2022). Além disso, os portadores de diabetes mellitus têm maior chance de apresentar estomatite protética ao serem comparados com pacientes saudáveis (Martorano-fernandes et al., 2020).

A principal espécie associada nesses casos é *Candida albicans* (Mohammadi et al., 2016; Zomorodian et al., 2016; Sampath et al., 2019), que em biofilmes disbióticos, torna-se um dos principais patógenos capazes de causar infecções com risco de vida associado (Lopes, Lionakis, 2022). Além disso, estudos têm demonstrado que a presença de glicose nestes biofilmes, pode modular fatores de virulência ao influenciar, por exemplo, o total de biomassa, a viabilidade celular e unidades formadoras de colônia (Hosida et al., 2018; Bezerra et al., 2019; Brito et al., 2021).

Os efeitos do diabetes mellitus e da candidíase oral também têm sido avaliados *in vivo*, pois estas duas condições podem ser induzidas experimentalmente em murinos. Uma das alternativas para indução do diabetes mellitus tipo 1, é a administração da aloxana, responsável pela destruição das células β pancreáticas (Ighodaro et al., 2017) em que pode ser avaliada a interação com candidíase oral por meio da imunossupressão (Sano et al., 2014; Venturini et al., 2016).

Vale destacar que *C. albicans* geralmente associa-se a outras espécies de *Candida* e a bactérias constituintes da microbiota oral, especialmente estreptococos orais (Bertolini; Dongari-Bagtzoglou, 2019; Morse et al., 2019). Dentre estas interações, a relação entre biofilmes mistos *C. albicans* e *Streptococcus oralis*, têm apresentado maior virulência e patogenicidade (Martorano-fernades et al., 2023) assim como uma maior susceptibilidade para colonização comensal e capacidade de provocar maior invasão tecidual durante infecções oportunistas pelo fungo nas superfícies mucosas (Xu et al., 2014, Xu et al., 2016, Xu et al., 2017).

Nesse contexto, ao considerar que a mucosa oral é um dos locais mais comuns de infecção e a porta inicial de disseminação sistêmica, também é preciso incluir o uso de ferramentas farmacológicas com a melhor eficácia para o tratamento da candidíase oral (Fang et al., 2021). Dessa maneira, em relação ao tratamento da candidíase, existem diversos antifúngicos disponíveis, entretanto foi observado que a terapia com fluconazol é eficaz e reduz a taxa de cura micológica (Fang et al., 2021).

Todavia, apesar de haver estudos que considerem o fator diabetes em modelos de candidíase em murinos (Sano et al., 2014; Venturini et al., 2016) até então não foram encontrados estudos *in vivo* que consideraram o diabetes em modelos de coinfeção entre *C. albicans* e *S. oralis* e o seu tratamento com o fluconazol ao mesmo tempo. Essa interação pode exercer um papel crucial na compreensão da virulência de biofilmes mistos. Diante desta lacuna de conhecimento apresentada, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do diabetes induzido pela aloxana e do tratamento com fluconazol na virulência e patogenicidade da coinfeção com *C. albicans* e *S. oralis* em modelo animal murino.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma das doenças sistêmicas não comunicáveis mais prevalentes que não há cura (Sun et al., 2022). Caracterizada pela hiperglicemia, pelos altos níveis de glicose sanguíneos que podem estar relacionados à deficiência na secreção de insulina pela destruição das células β pancreáticas, denominado diabetes mellitus tipo 1, ou então, pelo o resultado inicial da incapacidade das células do corpo de responder totalmente à insulina, uma condição denominada resistência à insulina, o que caracteriza o tipo 2 (International Diabetes Federation, 2021).

Aproximadamente cerca de 627 milhões de pessoas apresentam tal condição. Ao considerar adultos na faixa de 20 a 79 anos, há em torno de 527 milhões de pacientes hiperglicêmicos. Além disso, há uma projeção de aumento para os próximos anos com estimativas em torno de 643 milhões de indivíduos portadores de diabetes mellitus para 2030 e 783 milhões para 2045 (International Diabetes Federation, 2021; Sun et al., 2022).

Dentre os principais sintomas do diabetes mellitus, de maneira geral, podemos ser citados sintomas clássicos como, polifagia, a fome em excesso, a polidipsia, caracterizada por muita sede e a poliúria, com aumento da frequência de urina. Também podemos enfatizar o emagrecimento e a visão turva como sintomas importantes (International Diabetes Federation, 2021; Al-Janabi et al., 2023).

Ao considerar que portadores de diabetes enfrentam diversas comorbidades, podemos destacar complicações como nefropatia, doenças cardiovasculares e periodontite (International Diabetes Federation, 2021). Além disso, os elevados níveis sistêmicos de glicose também têm impacto na cavidade bucal, manifestando-se por meio de alterações salivares que resultam em hipossalivação e podem influenciar nas taxas glicêmicas de diabéticos descompensados (Lima-Aragão et al., 2016; Uppu et al., 2018). Como resultado, temos observado uma associação entre o diabetes e complicações na cavidade bucal, incluindo também sua relação com a candidíase oral (Mussi et al., 2022).

Especificamente em relação à candidíase oral, a literatura tem demonstrado que há uma inter-relação entre pacientes diabéticos e os que apresentam candidíase oral. Este fato pode estar relacionado a fatores de risco em comum e os casos de candidíase oral poderem ser potencializados na presença de altos níveis de glicose (Mussi et al., 2022; Al-Janabi et al., 2023).

2.2 CANDIDÍASE ORAL E SUA INTER-RELAÇÃO COM O DIABETES MELLITUS

A candidíase oral geralmente está associada à *Candida* spp. em que a *Candida albicans* é a espécie mais prevalente capaz de provocar estas infecções (Mohammadi et al., 2016; Zomorodian et al., 2016; Sampath et al., 2019). Apresentam diferentes manifestações clínicas, em que podemos destacar desconforto, ardência e a presença de lesões em diferentes regiões da cavidade bucal (Hellstein; Marek, 2019). Estas lesões podem aparecer na língua como placas brancas e erupções na mucosa disseminadas, lesões na mucosa jugal, e frequentemente encontramos a presença de lesões no palato e em algumas situações associadas ao uso de prótese total (Hellstein; Marek, 2019).

Nesse contexto, a prótese se comporta como nicho para adesão de biofilme, aumentando a colonização microbiana (Patel et al., 2017). Dessa forma, tem sido observada elevada prevalência de candidíase associada ao uso de próteses dentárias removíveis, denominada de estomatite protética (Vila et al., 2020; Gad; Fouda, 2020). Nesses casos, a infecção é caracterizada pela colonização das superfícies epiteliais e inflamação dos tecidos subjacentes (Rast et al., 2016).

A depender da extensão dessas lesões, as mesmas também podem ser encontradas na orofaringe, o que é conhecido como candidíase orofaríngea (Knoke;Bernhard, 2006; Hellstein ; Marek, 2019). Geralmente indivíduos com imunidade comprometida e com desordens metabólicas são mais susceptíveis a disseminação sistêmica da candidíase, pois nestes casos há elevada morbidade e risco de mortalidade quando *Candida* spp. entram em contato com a corrente sanguínea, ocasionando a candidíase sistêmica, considerada potencialmente fatal em alguns casos (Bassetti et al., 2019; Vila et al., 2020).

Estudos prévios têm demonstrado a relação entre candidíase oral e diabetes mellitus, ao considerar que os altos níveis de glicose podem impactar na

proliferação de espécies de *Candida*. Esta associação pode ser encontrada desde estudos laboratoriais até mesmo estudos clínicos e revisões sistemáticas com meta-análise (Venturini et al., 2016, Mussi et al., 2022; Al-Janabi et al., 2023, Martorano-Fernandes et al., 2020).

Em alguns destes estudos *in vitro* já foi observada que a presença de glicose em biofilmes de espécies de *Candida* consegue influenciar na biomassa total e na contagem de unidades formadoras de colônia (Hosida et al., 2018, Bezerra et al., 2019) além de também influenciar na formação de polissacarídeos extracelulares na presença *Streptococcus mutans* (Brito et al., 2021).

A relação do diabetes em modelos animais também tem sido observada com a candidíase oral, ao avaliar a capacidade dos níveis de glicose influenciar na proliferação de *Candida albicans* e apresentarem efeitos sistêmicos (Venturini et al., 2016; Sano et al., 2014). Do ponto de vista clínico, os estudos tem demonstrado que o aumento da glicemia, provoca redução na atividade de neutrófilos, ocasionando modificações salivares, e um aumento do número de *Candida* spp. (Mussi et al., 2022). No nível de evidências das revisões sistemáticas prévias, observa-se que, apesar da certeza da evidência ter sido considerada baixa, pacientes diabéticos têm maior chance de desenvolver estomatite protética em comparação com pacientes não diabéticos (Martorano-Fernandes et al., 2020).

Dessa maneira, a inter-relação entre as referidas doenças pode ser considerada um tópico de relevância científica, em que os mecanismos envolvidos nessa relação podem ser essenciais para a compreensão da fisiopatologia da candidíase oral.

2.3 *Candida albicans*: FATORES DE VIRULÊNCIA, PATOGENICIDADE E ASSOCIAÇÕES EM BIOFILMES MISTOS

Um dos pontos chave para diagnóstico e tratamento da candidíase oral, é o conhecimento de seu principal fator etiológico, *Candida albicans*, que pode ser considerada um patobionte, o que significa que adquire características patogênicas em resposta a condições que alteram o equilíbrio do microambiente e comprometem a imunidade do hospedeiro (Pellon et al, 2020). Adicionalmente, sabe-se que esse microrganismo apresenta diversos mecanismos para

sobrevivência, como formação de biofilme entre outras espécies, capacidade de invasão epitelial e do tecido conjuntivo subjacente (Rast et al., 2016; Bertolini; Dongari-Bagtzoglou, 2019; Wall et al., 2019; Vila et al., 2020; Lopes, Lionakis, 2022).

Dessa maneira, a invasão dos tecidos do hospedeiro pela *C. albicans* pode estar relacionado a fatores de virulência, como formação de biofilmes, morfogênese, capacidade de aderir ao epitélio, produção de fosfolipases e enzimas proteolíticas além da indução de resposta inflamatória (Figura 1) (Staniszewska, 2020; Naglik et al., 2017; Gow; Yadav, 2017; Höfs; Mogavero; Hubs, 2016; Koo; Andes; Krysan 2018). Também está relacionada à expressão de diferentes genes, como por exemplo, genes associados à adesão e invasão (como HPW1, ALS1 e ALS3) associados à mudança de fenótipo (EFG1), secreção de proteases (SAP1 à SAP10), com destaque a SAP6, que é uma proteína multifuncional e atua como uma adesina e uma proteinase e a presença de fosfolipases (Kumar et al., 2015; Lopes, Lionakis, 2022).

Além disso, *C. albicans* geralmente associa-se a outras espécies de *Candida* e a bactérias constituintes da microbiota local, especialmente estreptococos orais (Marsh; Zaura, 2017; Koo; Andes; Krysan, 2018; Bernard et al., 2019; Morse et al., 2019). Em conjunto, estas espécies formam agregados e biofilmes simbióticos que em condições desfavoráveis podem exacerbar danos teciduais por meio do contato físico entre as células e moléculas do *quorum sensing* (Cavalcanti et al., 2015; Salvatori et al., 2020; Martorano-Fernandes et al., 2023).

Dessa maneira, a interação entre *C. albicans* e estreptococos orais na superfície epitelial também deve ser investigada com destaque para a relação entre biofilmes mistos *C. albicans* e *Streptococcus oralis*. A literatura tem demonstrado interesse científico nesta interação, pois alguns estudos têm apresentado que os metabólitos secretados pelo *S. oralis* aumentam a proliferação e virulência da *C. albicans* (Martorano-Fernades et al., 2023). Também tem sido observado aumento da patogenicidade por amplificação da resposta inflamatória da mucosa (Xu et al., 2014), assim como pela ativação da via de filamentação *EFg1* (Xu et al., 2016). Esta coinfeção também interage de maneira sinérgica degradando *E-caderinas* das junções epiteliais (Xu et al., 2017) (Figura 1).

Fatores de virulência *Candida albicans*

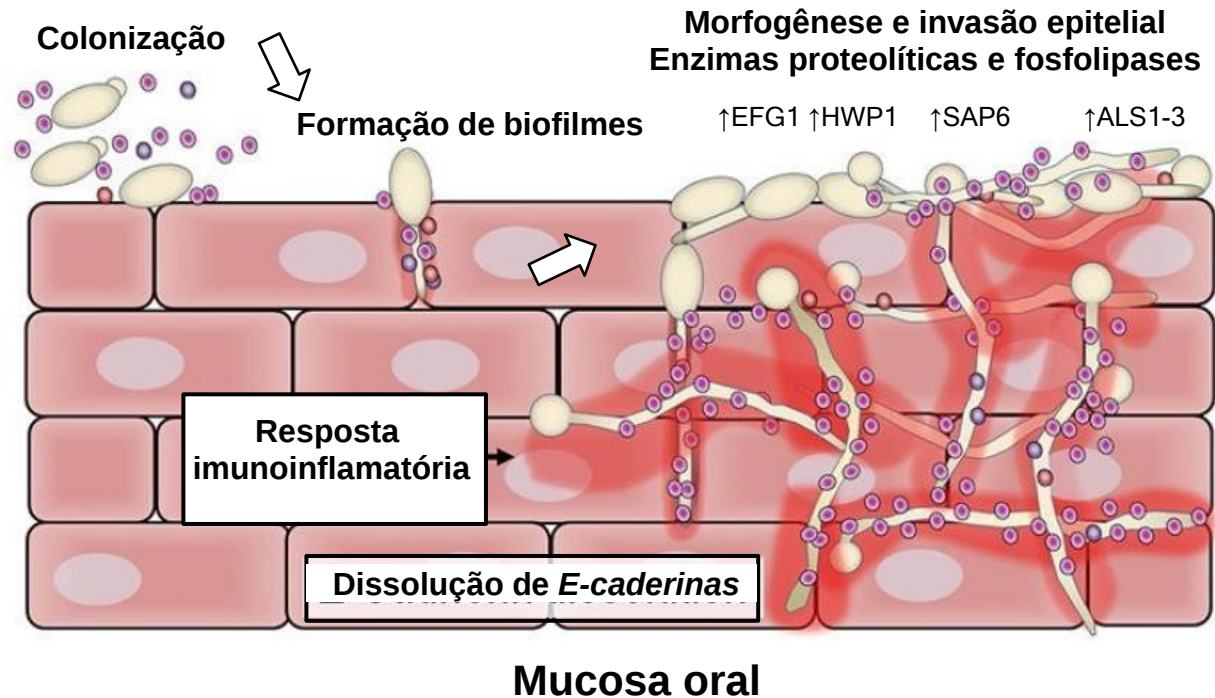


Figura 1. Fatores de virulência associados a *Candida albicans*. Adaptado de Koo; Andes; Krysan, 2018.

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE BIOFILME *in vivo*

De modo a elucidar os mecanismos de desenvolvimento da candidíase oral, diversos modelos de estudo foram desenvolvidos com o objetivo de simular as condições observadas *in vivo* (Yadev et al., 2011; Chevalier; Ranque; Prêcheur, 2017; Tabatabaei; Moharamzadeh; Tayebi, 2020). Dentre esses, destacam-se a utilização de monocamadas de células epiteliais. Porém, estes referidos modelos de infecção recebem críticas por não reproduzir a estrutura tridimensional do epitélio, nem simular corretamente uma interface ar-líquido. Adicionalmente, estes modelos também são constituídos por um único tipo celular, o que não reproduz adequadamente as condições fisiológicas (Tabatabaei; Moharamzadeh; Tayebi et al., 2020).

Há também outros modelos tridimensionais, como por exemplo: epitélio reconstituído sobre membrana de policarbonato (RHOE® e EpiSkin®) (Cavalcanti et al., 2015; Morse et al., 2018) e modelos tridimensionais organotípicos de

células epiteliais cultivados sobre uma camada de fibroblastos envoltos em matriz de colágeno (Dongari-Bagtzoglou; Kashleva, 2006; Bertolini et al., 2015). Esses modelos recebem críticas quanto à ausência de células de defesa e a simplificação em relação ao modelo *in vivo* (Tabatabaei; Moharamzadeh; Tayebi et al., 2020).

Os modelos organotípicos já foram inclusive utilizados para simular infecções por *Candida* e estreptococos orais (Sobue et al., 2018; Souza et al., 2020). O referido modelo ainda apresenta uma camada extra submucosa que fornece uma maior complexidade organizacional (Dongari-Bagtzoglou; Kashleva, 2006; Hong et al., 2019). Porém, mesmo assim, este modelo organotípico da mucosa oral, apresenta limitações, pois sua organização ainda é inferior a modelos *in vivo* e há ressalvas relacionadas aos custos elevados para aquisição e dificuldade de importação.

Além disso, protocolos laboratoriais foram descritos na literatura para reprodução desses modelos *in vitro*, pela utilização de técnicas de engenharia tecidual (Tabatabaei; Moharamzadeh; Tayebi et al., 2020). Porém, apesar de ser uma alternativa para modelos *in vivo*, ainda há dificuldades em relação aos elevados custos e tempo necessário para reprodução de um modelo que ainda apresenta limitações em relação à mimetização do tecido *in vivo* (Bertolini et al., 2015; Morse et al., 2018).

Por outro lado, o desenvolvimento de candidíase bucal também tem sido reportado experimentalmente em animais, principalmente em modelos murinos (Dwivedi et al., 2013; Xu et al., 2014; Bertolini et al., 2019). Nesse contexto, têm sido demonstrada uma relação mutualística entre *C. albicans* e estreptococos orais comensais, em que também há um aumento da patogenicidade e virulência destes microrganismos em conjunto (Xu et al., 2014; Xu et al., 2015, Sobue et al., 2016). Especialmente na interação entre *C. albicans* e *Streptococcus oralis*, a qual apresenta-se uma das espécies colonizadoras primárias, têm sido observado uma maior susceptibilidade para colonização comensal assim como provocar alterações durante infecções oportunistas pelo fungo nas superfícies mucosas. (Xu et al., 2014)

Os protocolos de infecção por *Candida albicans* também podem variar, porém para avaliar modelo de co-infecção com *S. oralis*, o protocolo proposto por Xu et al., 2014 tem sido citado e consiste, de maneira geral, em induzir uma

imunossupressão para desenvolvimento da candidíase e um período curto de cinco dias ser suficiente para avaliar os efeitos dessa interação clinicamente. Os imunossupressores utilizados também podem variar, sendo necessária a aplicação da dose necessária para cada um deles. O acetato de cortisona na dose 225 mg/kg tem sido uma das mais utilizadas (Xu et al., 2014), porém outros estudos também citam a dose de 100 mg/kg de prednisolona (Cruz et al., 2018).

Apesar de haver estudos em animais que considerem o fator diabetes em modelos de candidíase (Venturini et al., 2016; Sano et al., 2014), até então não foram encontrados estudos em murinos que consideraram a hiperglicemia em modelos de coinfeção. Essa interação em animais diabéticos pode exercer um papel crucial na virulência do biofilme. Além disso, até então não há estudos que considerem o tratamento com fluconazol em situações em que há a presença de biofilmes mistos em murinos, o que justifica a realização de um estudo que incluía estas diferentes variáveis.

2.5 DIABETES ALOXÂNICO

Tendo em vista a necessidade de um protocolo de indução de diabetes mellitus, a literatura aponta diferentes métodos para atingir o objetivo desejado. O uso de modelos animais tem sido aplicado para obter diferentes informações relacionadas também à fisiopatologia do diabetes. Assim, muitos modelos murinos de diabetes mellitus foram desenvolvidos (Radenković et al., 2016) mostrando-se indispensáveis para a pesquisa em diabetes e suas complicações (Wu; Yan, 2015).

Dentre tais métodos destaca-se a indução do diabetes mellitus a partir da administração de drogas específicas, como por exemplo, a estreptozotocina e a aloxana, referenciadas como as mais importantes (Radenković et al., 2016) e comumente utilizadas para indução do diabetes mellitus tipo 1 (Ighodaro et al., 2017).

A estreptozotocina apresenta uma alta taxa de sucesso, porém um alto custo associado. Já a aloxana apresenta taxa de sucesso e custo mais baixo associado, por exemplo, o custo médio atual de 1 grama de aloxana e estreptozotocina é respectivamente de 1,5 e 200 dólares americanos respectivamente (Ighodaro et al., 2017). Dessa maneira, apesar da

estreptozotocina ser amplamente utilizada, a aloxana apresenta potencial e aplicabilidade a partir de protocolos cuidadosos em que deve ser observada a via de administração assim como o tempo experimental (Radenković et al., 2016; Ighodaro et al., 2017).

A aloxana (5,6-dioxiuracil; 2,4,5,6-tetraoxipirimidina) é considerada como um ácido fraco e com características hidrofílicas (Lenzen, 2008; Islam et al., 2017). É um derivado sintético da pirimidina e análogo citotóxico da glicose, sintetizada por oxidação do ácido úrico (Lenzen, 2008). Sua atividade diabetogênica está relacionada ao fato dessa molécula penetrar nas células β pancreáticas via transportador de glicose GLUT-2 permitindo sua captação seletiva e acumulação (Lenzen, 2008) o que leva à necrose dessas células (Islam et al., 2017).

De maneira geral, seu mecanismo de ação pode ser resumido em dois efeitos patológicos principais. O primeiro relacionado à inibição seletiva da secreção de insulina induzida pela glicose por meio da inibição específica da hexoquinase IV (glicoquinase). O segundo relaciona-se com a indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que resultam em uma necrose seletiva das células β pancreáticas (Lenzen, 2008; Al-Awar et al., 2016; Ighodaro et al., 2017) (Figura 2).

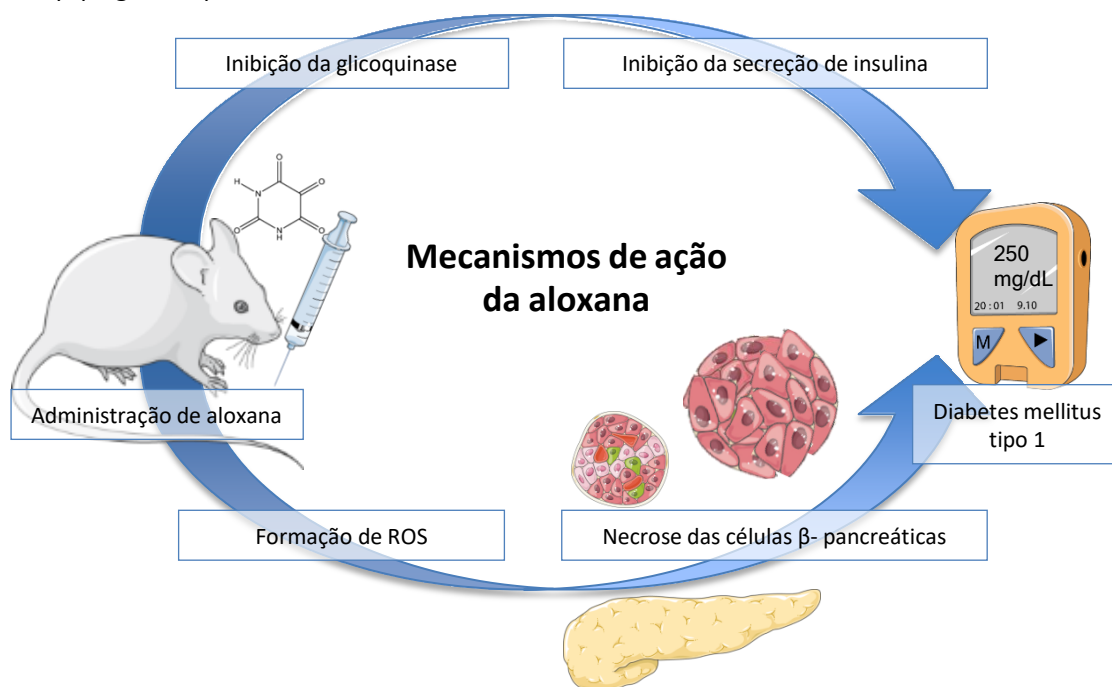


Figura 2. Fluxograma com mecanismos de ação associados à administração de aloxana. Adaptado de Al-Awar et al., 2016.

A aloxana é considerada instável, devido à possibilidade de desintegrar-se facilmente quando deixado em repouso em soluções aquosas, pois é uma droga com uma meia-vida de cerca de 1,5 minutos. Portanto, quando utilizado como agente diabetogênico, deve ser preparado no momento exato de uso (Ighodaro et al., 2017).

Após a administração da aloxana, é importante a realização de uma série de cuidados, pois em até 30 minutos, a droga proporciona discreta redução da glicemia, como resultado do aumento da secreção de insulina. Em seguida, na segunda fase, ocorre retenção da insulina nas células β e aumento da glicemia, que persiste por até 4 horas após a aplicação da aloxana. Na terceira fase, no período de 4 a 8 horas depois, devido à ruptura da membrana celular há um aumento da insulina (Lenzen, 2008). Por fim, a quarta fase é marcada por hipoinsulinemia e hiperglicemia permanente, pois houve a lise completa das células de forma crescente entre 9 a 144 horas com período de estabilização em seguida (Lenzen, 2008).

Um dos principais pontos de discussão sobre o uso da aloxana tem sido relacionado às diferenças nos protocolos, que alteram a ação de indução do diabetes mellitus. Os fatores que mais se alteram são: a dose, via de administração, o tempo de jejum e idade (Federiuk et al., 2004; Silva et al., 2015). Em relação à dose, tem sido relatado que a dose está diretamente associada à via de administração, pois pela via intraperitoneal a dose eficaz deve ser duas a três vezes maior que a dose usada via intravenosa (Szkudelski, 2001).

Dessa maneira, estudo prévio mostrou que a dosagem de 120 mg/kg pela via intraperitoneal tem sido satisfatória (Oliveira et al., 2012). Por outro lado também tem sido relatado que caso não seja suficiente doses abaixo de 150 mg/kg, pode ser administrada uma novamente (Szkudelski, 2001). Nesse contexto, é importante observar que a dose deve ser individualizada e ajustada frequentemente com base na resposta de cada animal (Federiuk et al., 2004).

Em relação ao tempo de jejum, tem sido demonstrado que quanto maior o tempo de jejum, melhor a ação da aloxana (Ighodaro et al., 2017), sendo que deve haver um tempo mínimo de 12 horas e no máximo de 24 horas devido a questões éticas (Oliveira et al., 2012). No tópico relacionado à idade, tem sido considerado que animais mais velhos devem ser escolhidos, pois os mais jovens podem ser altamente resistentes e menos susceptíveis (Ighodaro et al., 2017).

A partir da correta aplicação do protocolo de administração da aloxana, é gerada uma condição que pode ser denominado diabetes aloxânico, similar ao estado do diabetes mellitus tipo 1 (Lenzen, 2008). A literatura relata sucesso no uso dessa droga para ação diabetogênica em ratos. O uso dessa droga também tem sido aplicado em metodologias para avaliação da Candidíase Oral em murinos diabéticos (Venturini et al., 2016; Sano et al., 2014), o que justifica sua utilização.

2.6 TRATAMENTO COM FLUCONAZOL

Em relação ao tratamento da candidíase, existem diversos antifúngicos disponíveis, as classes de medicamentos antifúngicos atualmente disponíveis que são usados para tratar infecções por *C. albicans* incluem o polienos, 5-flucitosina (5-FC), os azóis e as equinocandinas (Roemer, Krysan, 2014).

Do ponto de vista clínico em humanos, para o tratamento da candidíase oral e orofaríngea, em casos mais leves, tem sido orientado o uso de clorimatazol ou suspensões de nistatina. Entretanto, para casos moderados a severos, a evidência recomenda dosagens entre 100-200 mg diariamente, entre 7 a 14 dias de fluconazol (Pappas et al., 2016, Quindós et al., 2019).

Nesse contexto, em uma revisão sistemática recente, que considerou apenas estudos clínicos randomizados, foi observado que a terapia com fluconazol, da classe dos azóis, foi eficaz e melhor na redução da taxa de cura micológica, quando comparada a outros antifúngicos como, por exemplo, a nistatina, miconazol e anfotericina B (Fang et al., 2021).

O fluconazol é um agente antifúngico de amplo espectro, apresenta efeito na infecção fúngica superficial e profunda, pois atua na membrana celular fúngica, o que inibe sua proliferação (Guery et al., 2009). Os azóis são divididos em dois subgrupos baseados em sua estrutura química: os imidazóis, como clotrimazol, cetoconazol e miconazol, e os triazóis, que incluem fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol. Os triazóis são comumente usados para tratar candidíase mucosa e sistêmica (Lopes, Lionakis, 2022).

Os azóis têm como alvo o ERG11P/CYP51 e inibem a biossíntese do ergosterol, levando ao acúmulo de esteróis tóxicos nas membranas celulares dos fungos, como 14 α -metilergosta-8,24(28) dienol e níveis aumentados de espécies

reativas de oxigênio (ERO) endógenos que contribuem para inibir a proliferação fúngica (Lopes, Lionakis, 2022).

Nesse contexto, o fluconazol é um fármaco anti-fúngico comumente usado, não tem vantagem de custo em relação a outras ferramentas farmacológicas, porém a diferença no efeito terapêutico é estatisticamente significativa, tanto em estudos clínicos, como também em estudos em murinos, que é um importante fator a ser considerado no tratamento da candidíase (Cruz et al., 2018; Fang et al., 2021).

O efeito do tratamento com fluconazol também tem sido observado em diferentes protocolos em murinos. Porém foi observado que uma dose de 10 mg/kg via intraperitoneal a cada 12 horas seria necessária para o tratamento da candidíase (Cruz et al., 2018). Por tais razões, será o antifúngico de escolha para avaliar seu efeito também situações de alto risco, ao considerar a co-infecção em ratos diabéticos e imunossuprimidos.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar experimentalmente o efeito do diabetes aloxânico e do tratamento com fluconazol na virulência e patogenicidade da coinfeção de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. oralis* em modelo animal murino.

3.2 ESPECÍFICOS

- Identificar os principais modelos de candidíase oral em murinos;
- Avaliar um modelo experimental de candidíase oral em ratos diabéticos;
- Verificar a eficácia da terapia com fluconazol em ratos com e sem diabetes;
- Avaliar a invasão tecidual de *Candida albicans* por meio de análises histológicas;
- Avaliar a expressão de fatores de virulência de biofilmes mistos *C. albicans* e *S. oralis* em um modelo experimental de candidíase bucal desenvolvido em murinos.

4. ARTIGO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “*Brazilian Dental Journal*”.

INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO EM MODELO DE CANDIDÍASE ORAL DESENVOLVIDO EM MURINOS: UM ESTUDO BIBLIOMÉTRICO

Modelos murinos para avaliação de candidíase oral: um estudo bibliométrico

Arella Cristina Muniz Brito¹

Jannerson César Xavier Pontes¹

Maria Heloísa de Souza Borges¹

Yuri Wanderley Cavalcanti²

1 Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

2 Departamento de Odontologia Clínica e Social. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

Correspondência para:

Yuri Wanderley Cavalcanti

Departamento de Odontologia Clínica e Social da Universidade Federal da Paraíba - Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil. CEP 58051-900.

SUMMARY

Analisaram-se as publicações relacionadas a modelos de biofilme de candidíase oral desenvolvidos em murinos. Realizou-se um estudo bibliométrico, por meio de uma estratégia de busca com descritores e termos pré-estabelecidos, utilizando os operadores booleanos OR e AND. As buscas foram realizadas nas bases de dados PubMed e Web of Science. Foram encontrados 13351 artigos, dos quais após a remoção das duplicatas totalizaram 8159. A partir dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 184 estudos, dos quais 51 foram considerados nos últimos 20 anos. Os principais dados coletados foram: autores, ano, periódico, país de publicação, citações, amostra total, amostra por grupo, tipo de animal, linhagem do animal, sexo, duração da infecção, microrganismos, imunossupressão e o tecido coletado. Os dados dos estudos foram extraídos e analisados de forma descritiva utilizando o software VOSViewer. Os resultados demonstraram que a maioria dos modelos considerou o uso de camundongos (86,27%) e de fêmeas (68%). O tecido mais coletado foi a língua (94,11%). Além disso, 60,78% dos modelos utilizaram a imunossupressão para desenvolver a infecção. A linhagem mais frequentemente reportada foi C57BL/6J (29,4%). A análise das tendências nas publicações de candidíase oral em modelo murino contribui para o melhor delineamento de metodologias a serem empregadas.

KEY WORDS: *Candida albicans*, muridae, ratos, camundongos.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Candida* geralmente são caracterizadas como colonizadores comensais da cavidade bucal (1,2). Entretanto, quando ocorre a perda da homeostase da microbiota, esses fungos se proliferam e desenvolvem uma infecção conhecida como candidíase (1). *Candida albicans* é a espécie mais prevalente e patogênica, sendo também o microrganismo mais estudado (3).

Embora frequentemente constituam infecções localizadas, a candidíase pode disseminar-se na corrente sanguínea e desenvolver uma condição sistêmica grave, especialmente entre indivíduos com imunidade reduzida (4). Uma das formas mais comuns dessa infecção é conhecida por candidíase oral, que difere dos outros tipos principalmente devido a características particulares da cavidade oral, como por exemplo, a disponibilidade de oxigênio e o pH (5,6). No que se refere ao estudo da fisiopatologia da candidíase oral, faz-se necessário analisar não apenas o desenvolvimento do biofilme, mas também a interação entre patógeno e hospedeiro.

Modelos animais têm sido utilizados amplamente como alternativas para elucidar mecanismos envolvidos na patogênese celular e molecular da candidíase oral (7). Por sua vez, os modelos murinos têm sido amplamente aplicados por apresentar vantagens como o controle do ambiente, semelhança com a fisiopatologia em humanos, valor econômico mais acessível, reprodutibilidade, e disponibilidades de reagentes para análises específicas (7,8). Todavia, as condições para o delineamento de estudos em animais podem variar significativamente, sendo necessário realizar uma síntese da literatura sobre estas condições para o delineamento de novos estudos.

Os estudos bibliométricos são tipos de pesquisas que usam ferramentas específicas para analisar e quantificar as características da literatura publicada em determinados campos de conhecimento. Dessa maneira é possível analisar as principais publicações e discussões ao longo do tempo (9,10). Apesar de haver uma série de publicações relacionada a modelos murinos, não há consenso sobre as melhores alternativas e condições para estudos específicos, considerando o desenvolvimento da candidíase oral. Dessa maneira, este tópico pode auxiliar a identificar as tendências nesses estudos para próximas pesquisas. Nesse

contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar as publicações relacionadas à modelos de candidíase oral desenvolvidos em murinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se um estudo bibliométrico, reportado de acordo com guia publicado previamente (10) por meio de uma estratégia de busca com os principais descritores e termos, utilizando bases de informação científica. Esta revisão foi registrada na plataforma Open Science Framework (OSF) (DOI 10.17605/OSF.IO/MK97W). Dois examinadores (ACMB e YWC) realizaram a busca de maneira independente sem restrições de idioma. Foram realizadas buscas no *PubMed* e *Web of Science*. Termos do *Medical Subject Headings* (MeSh) , que contém uma amplo acervo. Termos livres e operadores booleanos também foram utilizados conforme apresentado No Quadro 1.

Quadro 1. Estratégia de busca de acordo com as diferentes bases de dados utilizadas.

Base de dados	Estratégia de Busca
PubMed	((((((((Mice[MeSH Terms]) OR (Rats[MeSH Terms])) OR (Wistar rats[MeSH Terms])) OR (Murine model[Title/Abstract])) OR (mice[Title/Abstract])) OR (rats[Title/Abstract])) OR (wistar rats[Title/Abstract])) AND (((((((((Candidiasis[Title/Abstract]) OR ("Oral candidiasis"[Title/Abstract])) OR ("Chronic Mucocutaneous candidiasis"[Title/Abstract])) OR (candidosis[Title/Abstract])) OR ("Candida albicans"[Title/Abstract])) OR ("C. albicans"[Title/Abstract])) OR ("Candidiasis, Chronic Mucocutaneous"[MeSH Terms])) OR (candidiasis[MeSH Terms])) OR (oral candidiasis[MeSH Terms]))
Web of Science	TS=("Murine model" OR mice OR rats OR "wistar rats") AND TS=(Candidiasis OR "Oral candidiasis" OR "Chronic Mucocutaneous candidiasis" OR candidosis OR "Candida albicans" OR "C. albicans")

As referências obtidas nas bases de dados foram transportadas para o software *Mendeley Desktop* (Mendeley Desktop, versão 1.16.1, © 2008-2016

Mendeley Ltd., Elsevier Inc.,EUA), que foi empregado como gerenciador de referências. Em seguida, foram removidas as duplicatas dos estudos e selecionadas apenas as publicações dos últimos 20 anos (2002-2022). O limite de ano de publicações foi estabelecido para que a literatura analisada representasse os modelos mais atuais empregados no estudo da candidíase. Além disso, os estudos mais recentes deveriam apresentar maior metodologia bem definida, bem como conceitos mais atuais sobre a ética, proteção e bem estar animal.

Inicialmente, foi realizada a leitura de títulos e abstracts para triagem inicial dos estudos. Foram selecionados apenas estudos que reportaram modelos *in vivo* de infecção de candidíase oral em murinos apresentando a espécie *Candida albicans*. Estudos *ex vivo*, *in vitro*, *in situ*, relatos de caso, revisões de literatura, artigos com informações inacessíveis e protocolos de pesquisas que não atenderam aos critérios de inclusão, foram excluídos. Os estudos precisavam estar relacionados à avaliação da candidíase oral em murinos e apresentar informações acerca do delineamento do estudo e principais resultados.

Após a triagem dos estudos, realizou-se a leitura na íntegra dos estudos para confirmar a inclusão dos mesmos. Em seguida, foi realizada a extração dos dados dos estudos incluídos. Os dados coletados foram adicionados a uma tabela de extração no Excel, com as seguintes informações: título, autores, ano de publicação, periódico, país de realização do estudo, número de citações, amostra total, amostra por grupo, tipo de animal, linhagem dos animais, sexo, duração da infecção, microrganismos, presença ou ausência de imunossupressão e órgão avaliado. Discordâncias entre os avaliadores foram colocados em discussão com o terceiro autor (MHB) quando necessário.

Os estudos incluídos foram analisados a partir de uma síntese qualitativa, que descreveu as principais características acerca das publicações, dos objetivos e dos desfechos obtidos. Síntese gráfica dos resultados foram obtidos a partir da utilização do *software VosViewer* (VOSviewer version 1.6.18). Foram obtidas representações gráficas da existência de redes bibliométricas, identificando as conexões entre os autores, assim como as palavras chaves mais prevalentes.

RESULTADOS

Inicialmente os autores identificaram 13351 estudos. Após remoção das duplicatas, foram mantidos 8163 estudos, dos quais 7979 foram excluídos,

resultando no total de 184 selecionados para leitura completa. Após esta etapa, 72 foram excluídos, pois não estavam de acordo com os critérios de elegibilidade, resultando num total de 57 artigos, dos quais 6 também foram excluídos por não apresentarem os dados necessários, o que resultou em 51 artigos selecionados (Figura 1).

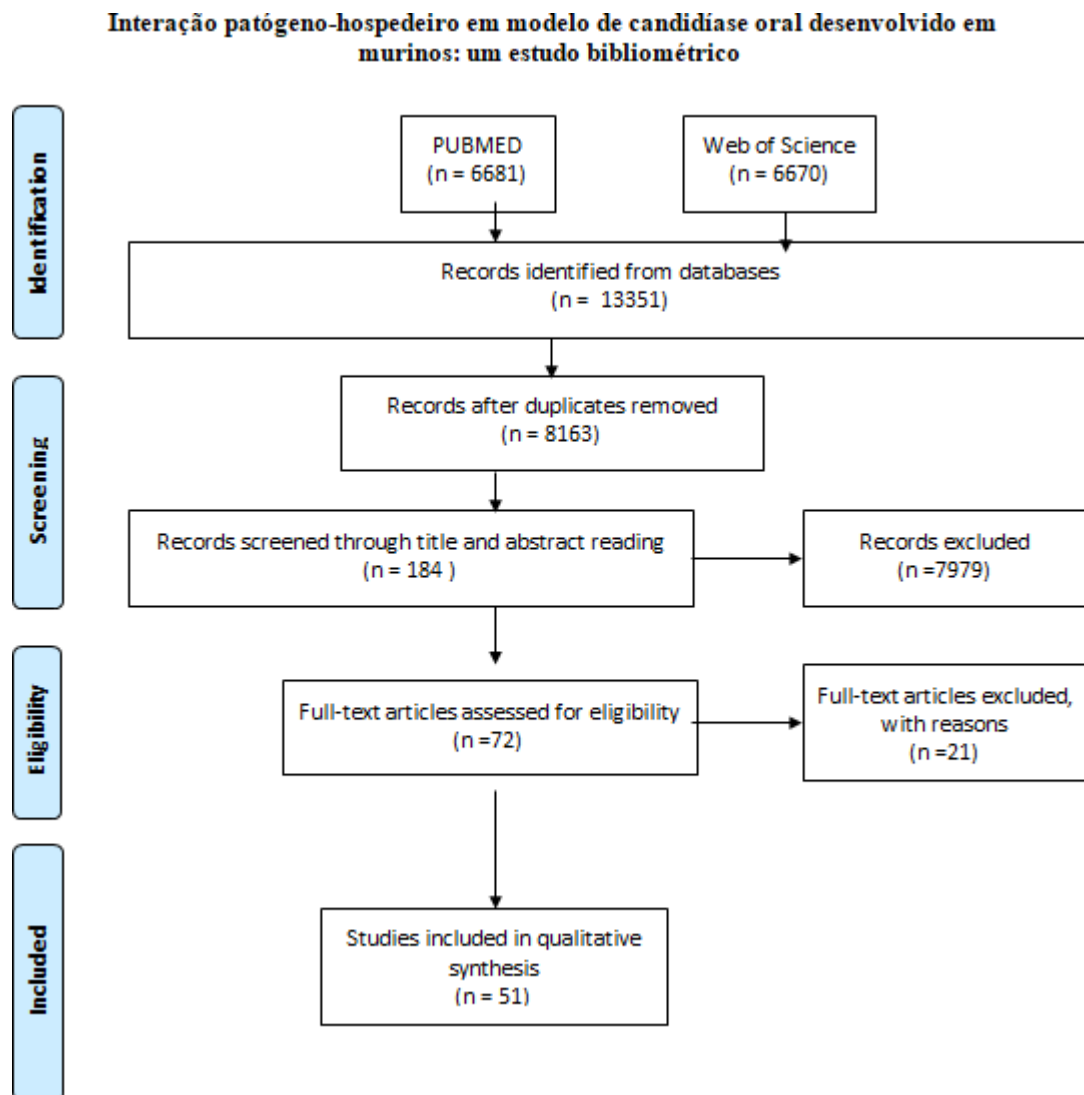


Figura 1. Fluxograma com o total de estudos selecionados para o presente estudo bibliométrico. Adaptado de PRISMA fluxogram 2009.

A lista dos estudos incluídos é apresentada na Tabela 1, onde são apresentadas as informações: autores, ano, periódico, país de publicação, citações, amostra total, amostra por grupo, tipo de animal, linhagem, sexo, duração da infecção, microrganismos, imunossupressão e o tecido coletado (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos estudos incluídos na revisão de acordo com autores, ano, periódico, país de publicação, citações, amostra total, amostra por grupo, tipo de animal, linhagem, sexo, duração da infecção, microrganismos, imunossupressão e o tecido coletado.

Authorship	Year	Journal	Country	Citation	Total sample	Samples per-group	Animal type	Animal lineage	Sex	Infection duration	Microorganisms	Immunosuppression	Organ
Lemberg et al	2022	PLoS pathogens	Switzerland	7	Not clear	Not clear	WT C57BL/6j mice	WT C57BL/6j mice	female	7 days infected sublingually	<i>C. albicans</i>	No	Tongue
Sakima et al	2022	Journal of fungi	Brazil	0	47 male and 44 female	5 each, negative control=2 and device control 3	Rats	Wistar rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	male and female	Twice for 3 days, device kept for four weeks	<i>C. albicans</i> , <i>Nakaseomyces glabratus</i> , <i>C. tropicalis</i>	Immunocompromised rats	Palate
De Barros et al	2022	Frontiers in cellular and infection microbiology	Brazil	18	35	8 por grupo, 3 no controle	Mice	Swiss mice	male	Not clear	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Tripathi et al	2022	Journal of oral microbiology	United States	1	16	8	Mice	C57BL/6 female mice	female	5 days	(WT) SC5314-strain <i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Zhao et al	2022	Frontiers in immunology	China	5	10	5	Mice	C57BL/6J mice	female	Not clear	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Pérez-Sayáns et al	2021	Journal of dental sciences	Spain	6	84	42	Rats	SpragueDawley sialoadenectomized	male	17 days candidiasis and 5 days treatment	<i>C. albicans</i>	No, sialoadenectomized	Tongue
Bertolini et al	2021	mBio	United States	15	Minimum of 24 and maximum of 36	5 - 12 and 4-8 per group	Mice	C57BL/6 mice	female	4 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Chen et al	2020	Biochemical Pharmacology	China	16	120	20 per group	Mice	C57BL/6 strain mice	Not clear	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Khoury et al	2020	Frontiers in microbiology	United States	53	15	3-5 per group	Mice	C57BL/6 mice	female	5 days	<i>C. albicans</i> e <i>S.mutans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Jiang et al	2020	Biofouling	China	7	20	5	Mice	Not clear	Not clear	Not clear	<i>C. albicans</i>	prednisolone	Tongue
Kobayashi-Sakamoto	2020	Microbial pathogenesis	Japan	2	12	3	Mice	female Cr:CD-1(ICR) mice	female	5 days	<i>C. albicans</i> cotton swab	prednisolone	Tongue

Bertolini et al	2019	Plos pathogens	United States	136	20	5	Mice	C57BL/6	female	5 days	overnight <i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue, esophagus
Kirchner et al	2019	Frontiers in immunology	Switzerland	44	12	3 to 4	Mice	Foxp3-GFP.Kl x Il10-Thy1.1, , DREG mic and Il10-/- mice e C57BL/6J mice	Not clear	t 9 h, 1 day, 3 days and 7 days	<i>C. albicans</i>	No	Tongue
Zhou et al	2018	Int. journal of oral science	China	12	?	Not clear	Mice	BALB/c mice	Female	4 to 5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Katagiri et al	2018	Odontology	Japan	14	30	10	Mice	ICR mice	Male	6 days	<i>C. albicans</i>	No	Tongue
Cruz et al	2018	Journal of fungi	Brazil	16	9	3	Mice	C57BL/6 mice	female	5 days	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Xu et al	2017	Virulence	United States	63	3 grupos	5 to 8	Mice	C57BL/6 mice	female	5 days	<i>C. albicans</i> - <i>S. oralis</i>	Cortisone acetate	Tongue
Xu et al	2016	Journal of infectious diseases	United States	90	3 grupos	4 to 8	Mice	C57BL/6 mice,	Female	5 days	<i>C. albicans</i> - <i>S. oralis</i> 34,	Cortisone acetate	Tongue
Carmello et al	2016	Plos one	Brazil	72	126	60, 60 and 6	Mice	Swiss mice specific pathogen free [SPF]	Female	7 days, 12 treatment	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Conti et al	2016	Cell host & microbe	United States	152	12	4 per group	Mice	Il17ra -/- mice and anti-IL-17RA Abs	Not clear	14 days	<i>C. albicans</i>	No	Tongue
Kumar et al	2015	Infection and immunity	United States	71	5 grupos	10 per group	Mice	(C57BL/6J;	Female	Not clear	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Campos Rasteiro	2014	BMC complementary and alternative medicine	Brazil	42	24	12	Mice	<i>Mus musculus</i> , <i>Albinus</i> , <i>Swiss</i>	Male	7 days	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Sano et al	2014	Journal of diabetes research	Japan	15	40	3 groups, 30 alloxan induced, the rest divided into groups	Rats	WBN/Kob rats	Female	Not clear	<i>C. albicans</i>	No	Mucosa
Xu et al	2014	Cellular microbiology	United States	190	24?	6 to 12 animals per group	Mice	C57BL/6 mice or TLR2-/- (B6.129-Tlr2tm1Kir/J) mice	Female	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue and mucosa

Tati et al	2014	Antimicrob agents chemother	United States	42	15	5 por grupo	Mice	5 C57BL/6J mice	Female	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Melkoumov et al	2013	Journal of antimicrobial chemotherapy	Canada	49	60	20	Mice	DBA/2 mice	Male	14 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Matsubara	2012	Oral diseases	Brazil	69	152	Infection (n = 38) and groups of treatment (n = 114)	Mice	DBA/2	Male	13 days	<i>C. albicans</i>	With cyclophosphamide	(cheek, tongue, and palate)
Ishijima	2012	Applied and environmental microbiology	Japan	138	47	7, 12 e 15	Mice	ICR mice	Female	Not clear	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Johnson	2012	Infection and immunity	United States	83	16	4-6 e 10 a 16	Rats	Wistar rats	Male	8 weeks	<i>C. albicans</i>	No	Palate, mucosa, tongue and gingiva
Taguchi et al	2011	Medical mycology journal	Japan	13	12	6	Mice	ICR mice	Female	Not clear	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue, cheek and palate
Martins et al	2011	Oral surgery oral medicine oral pathology oral radiology and endodontology	Brazil	83	56	Group 1 : 40 rats, Group 2 : 16 rats first step. Second step n=4 per group, according the treatment	Rats	<i>Rattus norvegicus</i> , Albinus, Wistar	Male	17 days	<i>C. albicans</i>	No	Tongue
Dwivedi et al	2011	Plos one	United States	114	16	4 animals per group	Mice	E C57BL/6 mice	Female	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue
Nett et al	2010	Infection and immunity	United States	193	Not clear	Not clear	Rats	Specific-pathogen-free male spraguedawley	Male	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	Tongue and palate
Dwivedi	2009	Medical mycology	United States	73	42	Group 1 n=12, Group 2 n=12, Group 3= 12, Group	Mice	C57BL/6 female mice	Female	19 weeks	<i>C. albicans</i>	Immunocompromised	Tongue

						4 n=6							
Hisajima	2008	Microbiology and immunology	Japan	73	Not clear	Not clear	mice	ICR mice	female	2 after exposures	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Yanagi	2008	Biological & pharmaceutical bulletin	Japan	10	Not clear	Not clear	mice	ICR mice	female	Not clear	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Hisajima	2008	Medical mycology	Japan	30	20	5	mice	ICR mice	female	1-3 hours after infection	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue
Chiang	2007	Cellular microbiology	United States	57	144	8	mice	pathogen-free BALB/c male mice	male	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	tongue and adjacent sublingual tissue was excised from the jaw.
Green	2006	Medical mycology	United States	45	Not clear	Not clear	rats	Sprague-Dawley rats	female	3 to 5 days	<i>C. albicans</i>	sialoadenectomized	Mucosa , tongue, jaw , palate and pharynx mucosa
Taguchi	2005	Japanese journal of medical mycology	Japan	41	20	5	mice	ICR mice	female	Not clear	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	tongue
Farah et al	2005	Oral microbiology and immunology	Australia	18	30	10	Mice	pathogen-free BALB/c	female	Not clear	<i>C. albicans</i>	No	blood collection
Park et al	2005	Cellular microbiology	United States	218	24 ou 48	7-8 ou 15-16	Mice	BALB/c mice	female	5 days	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	tongue
Zhang	2004	Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences	China	13	60	30	Mice	Nunming mice	male	Not clear because mice were sacrificed a! different tirm' points after lhv inoculation	<i>C. albicans</i>	With cyclophosphamide	Oropharynx, tongue, throat and jaw

Totti	2004	Brazilian oral research	Brazil	15	324	156 xerostomic mice, 156 mice with normal salivary flow and 12 controls	Mice	<i>Mus musculus</i>	male	1, 2, 3, 5, and 8 days after inoculation and at 15-day intervals up to 165 days	<i>C. albicans</i>	No	tongue
Kamagata-Kiyoura	2004	Journal of infection and chemotherapy	Japan	31	16	4	mice	ICR mice	female	5 days	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	tongue
Takakura	2003	Microbiology and immunology	Japan	148	Until 33	5 to 11	mice	ICR mice	female	7 days	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	tongue
Takakura 2	2003	Antimicrobial agents and chemotherapy	Japan	193	Not clear	3 to 4	mice	ICR mice	female	1, 3, 5, and 7	<i>C. albicans</i>	Prednisolone	Tongue, soft palate and mucosal surfaces
Elahi	2003	Vaccine	Australia	11	15	05 to 8	mice	Male BALB/c (H-2d) and DBA/2 mice (H-2d)	male	2 weeks	<i>C. albicans</i>	No	tongue, cheek and soft palate
Teichert	2002	Oral surgery oral medicine oral pathology oral radiology and endodontology	United States	348	75	Not clear	mice	with severe combined immunodeficiency disease (SCID)	Not clear	Four weeks	<i>C. albicans</i>	with severe combined immunodeficiency disease (SCID)	tongue
Kamai	2002	Infection and immunity	Japan	108	24	6	mice	pathogen-free male ddY mice	male	viable counts in the oral tissue on days 1, 2, and 3 postinoculation.	<i>C. albicans</i>	Cortisone acetate	tongue

Farah	2002	Oral microbiology and immunology	Australia	47	50	10 per group	mice	BALB/c female nude athymic mice (nu/nu) and euthymic controls	female	70 days at least, oral tissues sampled on days 0, 4, 8, and 14. Nude mice were reconstituted with 3×10^7 naive lymphocytes following oral inoculation.	<i>C. albicans</i>	Immunocompromised	tongue, palate and mucosa
-------	------	----------------------------------	-----------	----	----	--------------	------	---	--------	---	--------------------	-------------------	---------------------------

Os artigos foram publicados entre os anos de 2002 e 2022. O periódico em que foram encontrados mais artigos relacionados ao tema foram: *Infection and Immunity* 7,84%(n=4), *Medical Mycology* 7,84% (n=4) e o *Cellular Microbiology* 5,88% (n=3) (Tabela 1). Em relação aos países que mais publicaram, os Estados Unidos representaram 35,29% (n=18), Japão 25,49% e Brasil com 15,68% (n=8) (Figura 2). O artigo mais citado, com um total de 218 citações, também foi publicado na *Cellular Microbiology*.

A rede de autores que mais publicaram na área está demonstrada no mapa e a rede de colaboração entre eles pode ser observada pelas setas adjacentes (Figura 3). Também foi identificada a densidade da distribuição das palavras-chave mais encontradas nos estudos selecionados (Figura 4).

As características acerca do delineamento dos estudos são apresentadas na tabela 1. Nessa tabela, são visualizadas informações sobre tamanho amostral, tipo de animal, tipo de infecção, imunossupressão e órgão avaliado. A amostra total variou entre 20 animais a 324 distribuídos de acordo com os grupos experimentais.

Em relação ao tipo de animal, os modelos consideram principalmente o uso de camundongos 86,27% (n=44) seguido pelo uso de ratos 13,72% (n=7). Em relação à linhagem dos animais, as maiores ocorrências foram de camundongos tipo C57BL/6J 29,4% (n=15) e camundongos do tipo *ICR* 21,56% (n=11). Em relação à linhagem encontrada nos ratos, a linhagem *Wistar*, foi a mais encontrada com 5,88% (n=3). O uso de fêmeas foi de 68% (n=32), já o de machos foi de 31,91% (n=15) (Tabela 1).

A duração da infecção variou de 3 horas a 24 semanas, de acordo com o escopo de cada estudo. Todos utilizaram *C. albicans* para o modelo de infecção. Alguns estudos consideraram outras espécies do gênero como, por exemplo, *Nakaseomyces glabratus* e *C. tropicalis*. Outros artigos também utilizaram infecções por estreptococos orais, dentre eles o *Streptococcus oralis* e *S. mutans*. A maioria dos modelos utilizou a imunossupressão com algum tipo de medicamento para desenvolver a infecção (60,78%, n=31). O acetato de cortisona foi o imunossupressor mais utilizado 33,33% (n=17). A Prednisolona foi utilizada em 23,52% (n=12) e a Ciclofosfamida foi utilizada em 3,92% (n=2).

O órgão mais coletado para avaliação foi a língua 94,11% (n=48). Os outros órgãos coletados foram: palato 17,64% (n=9), a mucosa jugal 7,84% (n=4) e o esôfago e mandíbula 5,88 9 (n=1) . Alguns dos estudos encontrados consideraram mais de um tipo de órgãos para análise (Tabela 1).

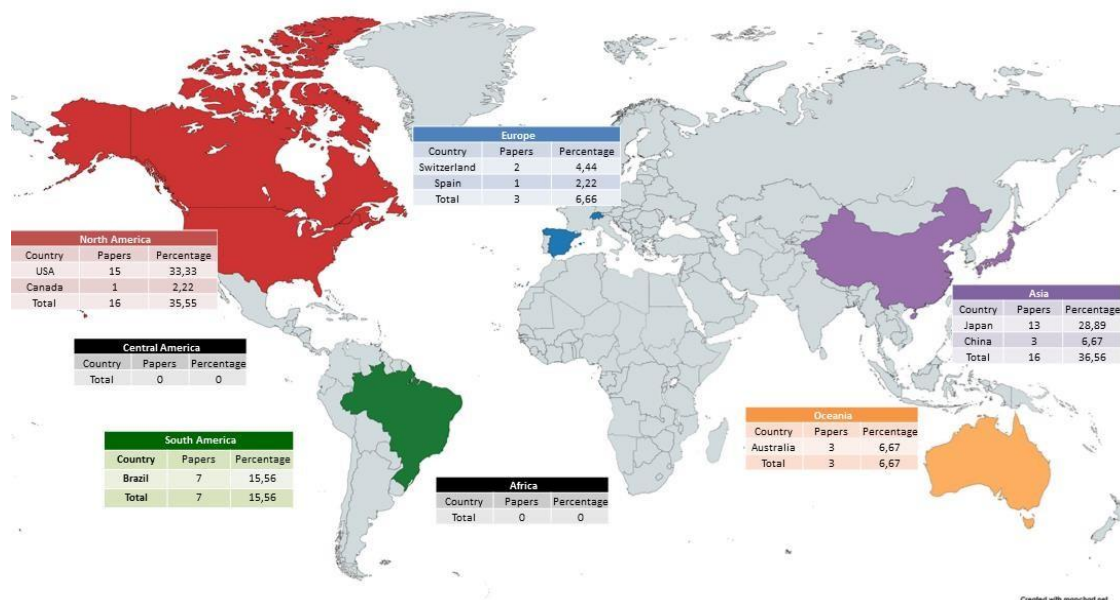


Figura 2. Mapa dos continentes e dos países encontrados na busca.

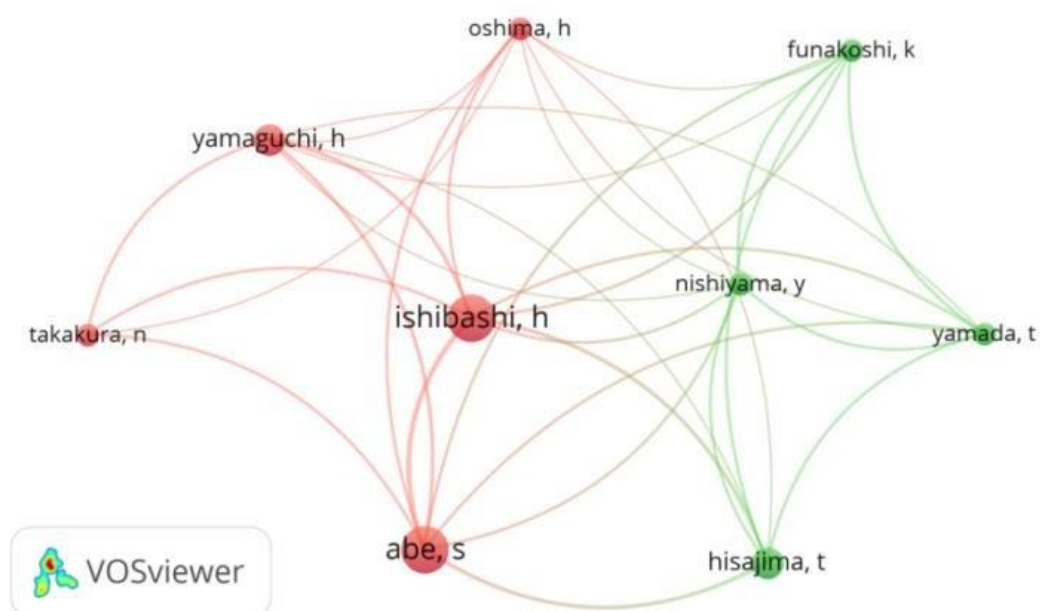


Figura 3. Mapa de colaboração entres os autores que mais publicaram estudos em modelo murino para avaliação da candidíase. As setas correspondem a co-autorias.

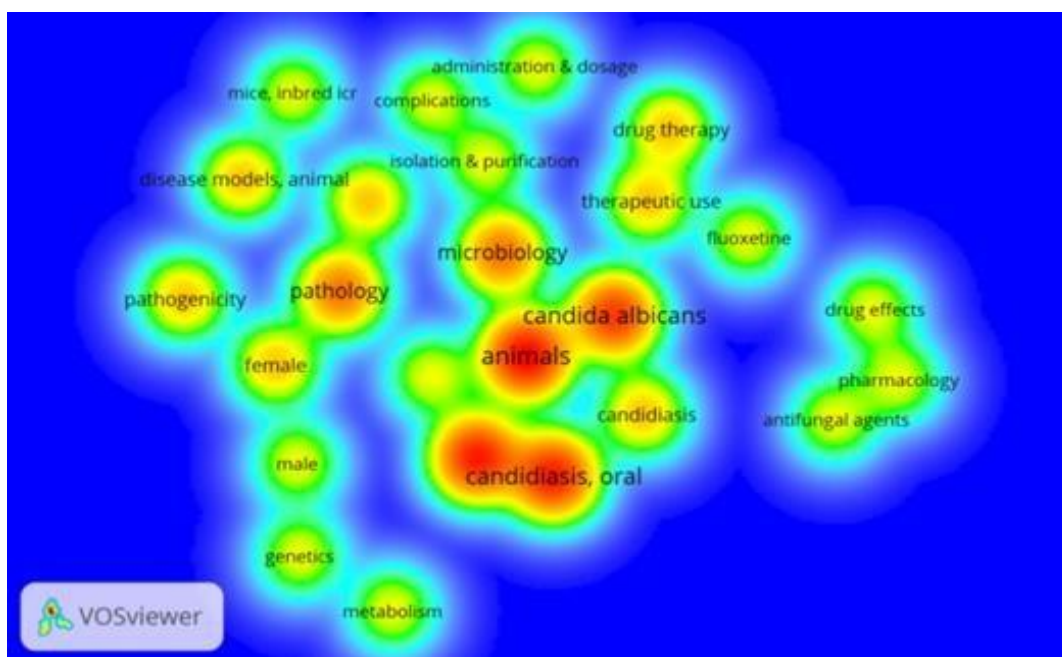


Figura 4. Mapa com a densidade da distribuição das palavras-chave mais encontradas nos estudos selecionados com a contagem total (n= 25).

DISCUSSÃO

Estudos *in vivo* para avaliação da candidíase oral têm sido realizados ao longo dos últimos 20 anos. A partir do levantamento da literatura, foram selecionados apenas artigos dos quais as metodologias avaliaram a cavidade bucal em modelos murinos. Por tais razões, o número de artigos encontrados na busca foi reduzido por seus delineamentos não avaliarem o assunto principal do presente estudo bibliométrico, a candidíase oral. Dentre os estudos incluídos, foram encontrados diversos tópicos relacionados ao tema, desde estudos que avaliaram mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença (6, 11,12,13,14) até mesmo metodologias que testaram o uso de fármacos, substâncias e medicamentos, por exemplo (15,16,17).

De acordo com os resultados encontrados, foi observado que as tendências variaram desde o tipo de animal, sexo, linhagem a quantidade de animais por grupo e o tipo de imunossupressão para o desenvolvimento da candidíase. Nesse contexto, os desfechos também foram coerentes com os objetivos de cada estudo. Em todos os artigos encontrados, o modelo animal conseguiu atender os respectivos escopos propostos.

Os achados específicos relacionados ao tipo de animal, sexo e linhagem demonstraram uma predileção por C57BL *mice* e o ICR *mice*, porém os artigos

não discutiram essa predileção como escopo. A escolha pode estar relacionada às facilidades, a disponibilidade ou ao protocolo escolhido, o tempo experimental também pode ter sido um fator determinante. Em relação ao sexo, a maioria dos autores preferiu o uso de fêmeas, esse fato pode ser atribuído a questões relacionadas ao ciclo estral e a ansiedade (18), que podem interferir nos protocolos escolhidos. Ou seja, sugerimos que as predileções não significam necessariamente que sejam melhores, sendo a metodologia empregada o fator de escolha principal.

O achado mais importante deste estudo bibliométrico que destacamos é uso da língua como principal órgão coletado para avaliar a disseminação da candidíase oral em modelos murinos. Isso pode estar relacionado ao fato de ser um órgão fácil de coletar, quando comparada a outras estruturas, já haver uma gradação com escore para avaliação das lesões (19), além de não precisar de dispositivos para simular uma candidíase em outros sítios como no palato por exemplo, o que demonstra ser um órgão importante de ser coletado nos estudos relacionados a esta temática.

Outro ponto que podemos destacar é a importância da imunossupressão ou uso de linhagens específicas já imunossuprimidas para o desenvolvimento da candidíase, pois ao considerar que *C. albicans* não faz parte da microbiota comensal de murinos, teoricamente apenas murinos com imunidade suprimida, conseguem desenvolver as lesões mais avançadas. Assim, é possível observar uma maior carga de microrganismos e biomassa total do biofilme (4). Dessa maneira, os principais tipos de imunossupressores utilizados foram acetato de cortisona e prednisolona, ambos corticoides em dose mais elevadas para os efeitos imunossupressores serem observados. Além disso, as dosagens escolhidas foram similares nos estudos encontrados.

Em relação aos periódicos, os que mais publicaram foram *Infection and Immunity*, *Medical Mycolgy* e *Celular Microbiology*. Todos são periódicos que publicam na língua inglesa, o que reforça a predileção pela mesma (20). Também foi observado que os Estados Unidos foram o país mais apresentou publicações, o que reforça que a língua nativa também é o inglês. Em relação a este achado, é possível observar que a maioria das pesquisas além de publicarem nesta língua também foi originada deste local, também receberam o maior número de citações, o que pode demonstrar a *expertise* e investimento nessa área.

Dentre outros países, podemos destacar o Japão e o Brasil. Por outro lado, os demais continentes apresentaram um número mais baixo, ou até mesmo nenhum artigo com os objetivos do presente estudo. Vale destacar que foram encontrados artigos oriundos de tais locais, porém os mesmos não atenderam aos critérios de inclusão e exclusão. Tal achado pode indicar pesquisas em andamento ainda não publicadas.

A partir dos resultados da presente revisão bibliométrica, foi observado que o maior número de citações e publicações foi oriunda dos Estados Unidos, o tipo de animal mais utilizado foram as fêmeas, com imunossupressão e camundongos com as linhagens *ICR mice* e *C57BL/6J* e o órgão mais coletado para avaliação da candidíase oral foi a língua. Destacamos a importância desses estudos para coletar informações presentes na literatura em relação às tendências e metodologias mais aplicadas no estudo da candidíase oral em murinos dos últimos 20 anos. Os autores reforçam a importância de conhecer o contexto e aplicabilidade em cada delineamento de futuros estudos.

REFERÊNCIAS

1. Gow NAR, Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology (Reading)*. 2017 Aug;163(8):1145-1147.
2. Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020 Jan 16;6(1):15.
3. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog*. 2018 Apr;117:128-138.
4. Bertolini M, Ranjan A, Thompson A, Diaz PI, Sobue T, Maas K, Dongari-Bagtzoglou A. *Candida albicans* induces mucosal bacterial dysbiosis that promotes invasive infection. *PLoS Pathog*. 2019 Apr 22;15(4):e1007717.
5. Gaffen SL, Moutsopoulos NM. Regulation of host-microbe interactions at oral mucosal barriers by type 17 immunity. *Sci Immunol*. 2020; 5(43).

6. Lemberg C, Martinez de San Vicente K, Fróis-Martins R, Altmeier S, Tran VDT, Mertens S, Amorim-Vaz S, Rai LS, d'Enfert C, Pagni M, Sanglard D, LeibundGut-Landmann S. *Candida albicans* commensalism in the oral mucosa is favoured by limited virulence and metabolic adaptation. *PLoS Pathog*. 2022 Apr 11;18(4):e1010012.
7. de Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Aug;7(4):324-9.
8. Segal E, Frenkel M. Experimental in Vivo Models of Candidiasis. *J Fungi (Basel)*. 2018 Feb 6;4(1):21.
9. Rocha AO, Anjos LMD, Vitali FC, et al. Tooth Bleaching: A bibliometric analysis of the top 100 most-cited papers. *Braz Dent J*. 2023;34(2):41-55.
10. Donthu, N., Kumar, S., Mukherjee, D., Pandey, N., & Lim, W. M. (2021). How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines. *Journal of Business Research*, 133, 285-296.
11. Kobayashi-Sakamoto M, Maeda T, Yusa J, Kato Y, Kiyoura Y. RANK-RANKL signaling upregulates IL-10 mRNA expression in mucosal *Candida* infection in vivo. *Microb Pathog*. 2020 Dec;149:104285.
12. Bertolini M, Vazquez Munoz R, Archambault L, Shah S, Souza JGS, Costa RC, Thompson A, Zhou Y, Sobue T, Dongari-Bagtzoglou A. Mucosal Bacteria Modulate *Candida albicans* Virulence in Oropharyngeal Candidiasis. *mBio*. 2021 Aug 31; 12(4):e0193721.
13. Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Vickerman M, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A. *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. *Virulence*. 2017 Nov 17;8(8):1602-1617.
14. Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Dongari-Bagtzoglou A. *Streptococcus oralis* and *Candida albicans* Synergistically Activate μ -Calpain to Degrade E-cadherin From Oral Epithelial Junctions. *J Infect Dis*. 2016 Sep 15;214(6):925-34.
15. de Barros PP, Rossoni RD, Garcia MT, Kaminski VL, Loures FV, Fuchs BB, Mylonakis E, Junqueira JC. The Anti-Biofilm Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) In Vitro and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Aug 2;11:700305.

16. Jiang L, Zheng L, Sun KA, Zhou P, Xu R, Gu J, Wei X. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antifungal activity of fluoxetine combined with antifungals against *Candida albicans* biofilms and oral candidiasis. *Biofouling*. 2020 May;36(5):537-548.
17. Cruz LIB, Lopes LFF, de Camargo Ribeiro F, de Sá NP, Lino CI, Tharmalingam N, de Oliveira RB, Rosa CA, Mylonakis E, Fuchs BB, Johann S. Anti-*Candida albicans* Activity of Thiazolyldrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models. *J Fungi (Basel)*. 2018 Dec 12;4(4):134.
18. Scholl JL, Afzal A, Fox LC, Watt MJ, Forster GL. Sex differences in anxiety-like behaviors in rats. *Physiol Behav*. 2019 Nov 1;211:112670.
19. Takakura N, Sato Y, Ishibashi H, Oshima H, Uchida K, Yamaguchi H, et al. A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush. *Microbiology and Immunology* 2003;47(5):321-6.
20. Hanauer, D. I., Sheridan, C. L., & Englander, K. (2019). Linguistic Injustice in the Writing of Research Articles in English as a Second Language: Data From Taiwanese and Mexican Researchers. *Written Communication*, 36(1), 136-154.

5. ARTIGO 2

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Biofouling”.

PATOGENICIDADE DE BIOFILMES MISTOS DE *Candida albicans* E *Streptococcus oralis* EM MODELO MURINO SUBMETIDO AO DIABETES ALOXÂNICO E À TERAPIA COM FLUCONAZOL

Arella Cristina Muniz Brito¹

Jannerson César Xavier Pontes¹

Maria Heloísa de Souza Borges¹

Rayne Taveira Rocha do Nascimento¹

Francisco Naldo Gomes Filho¹

Adriano Francisco Alves²

Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida³

Yuri Wanderley Cavalcanti³

1 Programa de Pós-graduação em Odontologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

2 Departamento de Fisiologia e Patologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

3 Departamento de Odontologia Clínica e Social. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

Correspondência para:

Yuri Wanderley Cavalcanti

Departamento de Odontologia Clínica e Social da Universidade Federal da Paraíba - Campus I, Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil. CEP 58051-900.

Resumo

O diabetes mellitus e a candidíase oral são doenças de alta prevalência. Elevados níveis de colonização e invasão fúngica podem ser encontrados em pacientes diabéticos devido às suas condições sistêmicas. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do diabetes aloxânico e do tratamento com fluconazol na coinfeção de biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Streptococcus oralis* em ratos *Wistar* machos. Os animais (n=24) foram distribuídos em: grupo não-diabético e sem tratamento (CTR, n=6), grupo não-diabético e tratado com fluconazol (FLU, n=6), grupo diabéticos e sem tratamento (DCTR, n=6), grupo diabéticos e tratados com fluconazol (DFLU, n=6). As dosagens de aloxana foram de 120 a 240 mg/kg de aloxana antes do período de coinfeção. O protocolo de coinfeção seguiu com administração de prednisolona 100 mg/Kg e suspensões de *C. albicans* ATCC 90028 e *S. oralis* ATCC 35037 inoculadas via swab na cavidade oral e administradas *ad libitum* na água. O fluconazol (10 mg/kg) foi administrado a cada 12 horas. Os dados foram analisados por ANOVA *one-way* e teste de *Tukey* ($\alpha= 5\%$). Os animais diabéticos não tratados com fluconazol (DFLU) apresentaram maior invasão epitelial por hifas e hiperqueratose na língua, assim como maior quantificação de DNA de *C. albicans* ($p<0,05$). A expressão gênica de SAP6 indicou que não houve diferença significativa nos grupos avaliados ($p>0,05$). Em relação à expressão gênica de HWP1, observou-se que houve diferença entre os grupos dos animais saudáveis e os animais diabéticos ($p<0,05$). Do ponto de vista histológico, foi observada uma redução da invasão fúngica no grupo tratado com fluconazol. Dessa forma, pode-se sugerir que o diabetes aloxânico e o tratamento com fluconazol apresentam efeitos em modelo coinfeção de candidíase oral.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Aloxano.Fluconazol. Candidíase Bucal. *Streptococcus oralis*.

Introdução

O diabetes mellitus caracteriza-se pela hiperglicemia (Arneth et al., 2019). Pode ser classificada primariamente em tipo 1, devido à destruição autoimune de células β , ou tipo 2 de caráter não imune, devido à perda da capacidade adequada de secreção de insulina pelas células β , ocasionando resistência insulínica e síndrome metabólica (ElSayed et al., 2023). Dessa forma, é considerada uma das doenças crônicas mais prevalentes nos dias atuais, afetando cerca de 537 milhões de adultos entre 20-79 anos (International Diabetes Federation, 2021; Sun et al., 2022).

Recentemente, a candidíase oral tem sido associada ao diabetes mellitus (Al-Janabi et al., 2023; Martorano-Fernandes et al., 2020). Estudos prévios têm demonstrado que concentrações elevadas de glicose aumentam fatores de virulência dos biofilmes como o total de biomassa, a viabilidade celular e unidades formadoras de colônia de espécies de *Candida* (Hosida et al., 2018; Bezerra et al., 2019; Brito et al., 2021). Adicionalmente, do ponto de vista clínico, os portadores de diabetes mellitus podem apresentar redução na atividade neutrofílica, alterações salivares e um aumento de *Candida* spp. (Mussi et al., 2022).

As estimativas globais apontam que as infecções fúngicas afetam mais de 1 bilhão de pessoas por ano, incluindo 2 milhões de casos de candidíase oral (Bongomin et al., 2017). *Candida albicans* é a espécie mais associada nesses casos (Sampath et al., 2019; Pellon et al., 2020) capaz de causar infecções graves com risco de vida associado (Lopes; Lionakis 2022). É considerada como um patobionte, uma vez que adquire patogenicidade em resposta a alterações no equilíbrio ambiental que suprimem a imunidade do hospedeiro (Pellon et al., 2020).

Um dos principais fatores de virulência que está associado a *C. albicans* é a capacidade formação de biofilmes disbióticos, tanto em interações com outras espécies de *Candida* quanto em associação com estreptococos orais (Bertolini; Dongari-Bagtzoglou 2019; Morse et al., 2019 Wall et al., 2019). Dessa maneira, destaca-se a relação entre biofilmes de *C. albicans* e *Streptococcus oralis*, que tem apresentado maior virulência e patogenicidade (Koo; Andes; Krysan 2018; Martorano-Fernades et al., 2023a). Além disso, essa interação tem sido associada

a uma maior susceptibilidade para colonização comensal e à capacidade de induzir alterações durante infecções pelo fungo nas superfícies mucosas, aumentando a invasão tecidual em casos específicos (Xu et al., 2014, Xu et al., 2016, Xu et al., 2017).

Os impactos do diabetes mellitus e da candidíase oral também têm sido estudados em modelos murinos, uma vez que essas duas condições podem ser induzidas em murinos. Uma das abordagens para induzir um estado similar ao do diabetes mellitus tipo 1, envolve a administração de aloxana, que tem a capacidade de destruir as células β pancreáticas (Ighodaro et al., 2017). Também é possível avaliar a interação entre o diabetes mellitus e a candidíase oral por meio da administração de medicamentos para desenvolver imunossupressão (Sano et al., 2014; Venturini et al., 2016).

Neste cenário, tendo em vista que a mucosa oral é o local mais comum de infecção e a porta de entrada para infecções sistêmicas, é preciso considerar a utilização de medicamentos com a máxima eficácia no tratamento da candidíase oral (Fang et al., 2021). Portanto, no que concerne ao tratamento da candidíase, embora haja uma variedade de antifúngicos disponíveis, observou-se que a terapia com fluconazol se destaca por sua eficiente ação antifúngica (Fang et al., 2021).

No entanto, embora existam estudos que tenham considerado o fator diabetes em modelos de candidíase em murinos (Sano et al., 2014; Venturini et al., 2016), até o momento não foram identificadas pesquisas *in vivo* que tenham abordado o efeito do diabetes aloxânico em modelos de coinfeção envolvendo *C. albicans* e *S. oralis* e o seu tratamento com fluconazol em conjunto. Os resultados dessa interação podem ser fundamentais na compreensão fisiopatologia da candidíase oral no contexto do diabetes mellitus. O objetivo deste estudo é investigar o efeito do diabetes induzido pela aloxana e do tratamento simultâneo com fluconazol na virulência e patogenicidade da coinfeção entre *C. albicans* e *S. oralis* em um modelo experimental em ratos *Wistar*.

Materiais e Métodos

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob protocolo nº 9611061022 (ID 001826), e está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) (Anexos 1).

Microorganismos utilizados e padronização do inóculo

As cepas de referência utilizadas foram *Candida albicans* (ATCC 90028) e *Streptococcus oralis* (ATCC 35037). A concentração de células foi determinada em espectrofotômetro (LGI Scientific 0741/16, Brasil), no comprimento de onda equivalente a 600 nm. A densidade celular foi estabelecida na absorbância de $1,0 \pm 0,02$, correspondente à concentração de $6,0 \times 10^8$ UFC/mL de *C. albicans* e $2,5 \times 10^9$ UFC/mL de *S. oralis*. O inóculo foi padronizado em solução salina 0,9%.

Animais

A amostra foi composta por ratos (machos da linhagem *Wistar* – *Rattus norvegicus*) média de peso de 300g (n=24) obtidos e alocados no Biotério na Unidade de Produção de Animais – UPA vinculada ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM/UFPB). Nas duas semanas antecedentes ao início do experimento os animais passaram pelo período de aclimação, em temperatura média de $23^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo claro/escuro de 12h/12h, com acesso à água potável *ad libitum* e ração adequada. Os mesmos foram alocados em caixas de polipropileno com tampa zincada (gaiolas), cada uma contendo três animais. Todos os grupos foram submetidos à co-infecção com *C. albicans* e *S. oralis*. A amostra foi dividida em cinco grupos: grupo CTR, não-diabético, sem tratamento (n=6), grupo FLU, não-diabético, tratado com fluconazol (n=6) todos com 30 dias de idade, grupo DCTR, diabéticos, sem tratamento (n=6), grupo DFLU, diabéticos, tratados com fluconazol (n=6).

Modelo animal

Neste modelo, foi avaliado o efeito do diabetes e do tratamento com fluconazol na candidíase oral induzidos em ratos a partir da co-infecção com *C. albicans* e *S. oralis*. O protocolo foi adaptado a partir dos modelos de co-infecção (Xu et al., 2014), de indução do diabetes mellitus tipo 1 pela aloxana (Venturini et al., 2016; Ighodaro et al., 2017) e pelo tratamento com fluconazol (Cruz et al., 2018). O período experimental do estudo foi dividido em duas etapas, inicialmente foi realizado o protocolo de infecção e candidíase sem indução do diabetes mellitus, e em seguida o protocolo de infecção com o diabetes mellitus.

Dessa maneira, para os grupos CTR e FLU, inicialmente foi realizada a imunossupressão via intraperitoneal (IP) com prednisolona 100 mg/kg, dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) (Cruz et al., 2018). Esses procedimentos foram necessários para viabilizar colonização dos microrganismos (Xu et al., 2014; Xu et al., 2016). No dia seguinte, os animais foram anestesiados via intraperitoneal (IP) com cetamina:xilazina (90-100 para 10 mg/kg da massa corporal, respectivamente), no máximo 30 minutos antes da realização da coinfeção.

A coinfeção foi realizada com uma solução de 100 µL de *C. albicans* e *S. oralis* padronizada que foi semeada em toda cavidade bucal, por meio de um swab. O swab permaneceu durante duas horas embaixo da língua dos roedores (Xu et al., 2014). A prednisolona foi administrada novamente 48 h após a primeira administração para reforçar a imunossupressão dos ratos. Durante os três dias subsequentes, os animais também receberam uma solução diária de *C. albicans* e *S. oralis* na água, *ad libitum*. (Xu et al., 2014; Xu et al., 2016).

No grupo FLU, o qual recebeu o tratamento com fluconazol, foi realizada administração intraperitoneal do medicamento na dose de 10 mg/Kg, após o período de 3 horas da infecção inicial. Os grupos não-tratados com fluconazol foram submetidos à administração intraperitoneal (IP) de soro fisiológico (NaCl 0,9%). A administração de fluconazol ou soro fisiológico foi repetida a cada 12 horas. O período experimental completo totalizou 5 dias e após 72h da infecção inicial por *C. albicans* e *S. oralis*, os animais foram sacrificados por meio da eutanásia e a coleta do material para análise (Figura 1).

A indução do diabetes mellitus foi realizada nos grupos DCTR e DFLU, inicialmente foi realizada a administração intraperitoneal (IP) de 120 mg/kg de aloxana (Sigma- Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) os animais refratários, que apresentaram resistência inicial, ou seja, não apresentaram valores de glicose em

jejum de 250 mg/dL medidos no glicosímetro (Accu-check active, Roche® Diabetes Care), receberam mais uma dose de 120 mg/kg, resultando em um total de 240 mg/kg para induzir a destruição seletiva das células β pancreáticas produtoras de insulina (Lenzen 2008; Venturini et al 2016; Ighodaro et al., 2017). A hiperglicemia foi confirmada após 72 horas. Apenas ratos apresentando níveis de glicose no sangue superiores a 250 mg/dL foram incluídos no estudo e foi iniciado o mesmo protocolo para indução de candidíase oral do modelo de co-infecção de cinco dias dos grupos não-diabéticos (Figura 1).

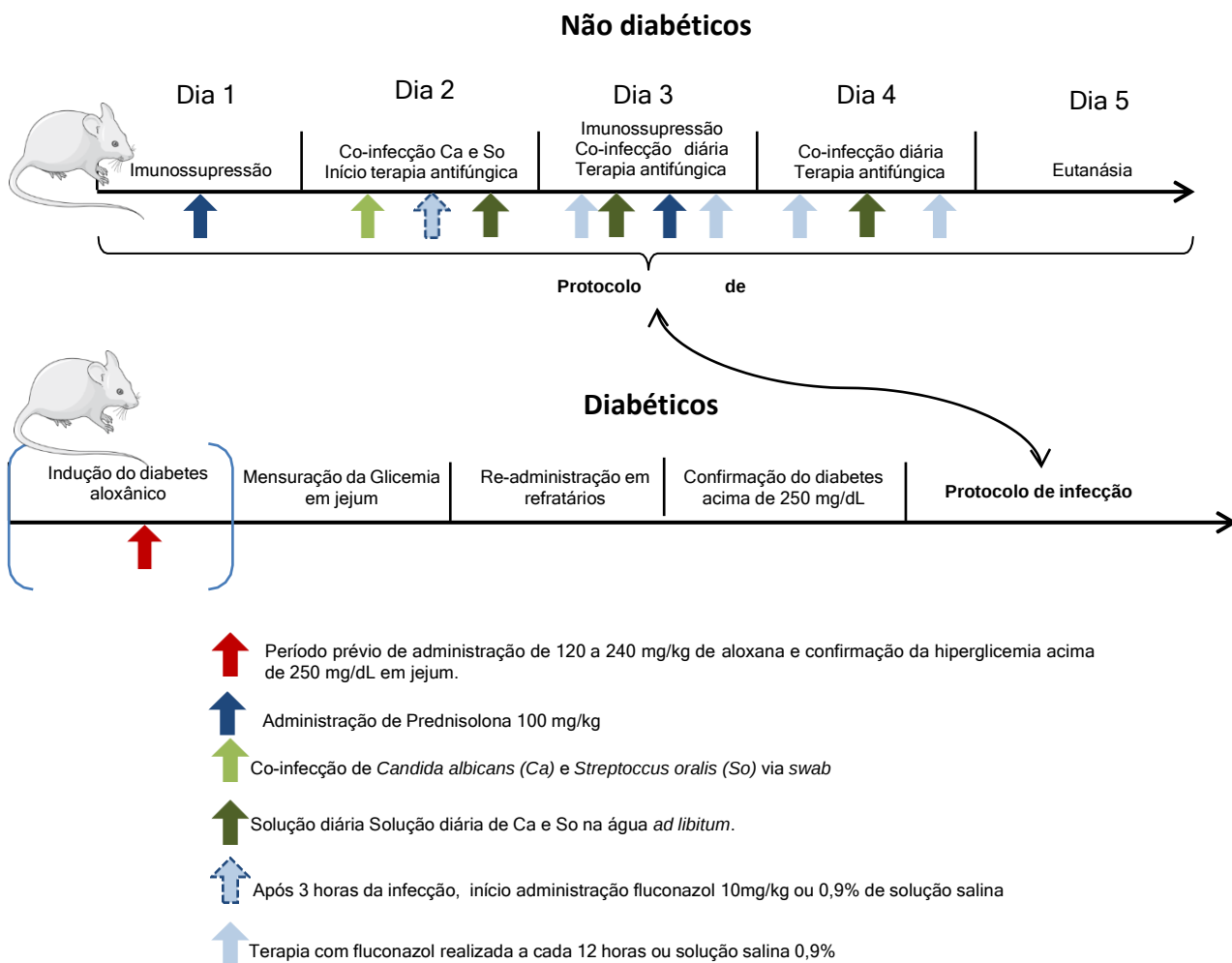


Figura 1. Esquema metodológico das etapas envolvidas no protocolo. Animais diabéticos receberam administração intraperitoneal de aloxana 120 mg/kg a 240 mg/kg. Níveis de glicose acima de 250 mg/dL foram considerados. As etapas de co-infecção para o grupo dos animais diabéticos e não diabéticos foram iguais. Os animais foram imunossuprimidos com prednisolona 100 mg/kg IP. A coinfecção de *C. albicans* e *S. oralis* foi via swab na cavidade oral. Após o período de 3 horas pós infecção, foi iniciado o protocolo de administração do fluconazol com 10mg/kg a cada 12 horas ou 0,9% nos grupos controle. Diariamente novas suspensões de *C. albicans* e *S. oralis* eram disponibilizadas *ad libitum* na água. O protocolo foi seguido até a eutanásia no último dia.

Eutanásia e exame físico dos animais

Após o término do período experimental, os animais foram eutanasiados com uma injeção de anestésicos (cetamina 225 mg/kg + xilazina 30 mg/kg), como recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA de 2018 na resolução Normativa Nº37/2018, referente a roedores e pequenos mamíferos. A eutanásia foi realizada em sala reservada, com auxílio de seringas estéreis e foi realizada em um animal por vez.

O exame físico foi realizado em sala com iluminação apropriada (foco de luz), por meio de observação direta e com auxílio de sonda exploradora e pinça Dietrich (Golgran® São Caetano do Sul, SP). Os tecidos moles foram afastados com o auxílio de pinça e cabo de bisturi (Golgran® São Caetano do Sul, SP). Foram feitas fotografias e avaliação quanto à extensão de lesões. Os tecidos coletados foram língua, palato e pâncreas. Todos os tecidos foram lavados com solução salina 0,9% após a coleta.

Processamento histológico e análise histológica em microscopia de luz

Imediatamente após a eutanásia e exame físico, em um frasco plástico com identificação da amostra correspondente, composto por 300 ml de solução fixadora foram adicionados os tecidos coletados. O agente fixador utilizado para este estudo foi o paraformaldeído tamponado 10% (PFA 10%) com pH 7,4 e molaridade 0,1Molar (0,1M) – tampão fosfato. Os frascos foram tampados, mantidos em temperatura ambiente e as amostras ficaram em solução fixadora por aproximadamente 48 horas.

Em seguida, as amostras foram adicionadas aos cassetes e incluídos em um béquer para lavagem, com tampão fosfato-salino 0,01M (PBS 1x) pH 7,4 durante três dias, com troca diária da solução. Após a lavagem, as amostras passaram por processo de desidratação em banhos de soluções com concentrações ascendentes de álcool etílico, clarificadas em tolueno, impregnadas em banhos de parafina a uma temperatura máxima de 60°C e incluídas em parafina em moldes para inclusão.

Após a etapa de inclusão, os blocos de parafina foram cortados no micrótomo. Cortes coronais de espessura 5 µm foram realizados. As lâminas selecionadas para microscopia óptica foram coradas pela técnica do Ácido

Periódico de Schiff (PAS), também coradas com Hematoxilina-eosina (HE) e visualizadas sob aumento de 10×.

Os cortes foram observados e analisados em microscópio de luz, avaliadas e fotografadas através do software KS300. Os cortes foram avaliados qualitativamente quanto à presença ou ausência de infecção e inflamação.

Extração e quantificação relativa de DNA da língua

Imediatamente após a coleta das amostras, as porções de tecidos infectados pelos biofilmes (metade da língua) foram transferidas para microtubos contendo solução de TriZol (Sigma- Aldrich Co., St Louis, MO, EUA). O DNA das amostras foi extraído e purificado utilizando protocolo descrito por Cavalcanti et al. (2015). As amostras foram solubilizadas em tampão de lise celular (Roche®), seguida por separação de ácidos nucleicos com uso de fenol:clorofórmio:isoaminoalcol (25:24:1 v/v). Em seguida, a fase aquosa foi recuperada e as amostras foram precipitadas álcool absoluto. O DNA total foi recuperado e suspenso em água para biologia molecular.

A quantificação dos microrganismos presentes nas amostras de tecido infectado foi avaliada por meio de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qPCR), conforme metodologia relatada por Cavalcanti et al. (2015). Os primers e o tamanho dos produtos da reação de PCR foram relatados previamente na literatura (Cavalcanti et al., 2015), sendo definidos a partir do código genético de referência disponível na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). O desenho e a especificidade de cada primer foram verificados utilizando-se a ferramenta primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) (Ye et al., 2012). Os primers para detecção de *C. albicans* foram os seguintes: Primer Forward: TGCTGAACGTATGCAAAAGG, Primer Reverse: TGAACAATGGATGGACCAGA.

Os ensaios de quantificação por reação em cadeia da polimerase (qPCR) foram realizados em triplicata, em placas de 96 poços, utilizando o equipamento QuantStudio 3 (AppliedBiosystems). As reações de PCR foram montadas utilizando-se 2 µL da amostra de DNA, 10 µL (×2) do SYBR Green PCR master mix, 1 µL de cada primer (5 mM), e 6 µL de água para biologia molecular. As reações foram conduzidas por meio de desnaturação inicial a 95° C por 2 min,

seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento dos primers a 60°C por 30 s e extensão dos primers por 30 s. Uma extensão final a 72°C foi realizada por 2 minutos, seguido por resfriamento a 4°C. Uma curva de dissociação (melting curve) foi utilizada para verificar a especificidade do produto amplificado. Após a reação de qPCR, o limiar de fluorescência foi ajustado conforme as curvas de amplificação do gene avaliado, sendo determinado o número de ciclos que cada amostra atingiu o limiar de fluorescência pre-definido (cycle threshold – Ct). A quantificação relativa foi realizada por meio da comparação do limiar de fluorescência (Ct) das diferentes amostras (Bustin et al., 2009). O grupo normosistêmico tratado com Fluconazol (FLU) foi utilizado como controle de referência, pois era esperado o menor quantitativo de microrganismos.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Imediatamente após a coleta das amostras, metade da língua dos animais infectados pelos biofilmes foi transferida para microtubos contendo solução TriZol (Sigma- Aldrich Co., St Louis, MO, EUA), sendo mantidos a -20°C para extração e purificação do RNA dentro de 48 h.

O RNA das amostras foi extraído e purificado utilizando o sistema High Pure RNA Tissue Kit (Roche®). Os ácidos nucleicos foram separados por fenol:clorofórmio:isoaminoalcol (25:24:1 v/v), sendo a porção aquosa transferida para microtubos com filtro de separação. O RNA total foi recuperado após tratamento com DNase I (Cavalcanti et al., 2015).

Alíquotas de 1 µg (5 µL) de RNA foram utilizadas para síntese de cDNA, utilizando-se o Kit GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (Promega, Southampton, UK). Para isso, foi utilizado 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de random primers (50 µg/mL), 1 µL de RNasin RNase inhibitor (25 U/µL), 5 µL de M-MLV reaction buffer (5×) e 1 µL de M-MLV (200 U/µL) (Promega, Southampton, UK). O volume final da reação (25 µL) foi completado com água para biologia molecular. A reação foi incubada por 70°C por 5 minutos, seguida por incubação a 37°C por 60 minutos. O cDNA resultante foi armazenado a -20°C para os ensaios quantitativos de reação em cadeia da polimerase (qPCR).

Real-time RT-qPCR

A expressão gênica de HWP1 e SAP6 nos biofilmes foi definida segundo os genes de interesse descritos no Quadro 1. Os primers e o tamanho dos produtos da reação de PCR foram definidos a partir do código genético de referência disponível na plataforma NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>). O desenho e a especificidade de cada primer foi verificada utilizando-se a ferramenta primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) (Ye et al., 2012). A especificidade dos demais primers foi confirmada após experimentos preliminares envolvendo extração de DNA.

A expressão de genes envolvidos com a virulência de *C. albicans* foi determinada pelos genes HWP1 (proteína da parede celular de hifa) e SAP6 (aspartil-proteinase secretada). O gene ACT1 (*C. albicans*) foi utilizado como referência para expressão gênica basal (*housekeeping*) (Quadro 1).

Quadro 1 – Genes de interesse listados para avaliação da expressão gênica do epitélio e dos biofilmes de *Candida*. A sequência dos primers e o tamanho dos produtos de PCR foram definidos a partir do código genético de referência (Nucleotide NCBI Genbank), utilizando-se a ferramenta primer-BLAST.

Gene de interesse	Primers	Tamanho Produto	Genebank number
ACT1 – <i>C. albicans</i> actin (<i>housekeeping</i>)	FW - TGCTGAACGTATGCAAAAGG RV - TGAACAATGGATGGACCAGA	186 bp	XM_019475182.1
HWP1 - Hyphal wall protein (<i>C. albicans</i>)	FW - TCTACTGCTCCAGCCACTGA RV - CCAGCAGGAATTGTTTCCAT	248 bp	XM_704869.2
SAP6 - Secreted Aspartyl Proteinase (<i>C. albicans</i>)	FW - TTCCAAAATGGCGTGGTGAC RV - CTGGTAGCTTCGTTGGCTTG	262 bp	XM_714012.1

Os ensaios de quantificação da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase (qPCR) foram realizados em triplicata, em placas de 48 poços, utilizando instrumento QuantStudio 3 (Applied Biosystems). As reações de PCR foram montadas utilizando-se 2 µL da amostra de cDNA, 10 µL (×2) do SYBR Green PCR master mix, 1 µL de cada primer (5 mM), e 6 µL de água para biologia molecular. As reações foram conduzidas por meio de desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento dos primers a 60°C por 30 s e extensão dos primers por 30 s. Uma extensão final a 72°C foi realizada por 2 minutos, seguido por resfriamento a 4°C. Uma curva de dissociação (melting curve) foi utilizada para verificar a especificidade do produto amplificado.

Após a reação de qPCR, o limiar de fluorescência foi ajustado conforme as curvas de amplificação dos genes avaliados. A comparação entre os grupos foi baseada no número total de ciclos no qual os genes alvo e de referência atingiram o mesmo limiar de fluorescência (Ct). A expressão gênica relativa foi determinada pelo cálculo do $\Delta\Delta Ct$ (Livak; Schmittgen, 2001; Bustin et al., 2009).

Análise estatística

Os dados foram analisados por estatística inferencial no software Jamovi (The Jamovi Project, Version 2.3), no qual foram avaliadas hipóteses de diferença, considerando o nível de significância de 5% e o poder estatístico de 80%. Foi aplicado o teste ANOVA *one-way*/teste de Tukey e atribuída uma significância de 5%. A avaliação da macroscópica e dos cortes histológicos foi realizada de maneira qualitativa.

Resultados

Ao final do período experimental, houve um total de quatro perdas. Um dos animais do grupo de saudáveis não tratados com fluconazol (CTR) e outros três do grupo diabéticos não tratados com fluconazol (DCTR). Os demais animais sobreviveram até o final do período experimental.

As imagens representativas das línguas dos ratos após o experimento estão apresentadas na figura 2. Ao exame macroscópico, observaram-se áreas de lesões eritematosas nos grupos infectados e sem tratamento (Figs. 2A e 2C). O grupo diabético e tratado com salina apresentou lesões com padrão esbranquiçado e aspecto bolhoso (Fig. 2C). Os grupos infectados e tratados com fluconazol apresentaram pequenas e discretas áreas eritematosas (Figs. 2B e 2D).

Nos cortes histológicos do pâncreas, é possível observar que nos grupos em que não houve indução do diabetes aloxânico, as ilhotas de langerhans apresentaram-se em condições de normalidade (Figura 3 A, B e E). Nos demais cortes observa-se a ausência destas estruturas (Figura 3 C e D).

Nas figuras representativas do palato em HE, os o epitélio dos grupos não-diabéticos não apresentaram alterações na derme (Figura 4 A, B e E). No grupo diabético não tratado com fluconazol (DCTR), houve redução da espessura do

epitélio e presença de úlcera e presença de vasos dilatados (Figura 4 C). No grupo DFLU, destaca-se atrofia da epiderme (Figura 4D). Já nos cortes do palato em PAS, não há presença de estruturas fúngicas em nenhum dos grupos (Figura 5).

Em relação aos cortes histológicos da língua em HE, o grupo DCTR apresentou alterações em relação aos demais grupos (Figura 6 C), pois nele podemos observar atrofia papilar acompanhada de hiperqueratose além de apresentar musculatura irregular e redução da lâmina própria. Os demais grupos apresentaram epitélio homogêneo e área muscular contínua (Figura 6A, B, D e E). Nas imagens da língua coradas com PAS observam-se mais estruturas fúngicas nos grupos diabéticos DCTR e DFLU (Figura 7 C e D) quando comparada aos demais grupos (Figura 7 A, B e E).

A análise de quantificação de DNA de *C. albicans* nas línguas dos animais foi realizada nos grupos FLU, CTR, DFLU e DCTR. Os resultados indicaram que houve diferença entre o grupo DCTR e os demais ($p<0,05$), entretanto os demais grupos não apresentaram diferenças entre si ($p>0,05$) (Figura 8). A expressão gênica de SAP6 indicou que não houve diferença significativa entre os grupos FLU, CTR, DFLU e DCTR ($p>0,05$) (Figura 9). Já em relação à análise da expressão gênica de HWP1, houve diferença entre os grupos dos animais saudáveis e os animais diabéticos ($p<0,05$) (Figura 10).

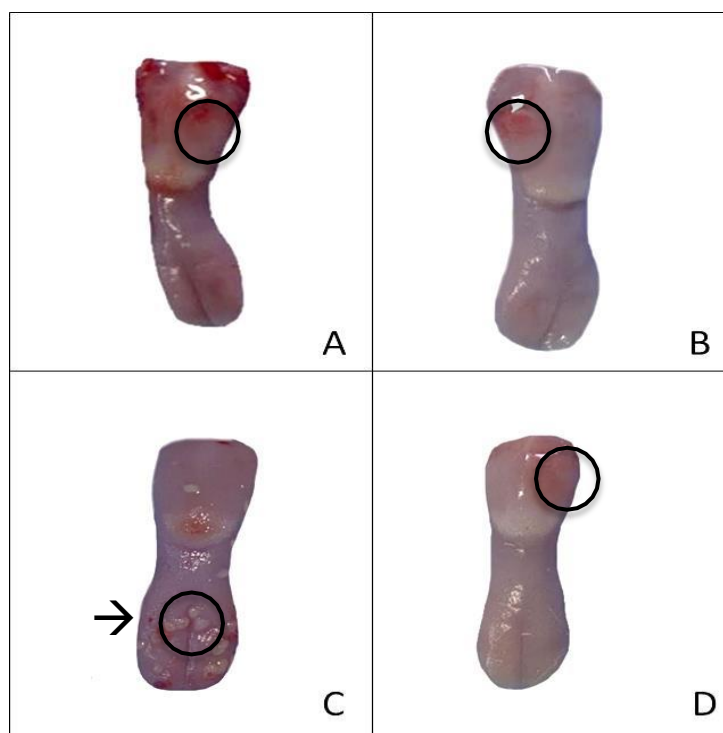


Figura 2. Imagens representativas dos grupos em estudo. A: Grupo não-diabético infectado e tratado com salina (CTR); B: Grupo não-diabético infectado e tratado com fluconazol (FLU); C: Grupo diabético infectado e tratado com salina (D-CTR); D: Grupo diabético infectado e tratado com fluconazol (D-FLU). Grupos infectados e tratados com salina apresentaram várias regiões eritematosas (*), sendo observadas ainda formações bolhosas no grupo diabético e tratado com salina(→). Observa-se que grupos infectados e tratados com fluconazol apresentaram pequenas áreas de lesão eritematosa e atrofia papilar (B e D).

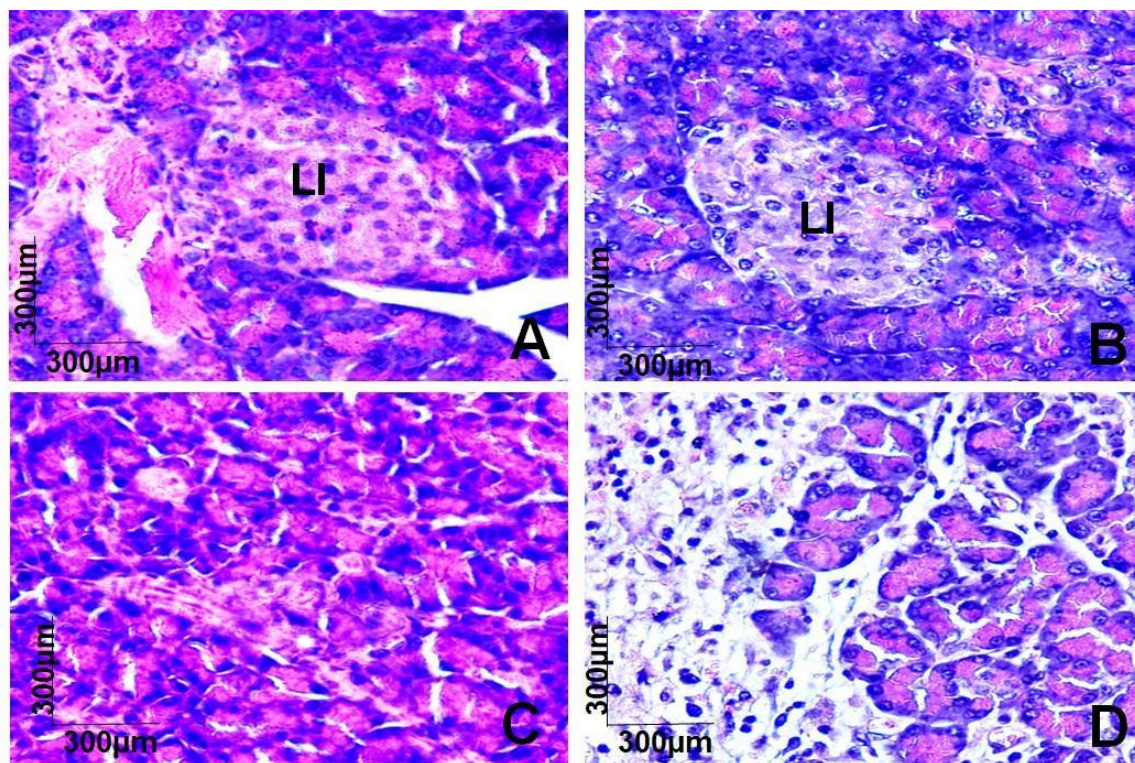


Figura 3. Corte histológico de pâncreas corado em HE, representativo das diversas condições experimentais analisadas. Nos animais experimentais do grupo CTR (A), FLU (B) observa-se ácinos revestidos por células secretoras e ao centro as ilhotas de langerhans (LI). Já nos grupos DTCCR(C) e FLU (D) essa estrutura encontra-se ausente.

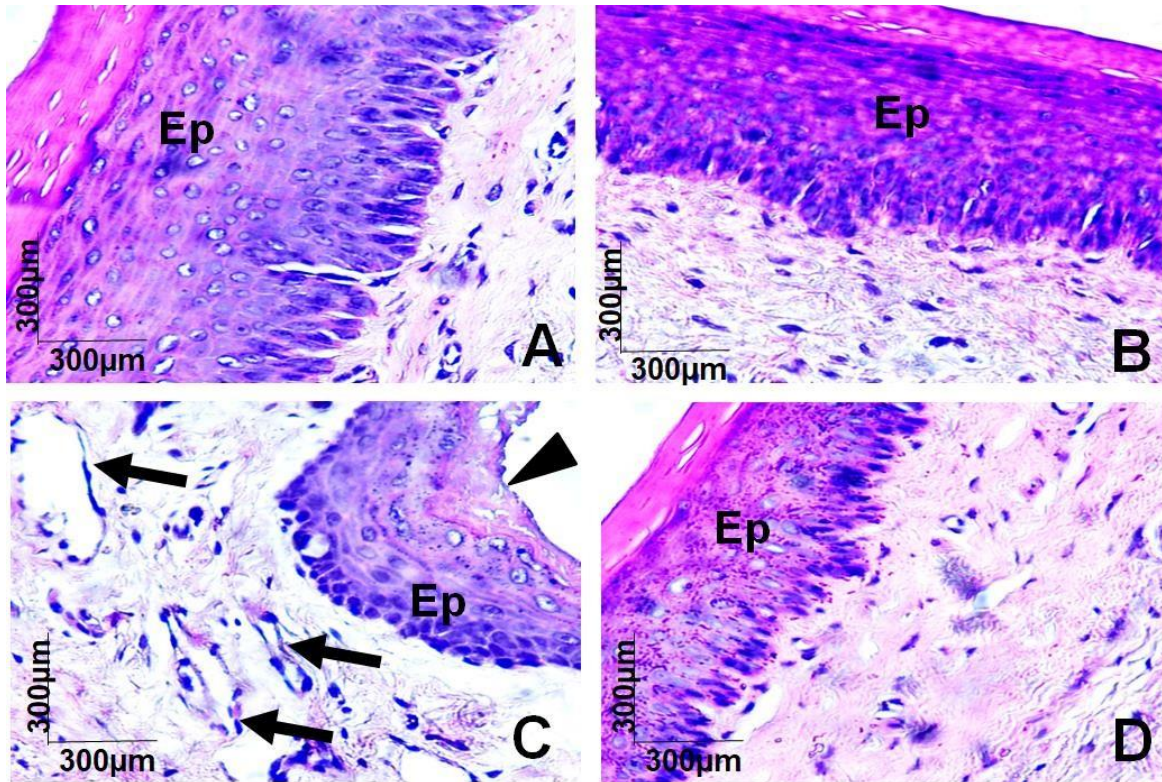


Figura 4. Corte histológico de palato, corado em HE, representativo das diversas condições experimentais analisadas. Nos animais experimentais do grupo CTR (A) ou FLU (B), observa-se epitélio de revestimento composto por queratinócitos dispostos em conjunto formando blocos homogêneos (Ep), sem alteração da derme. No grupo DTCR(C), observa-se presença de úlcera (cabeça da seta), e consequente redução da espessura do epitélio de revestimento (Ep)., da mesma forma a derme apresenta-se responsiva pela presença de vasos dilatados (seta) e conjuntivo ligeiramente mais frouxo. Já DFLU, observa-se atrofia da epiderme(D).

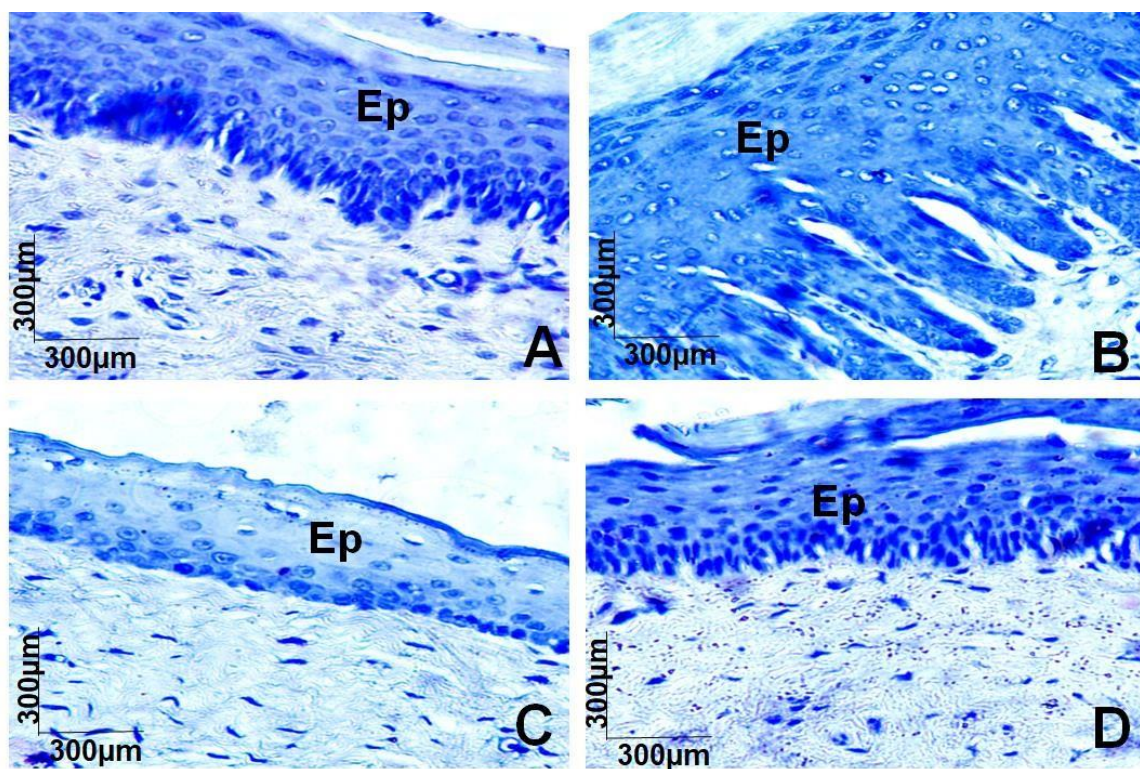


Figura 5. Corte histológico de palato, corado pelo Ácido Periódico de Schiff - PAS, representativo das diversas condições experimentais analisadas. Nos animais experimentais representativos de todos os grupos CTR (A), FLU (B), DCTR (C) ou DFLU (D), não há estruturas fúngicas evidenciadas pelo corante utilizado.

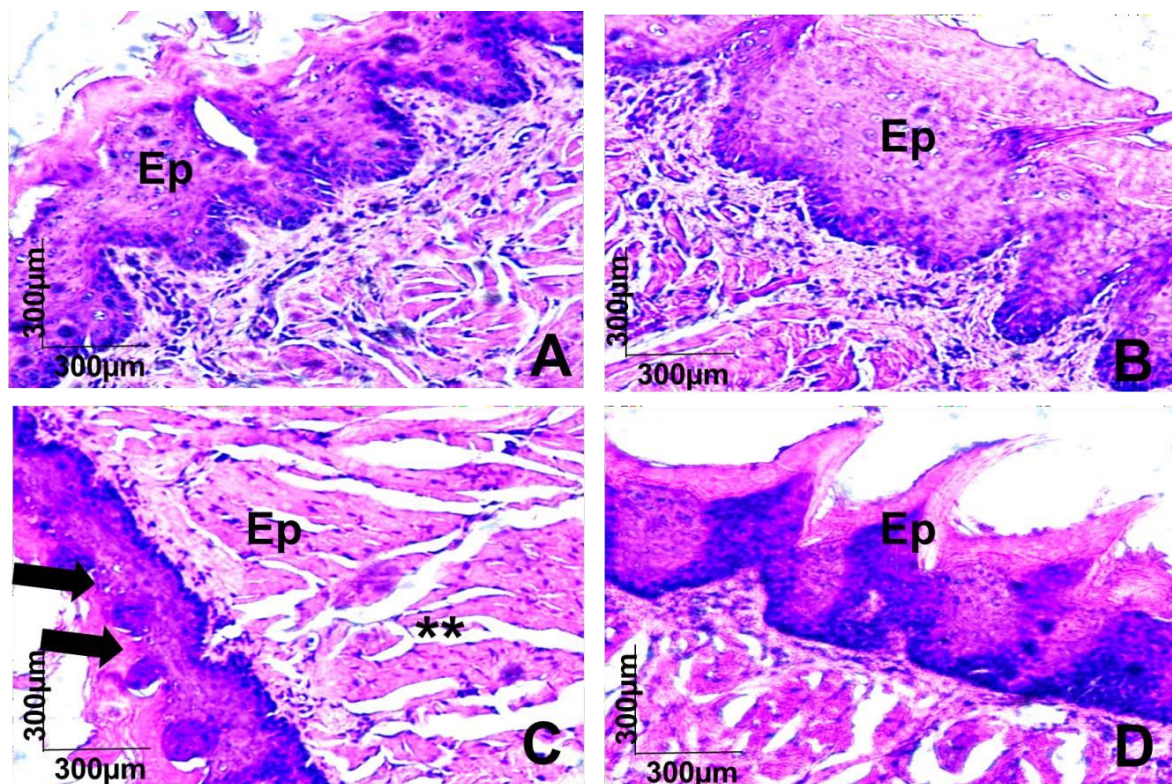


Figura 6. Corte histológico da língua, corado em HE, representativo das diversas condições experimentais analisadas. Nos animais experimentais do grupo CTR (A), FLU (B) e DFLU (D), observa-se epitélio de revestimento composto por queratinócitos dispostos em conjunto formando blocos homogêneos (Ep), sem alteração da muscular. Já nos animais representativos do grupo DCTR (C), observa-se atrofia e hiperqueratose com consequente redução da área papilar. Ademais, observa-se ainda musculatura irregular formando espaços ou fendas, com redução da lâmina própria (**).

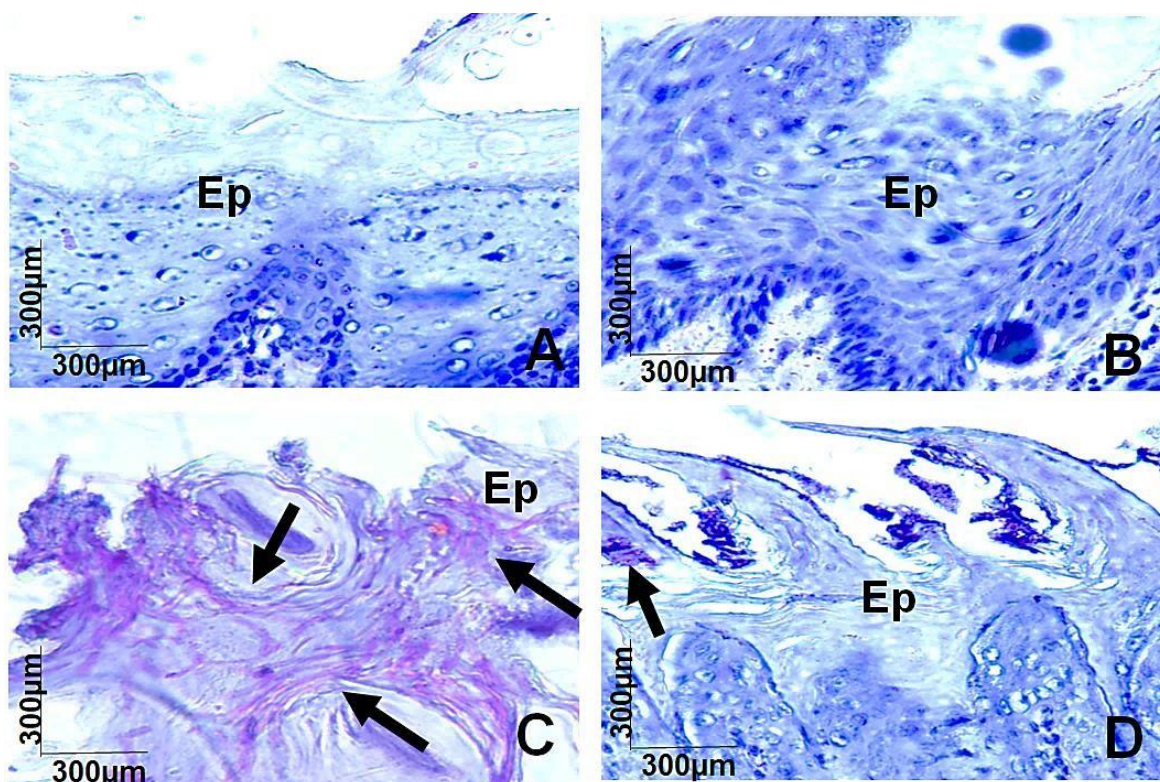


Figura 7. Corte histológico de língua, corado pelo Ácido Periódico de Schiff - PAS, representativo das diversas condições experimentais analisadas. Nos animais experimentais representativos de todos os grupos CTR (A), FLU (B), observa-se ausência de estruturas fúngicas evidenciadas pelo corante utilizado. Nos animais do grupo DCTR (C), observa-se múltiplas e multifocais estruturas filiformes de cor púrpura (bonina +) na epiderme (Ep), compatíveis com estruturas de hifas ou pseudohifas de candida (setas). Já nos animais do grupo DFLU(D), observa-se discretas e focais estruturas filiformes de cor púrpura (bonina +) na epiderme (Ep), compatíveis com estruturas de *Candida* (setas).

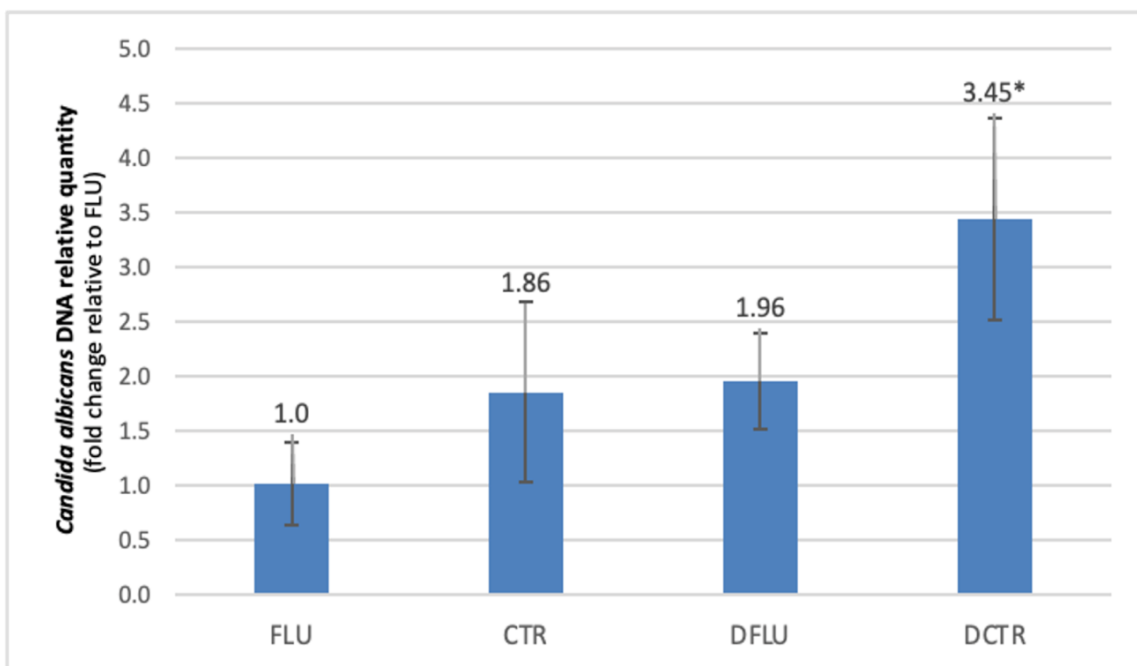


Figura 8. Quantificação do DNA em amostras de línguas de ratos *Wistar*. Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrão (Média±DP). Diferenças estaticamente significantes indicada por (*) (ANOVA one-way/Tukey, $p < 0,05$).

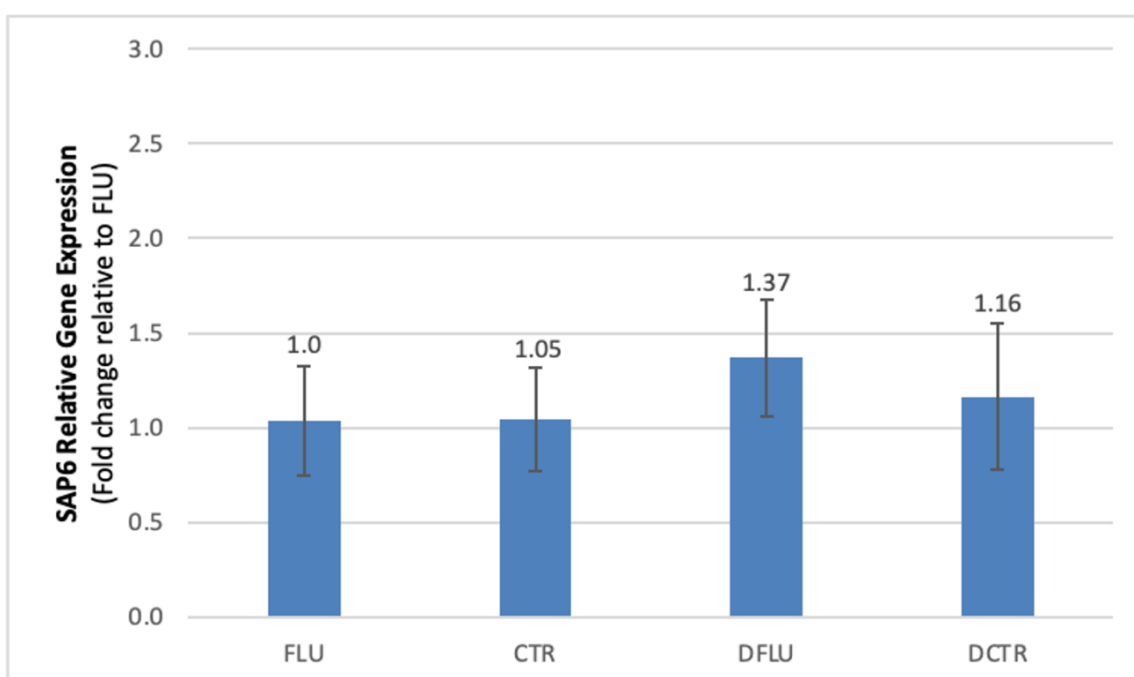


Figura 9. Resultados da RT-qPCR para expressão do gene SAP6 em amostras de línguas de ratos *Wistar*. Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrão (Média±DP).

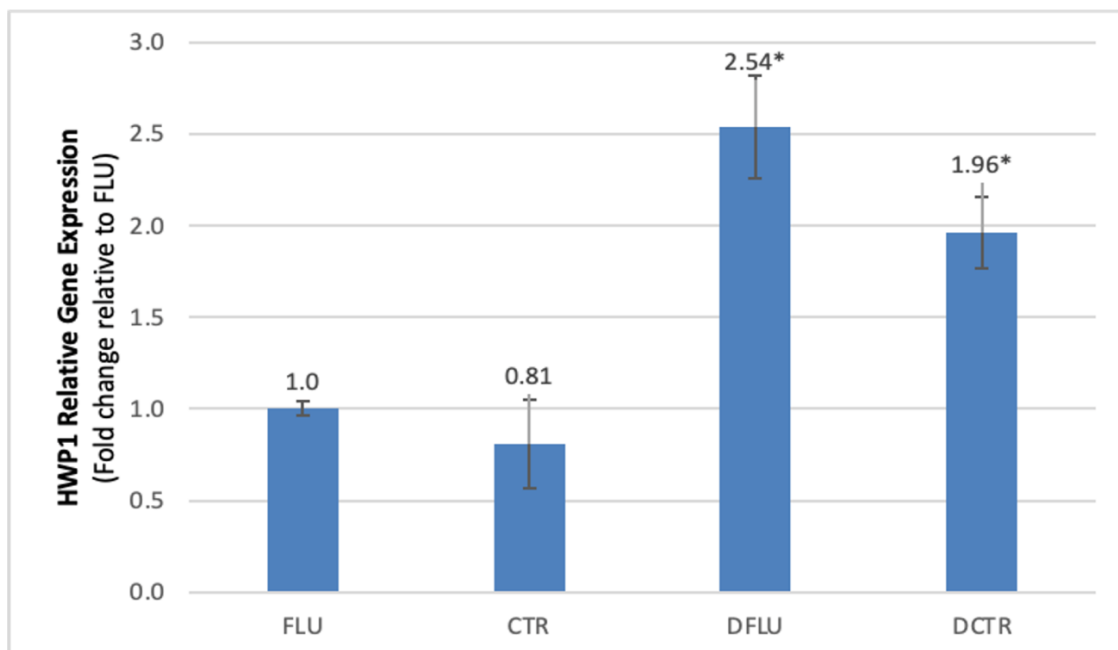


Figura 10. Resultados da RT-qPCR para expressão do gene HWP1 em amostras de línguas de ratos *Wistar*. Colunas representam médias e barras de erro representam desvios-padrão (Média±DP). Diferenças estaticamente significantes indicada por (*) (ANOVA one-way/Tukey, $p < 0,05$).

Discussão

O presente estudo avaliou o efeito do diabetes aloxânico e do tratamento com fluconazol na virulência e patogenicidade da coinfeção com *C. albicans* e *S. oralis* em ratos *Wistar*. A partir de busca na literatura, não foram encontrados estudos que observaram estas variáveis em conjunto. Dessa maneira, o protocolo utilizado foi adaptado de estudos previamente publicados (Xu et al., 2014, Sano et al., 2014, Venturini et al., 2016; Cruz et al., 2018).

Dentre os principais achados, destaca-se que o grupo dos animais diabéticos não tratados com fluconazol apresentou maior invasão epitelial por hifas, maior quantificação de DNA de *C. albicans*, assim como também apresentou maior expressão gênica de HWP1 no tecido da língua. Ao considerar que hiperglicemia causada pela destruição das células β -pancreáticas gera diferentes alterações sistêmicas (Venturini et al., 2016; Ighodaro et al., 2017), no presente estudo estas mudanças foram capazes de provocar lesões mais severas pela candidíase na língua durante o período experimental.

Em relação às alterações morfológicas na língua, o diabetes mellitus causa alterações epiteliais diferentes quanto maior a colonização por *Candida* e presença hifas na estrutura papilar e epitelial (Ortug et al., 2018). A infecção por

espécie de *Candida* geralmente induz alterações morfológicas atróficas da mucosa língua, especialmente nas papilas, glossite romboide mediana e lesões esbranquiçadas (Costa et al., 2013; Ortug et al., 2018). Nos cortes histológicos pode ser observada a presença de estruturas fúngicas indicativas de hifas e pseudo-hifas e a visualização das áreas de hiperplasia epitelial, desorganização da camada de células basais, perda de papilas filiformes e hiperqueratose (Costa et al., 2013). Estas alterações foram identificadas e comparadas entre os diferentes grupos avaliados.

Os ratos diabéticos também apresentaram alterações no palato, indicando que a condição de hiperglicemia gerada pelo diabetes aloxânico gerou redução da epiderme, também causou úlceras e alterações nas espessuras dos vasos sanguíneos. Apesar de não haver colonização microbiana no palato, este achado pode estar relacionado ao fato da necessidade de adaptação de um dispositivo que simulasse a superfície protética de resina acrílica para induzir lesões mais severas nessa região, como já foi descrito em análise prévia (Sakima et al., 2022).

É possível destacar que o protocolo adotado de indução do diabetes por meio da aloxana foi verificado a partir da destruição as células β nas ilhotas de Langerhans do pâncreas e consequentemente, causando um estado de hiperglicemia similar ao do diabetes mellitus tipo 1 (Lenzen 2008; Ighodaro et al., 2017). As dosagens variaram entre 120 mg/kg e 240 mg/kg, pois recomenda-se que as dosagens devem ser de acordo com o peso dos animais e inicialmente nem todos os animais desenvolvem o diabetes, então por vezes é necessário repetir a dose inicial para o efeito desejado (Ighodaro et al., 2017).

A literatura já havia reportado a referida possibilidade, pois a aloxana apresenta instabilidade e pode apresentar resistência de acordo com o peso dos animais (Lenzen 2008; Ighodaro et al., 2017). Também foi observado que não há uma padronização da dose mais recomendada, pois a mesma pode variar de acordo com a via de administração idade e peso dos animais (Ighodaro et al., 2017). Por outro lado, a aloxana apresenta relativa taxa de mortalidade, o que deve ser considerado em cálculos amostrais e também deve ser realizada a manutenção dos sintomas nas primeiras 72 horas (Lenzen 2008; Ighodaro et al., 2017).

Os resultados apontam que o tratamento com fluconazol nesses grupos foi capaz de reduzir as lesões da candidíase na língua dos animais diabéticos. Já foi

reportado previamente a capacidade de fluconazol de reduzir a invasão por *Candida* spp. (Garipov et al., 2017). Os mecanismos associados podem ser por meio de sua atuação na membrana celular fúngica, atuando sobre Erg11p/Cyp51 inibindo a síntese ergosterol, acumulando esteróis tóxicos nas membranas celulares dos fungos, como 14 α metilergosta-8,24(28) dienol e aumentando os níveis espécies reativas de oxigênio (ROS) endógenos que inibem crescimento fúngico (Cruz et al., 2018; Fang et al., 2021; Lopes, Lionakis 2022).

A dose escolhida de Fluconazol no modelo apresentado foi baseada em estudo prévio, porém foi observado que também não há um padrão específico para esta dose (Zhou et al., 2018; Cruz et al., 2018; Fang et al., 2021), o que se configura como um desafio de padronização. O fluconazol pode causar um desequilíbrio na microbiota em altas concentrações e atuar como um estressor microbiano o que futuramente pode estar associado a um aumento da formação de biofilme e respostas que induzem fenótipos resistentes em bactérias (Dornelas et al., 2023).

Dessa forma, outro desafio é a possibilidade de prever quais fatores podem interferir nesta dose, ainda mais ao considerar que em condições clínicas há presença de diferentes microrganismos e variáveis relacionadas ao peso, idade e susceptibilidade do animal utilizado. Nesse contexto, é recomendada a realização de mais estudos que avaliem as vias em que podem ocorrer tais alterações em delineamentos similares ao apresentado nesta pesquisa.

Em relação à coinfeção propriamente dita, a quantificação relativa do DNA de *C. albicans* nos grupos indicou que houve contato desse microrganismo na língua de todos os grupos experimentais. Porém, ao comparar os resultados da biologia molecular com os achados histológicos da língua, nos grupos não diabéticos não foi observada a invasão epitelial fúngica, apesar de alguns artefatos observados. Este achado pode indicar apenas uma colonização superficial em que possa ter ocorrido o contato do microrganismo tanto na infecção inicial quanto nos dias seguintes pela disponibilidade de microrganismos na água *ad libitum*.

Dessa forma, podemos sugerir que devido a condições sistêmicas dos ratos não-diabéticos não foi suficiente para haver invasão epitelial expressiva durante o período experimental considerado. A presença de lesões macroscópicas que podem ser atribuídas a outros fatores como

imunossupressão, contato da colonização superficial pela *C. albicans* ou o próprio estresse do período experimental. No entanto, o contrário foi observado nos grupos diabéticos, pois todos apresentaram invasão epitelial e com identificação de DNA fúngico, sendo o grupo diabético não tratado com fluconazol o mais infectado e com diferenças significativas.

A investigação da presença de genes supostamente específicos na proliferação de hifas e adesão a substratos (HWP1) (Alves et al., 2014; Lopes, Lionakis 2022) e aspartil proteinases (SAP6) relacionadas a invasão tecidual e transição levedura-epitélio (Naglik et al., 2003; Lopes, Lionakis, 2022) também são importantes para a compreensão de fatores de virulência da *C. albicans*. Para HWP1, os grupos diabéticos apresentaram maior regulação desses genes, o que indica uma maior transição e invasão epitelial, quando comparada aos demais grupos (Lopes, Lionakis 2022; Martorano-Fernandes et al., 2023b).

Por outro lado, a SAP6, por apresentar um papel de proteína multifuncional, pode atuar como uma adesina e uma proteinase durante infecção (Kumar et al., 2015). Não foi possível observar diferenças significativa em relação ao SAP6, o que pode estar relacionado a um *feedback* negativo, inibição da virulência desse gene, sendo o período insuficiente para sua detecção ou diferenças locais que possam ter interferido na patogenicidade do biofilme (Kumar et al., 2015; Maia et al., 2021), apesar da sua expressão em todos os grupos.

Vale destacar que além dos fatores relacionados à indução do diabetes e a terapia com fluconazol, neste estudo foi avaliada principalmente a candidíase oral na presença do modelo de co-infecção com *S. oralis*, que também tem sido tópico de discussão na literatura (Xu et al., 2014; Bertolini et al., 2021). Estudos publicados sugerem que nas interações entre bactérias e fungos, além da necessidade do contato físico entre as células, também há a presença de metabólitos liberados que podem mediar às respostas e fatores de virulência (Martorano Fernades, 2023a; Glazier 2022, Mukherjee & Bassler 2019; Pereira et al., 2021).

Dessa maneira, os metabólitos podem tanto regular um aumento ou inibição de fatores virulência. Por exemplo, moléculas do *quorum sensing* (Valle-Arevalo & Nobile, 2020), podem até mesmo inibir a formação de hifas, dependendo das condições ambientais como os níveis de dióxido de carbono, expressão gênica, potencial hidrogeniônico e presença ou ausência de glicose

(Cavalcanti et al., 2015; Jarosz et al., 2009; Bachtiar et al., 2014; Morales & Hogan 2010; Gow et al., 2011; Lu et al., 2013; Buu & Chen 2014, Dos Santos et al., 2020). No presente estudo, há possibilidade de que as diferenças entre os grupos também estejam relacionadas à decorrência de diferenças ambientais.

Moléculas como peptídeo estimulador de competência e as moléculas de sinalização de ácidos graxos trans-2- Ácido Decenóico (SDSF) secretadas por estreptococos orais (Jarosz et al., 2009; Vilchez et al., 2010; Bachtiar et al., 2014; Dos Santos et al., 2020) podem desempenhar um papel fundamental na compreensão da mecanismos moleculares envolvidos na redução dos virulência de biofilmes multiespécies, como a supressão da formação de hifas já descrita em estudos anteriores (Dos Santos et al., 2020).

Todavia, estudos recentes destacam que *S. oralis* apresenta capacidade de induzir a formação de biofilmes mais robustos e até mesmo mais invasivos (Cavalcanti et al., 2015; Xu et al., 2017; Koo; Andes;Krysan, 2018; Souza et al., 2020a). Nesse contexto, sugere-se que os mecanismos envolvidos na coinfeção de *S. oralis* e *C. albicans* podem apresentar um efeito antagonista ou de aumento da virulência a depender da liberação de moléculas do *quorum sensing* (Cavalcanti et al., 2015; Martorano-Fernandes et al., 2023a;Martorano-Fernandes et al., 2023b) e de condições microambientais.

Dentre as limitações identificadas no presente estudo, destacamos que não foram avaliados fatores relacionados ao hospedeiro, como níveis de creatinina e cetoacidose (Venturini et al., 2016) e expressão gênica da resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e degradação de *E*-caderinas (Cavalcanti et al., 2015; Venturini et al., 2016; Xu et al., 2016; Maia et al., 2021), se houver, pois nos resultados obtidos não houve presença de infiltrado inflamatório nas áreas observadas nos cortes histológicos. Além disso, também não foram observados fatores de virulência específicos da do *S. oralis* como a produção de matriz extracelular e expressão de glucosiltransferases (Xu et al., 2016, Souza et al., 2020b). Tais desafios são sugestões para próximos estudos.

Entretanto destacamos que o diferencial desse estudo é que demonstramos pela primeira vez *in vivo* que a presença do diabetes aloxânico foi capaz de provocar maior patogenicidade no biofilme de *C. albicans* e *S. oralis*, assim como a terapia com fluconazol foi capaz de reduzir as alterações observadas nos ratos diabéticos. De acordo com estes achados, ressalta-se a

importância de considerar as condições sistêmicas e ambientais do hospedeiro para o tratamento da candidíase oral.

Financiamento

Pró-reitoria de pesquisa PROPESQ/PRPG/UFPB pelo apoio financeiro, processo nº 23047.025768/2021-15.

Agradecimento

Ao Núcleo de Medicina Tropical (Numetrop) e ao do Laboratório de Imunopatologia Experimental (LABIPEX).

Referências

Al-Janabi AAHS. 2023A Positive or Negative Connection of Diabetes Mellitus to the Oral Microbiota. Eurasian J Med. Feb;55(1):83-89.

Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J, Henriques M, Williams DW. 2014. *Candida albicans* promotes invasion and colonization of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. J Infect. 69:396-407.

Arneth B, Arneth R, Shams M. 2019 .Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. Int J Mol Sci. May 18;20(10):2467.

Bachtiar EW, Bachtiar BM, Jarosz LM, Amir LR, Sunarto H, Ganin H, Meijler MM, Krom BP. 2014. AI-2 of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* inhibits *Candida albicans* biofilm formation. Front Cell Infect Microbiol. 4:94.

Bertolini M, Dongari-Bagtzoglou A. 2019.The Relationship of *Candida albicans* with the Oral Bacterial Microbiome in Health and Disease. Adv Exp Med Biol. 1197:69-78.

Bertolini M, Vazquez Munoz R, Archambault L, Shah S, Souza JGS, Costa RC, Thompson A, Zhou Y, Sobue T, Dongari-Bagtzoglou A. 2021.Mucosal Bacteria Modulate *Candida albicans* Virulence in Oropharyngeal Candidiasis. mBio. Aug 31;12(4):e0193721.

Bezerra NVF, Brito ACM, de Medeiros MMD, de Franca Leite KL, Bezerra IM, de Almeida LFD, Aires CP, Cavalcanti YW. 2019. Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. J Investig Clin Dent. 10:e12412.

Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. 2017. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 2017 Oct 18;3(4):57.

Brito ACM, Bezerra IM, Borges MHS, Cavalcanti YW, Almeida LFD. 2021. Effect of different salivary glucose concentrations on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *Biofouling*. Jul;37(6):615-625.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. Apr;55(4):611-22.

Buu LM, Chen YC. 2014. Impact of glucose levels on expression of hypha-associated secreted aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *J Biomed Sci*. 21:22.

Cavalcanti YW, Morse DJ, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson M, Milward P, Lewis M, Bradshaw D, Williams DW. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*. 2015;31(1):27-38

Costa AC, Pereira CA, Junqueira JC, Jorge AO. 2013 Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis. *Virulence*. Jul 1;4(5):391-9.

Cruz LIB, Lopes LFF, de Camargo Ribeiro F, de Sá NP, Lino CI, Tharmalingam N, de Oliveira RB, Rosa CA, Mylonakis E, Fuchs BB, Johann S. Anti-*Candida albicans* Activity of Thiazolylhydrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models. *J Fungi (Basel)*. 2018 Dec 12;4(4):134.

Dornelas-Figueira LM, Ricomini Filho AP, Junges R, Åmdal HA, Cury AADB, Petersen FC. 2023. *In Vitro* Impact of Fluconazole on Oral Microbial Communities, Bacterial Growth, and Biofilm Formation. *Antibiotics (Basel)*. 12(9):1433.

Dos Santos, J. D., Fugisaki, L., Medina, R. P., Scorzoni, L., Alves, M. S., de Barros, P. P., Ribeiro, F. C., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Silva, D., & Junqueira, J. C. 2020. *Streptococcus mutans* secreted products inhibit candida albicans induced oral candidiasis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1605.

ElSayed NA et al. on behalf of the American Diabetes Association. 2023 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care*. Jan 1;46(Suppl 1):S19-S40.

Fang J, Huang B, Ding Z. 2021 Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *J Prosthet Dent*. Feb;125(2):257-265.

Garipov, M.R.; Pavelyev, R.S.; Lisovskaya, S.A.; Nikitina, E.V.; Kayumov, A.R.; Sabirova, A.E.; Bondar, O.V.; Malanyeva, A.G.; Aimaletdinov, A.M.; Iksanova, A.G.; et al. 2017. Fluconazole-Pyridoxine Bis-Triazolium Compounds with Potent Activity against Pathogenic Bacteria and Fungi Including Their Biofilm-Embedded Forms. *J. Chem.* 4761650.

Glazier, V. E. 2022. EFG1, Everyone's favorite gene in *Candida albicans*: A comprehensive literature review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, Article 855229.

Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. 2011. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 10:112-122

Hosida TY, Cavazana TP, Henriques M, Pessan JP, Delbem ACB, Monteiro DR. 2018. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. *Mycoses*. 61:270-278

IDF DIABETES ATLAS. 2021 10th edn. Belgium: International Diabetes Federation; [accessed 2023 Oct 02]. <https://diabetesatlas.org/>

Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. 2017. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina (Kaunas)*. 53(6):365-374.

Jarosz LM, Deng DM, Van Der Mei HC, Crielaard W, Krom BP. 2009. *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryot Cell*. 8(11):1658-64.

Koo H, Andes DR, Krysan DJ. *Candida*-streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog*. 2018 Dec 13;14(12):e1007342.

Kumar R, Saraswat D, Tati S, Edgerton M. 2015. Novel Aggregation Properties of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase Sap6 Mediate Virulence in Oral Candidiasis. *Infect Immun*. Jul;83(7):2614-26.

Lenzen S. 2008 The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2):216-26.

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25, 402-408 .

Lopes JP, Lionakis MS. 2022. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. Dec;13(1):89-121.

Lu Y, Su C, Solis NV, Filler SG, Liu H. 2013. Synergistic regulation of hyphal elongation by hypoxia, CO₂, and nutrient conditions controls the virulence of *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 14:499-509.

Maia CMA, Pasetto S, Nonaka CFW, Costa EMMB, Murata RM. 2021. Yeast-Host Interactions: *Anadenanthera colubrina* Modulates Virulence Factors of *C. albicans* and Inflammatory Response *In Vitro*. *Front Pharmacol*. Jun 8;12:629778

Martorano-Fernandes L, Dornelas-Figueira LM, Marcello-Machado RM, Silva RB, Magno MB, Maia LC, Del Bel Cury AA. 2020. Oral candidiasis and denture

stomatitis in diabetic patients: Systematic review and meta-analysis. Braz Oral Res. Sep 21;34:e113.

Martorano-Fernandes L, Ricomini-Filho AP, Del Bel Cury AA. 2023a. Does *Streptococcus oralis* supernatant influence on the proliferation and virulence of *Candida albicans*? Arch Oral Biol. Oct;154:105763

Martorano-Fernandes L, Goodwine JS, Ricomini-Filho AP, Nobile CJ, Del Bel Cury AA. 2023b. *Candida albicans* Adhesins Als1 and Hwp1 Modulate Interactions with *Streptococcus mutans*. Microorganisms. May 25;11(6):139

Morales DK, Hogan DA. 2010. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. PLoS Pathog. 6:e1000886.

Morse DJ, Wilson MJ, Wei X, Bradshaw DJ, Lewis MAO, Williams DW. 2019. Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria. Lett Appl Microbiol. Apr;68(4):337-343. doi:

Mukherjee, S., & Bassler, B. L. 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Nature Reviews Microbiology, 17(6), 371-382.

Mussi MCM, Fernandes KS, Gallottini MHC. 2022. A call for further research on the relation between type 2 diabetes and oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. Aug;134(2):206-212.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 67:400-428.

Ortug G, Ignak S, Ortug A. 2018. Characteristics of lingual papillae in diabetic rats. Morphologie. 102(339):250-254.

Pellon A, Sadeghi Nasab SD, Moyes DL. 2020. New Insights in *Candida albicans* Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. Front Cell Infect Microbiol. Mar 3;10:81

Pereira, R., Dos Santos Fontenelle, R. O., de Brito, E. H. S., & de Moraes, S. M. 2021. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. Journal of Applied Microbiology, 131(1), 11-22

Sakima VT, Vega-Chacón Y, Cerri PS, Shokeen B, Lux R, Mima EGO. 2022. A Denture Use Model Associated with *Candida* spp. in Immunocompetent Male and Female Rats. J Fungi (Basel). Apr 30;8(5):466.

Sampath A, Weerasekera M, Dilhari A, et al., 2019. Type 2 diabetes mellitus and oral *Candida* colonization: analysis of risk factors in a Sri Lankan cohort. ACTA Odontol Scand. 77(7):508-516.

Sano T, Ozaki K, Terayama Y, Kodama Y, Matsuura T. A novel diabetic murine model of *Candida albicans*-induced mucosal inflammation and proliferation. J Diabetes Res. 2014;2014:509325.

Souza JGS, Bertolini M, Thompson A, Barão VAR, Dongari-Bagtzoglou A. 2020a. Biofilm Interactions of *Candida albicans* and Mitis Group *Streptococci* in a Titanium-Mucosal Interface Model. *Appl Environ Microbiol.* 17;86(9):e02950-19.

Souza JGS, Bertolini M, Thompson A, Mansfield JM, Grassmann AA, Maas K, Caimano MJ, Barao VAR, Vickerman MM, Dongari-Bagtzoglou A. 2020b. Role of glucosyltransferase R in biofilm interactions between *Streptococcus oralis* and *Candida albicans*. *ISME J.* May;14(5):1207-1222.

Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. 2022. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 183:109119.

Valle Arevalo A, Nobile CJ. 2020. Interactions of microorganisms with host mucins: a focus on *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Rev.* 44(5):645-654.

Venturini J, Fraga-Silva TF, Marchetti CM, Mimura LA, Conti BJ, Golim Mde A, Mendes RP, de Arruda MS. 2016. Imbalanced Macrophage and Dendritic Cell Activations in Response to *Candida albicans* in a Murine Model of Diabetes Mellitus. *Immunol Invest.* 45(5):420-38.

Vilchez R, Lemme A, Ballhausen B, Thiel V, Schulz S, Jansen R, Sztajer H, Wagner-Döbler I. 2010. *Streptococcus mutans* inhibits *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule trans-2-decenoic acid (SDSF). *Chembiochem* 11:1552-1562.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., Uppuluri, P. 2019. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 52, 1-6.

Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Dongari-Bagtzoglou A. 2016 *Streptococcus oralis* and *Candida albicans* Synergistically Activate μ -Calpain to Degrade E-cadherin From Oral Epithelial Junctions. *J Infect Dis.* Sep 15;214(6):925-34..

Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Vickerman M, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A. 2017. *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. *Virulence.* 17;8(8):1602-1617.

Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, Cervantes J, Diaz PI, Dongari-Bagtzoglou A. 2014. Streptococcal co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microbiol.* Feb;16(2):214-31.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* Jun 18;13:134.

Zhou Y, Liao M, Zhu C, Hu Y, Tong T, Peng X, Li M, Feng M, Cheng L, Ren B, Zhou X. 2018. ERG3 and ERG11 genes are critical for the pathogenesis of

Candida albicans during the oral mucosal infection. Int J Oral Sci. 2018 Mar 16;10(2):9.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os artigos apresentados no presente trabalho apresentaram como objetivos em comum o estudo da candidíase oral. O estudo bibliométrico foi idealizado inicialmente com o intuito de realizar um levantamento da literatura acerca das publicações relacionadas a modelos experimentais de *C. albicans* em murinos. A partir dos achados foi possível adaptar um protocolo em que fosse possível realizar a indução da candidíase oral em ratos *Wistar*.

Dentre os principais resultados do estudo bibliométrico, destacam-se é a predominância dos Estados Unidos no número de citações e publicações. Além disso, observou-se que as fêmeas foram o tipo de animal mais frequentemente utilizado, com foco na imunossupressão, e os camundongos das linhagens *ICR mice* e *C57BL/6J* foram os mais comuns. Quanto aos órgãos coletados para avaliação da candidíase oral, a língua foi a região mais coletada. Os estudos encontrados não discutiram as predileções, porém as escolhas específicas podem estar associadas a protocolos já utilizados ou à facilidades disponíveis.

Este estudo coletou informações na literatura das últimas duas décadas sobre as tendências e metodologias predominantes em relação à candidíase oral em murinos. Porém, é preciso destacar que há necessidade de compreender o contexto e a aplicabilidade específica de cada delineamento para futuras pesquisas.

A partir da busca prévia na literatura, foi proposto o modelo utilizado para avaliar o efeito do diabetes aloxânico e da terapia com fluconazol na patogenicidade de biofilmes mistos de *C. albicans* e *S. oralis* em ratos *Wistar*. Até então não foram encontrados estudos que observaram estas variáveis em conjunto. Diante desta lacuna de conhecimento apresentada, o protocolo utilizado foi adaptado de estudos previamente publicados na literatura (Xu et al., 2014, Sano et al., 2014, Venturini et al., 2016; Cruz et al., 2018).

Com base nos resultados obtidos, observou-se que os grupos diabéticos e não tratados com fluconazol apresentaram um maior número de alterações macroscópicas e histológicas, bem como uma quantificação mais elevada de *C. albicans* e expressão gênica do HWP1. Além disso, o tratamento com fluconazol demonstrou eficácia na redução da invasão fúngica nos animais diabéticos.

Para futuras investigações, é recomendável a realização de análises que levem em consideração a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, além da identificação de moléculas específicas envolvidas no processo do *quorum sensing*. Ao considerar que essa coinfeção entre *C. albicans* e *S. oralis* pode exercer um papel crucial na compreensão da virulência de biofilmes mistos, a presente pesquisa contribui para novos estudos que possam avaliar o diabetes aloxânico e o tratamento com fluconazol na avaliação dos efeitos da candidíase oral em modelos murinos.

7. CONCLUSÃO

O levantamento da literatura acerca das tendências nas pesquisas em modelos murinos pode auxiliar o delineamento de novos protocolos experimentais. A partir do presente modelo murino apresentado, pela primeira vez observou-se que o efeito de do diabetes aloxâncio aumentou a patogenicidade de biofilmes de *C. albicans* e *S. oralis*, assim como o tratamento com fluconazol foi capaz de reduzir a invasão epitelial. A presente pesquisa pode contribuir em estudos que tenham por objetivo avaliar a candidíase oral no contexto do diabetes mellitus e identificar fatores que possam influenciar na fisiopatologia destas doenças.

REFERÊNCIAS*

Al-Awar A, Kupai K, Veszélka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A, Varga C. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. J Diabetes Res. 2016;2016:9051426.

Al-Janabi AAHS. A Positive or Negative Connection of Diabetes Mellitus to the Oral Microbiota. Eurasian J Med. 2023;55(1):83-89.

Arneth B, Arneth R, Shams M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. Int J Mol Sci. 2019;18;20(10):2467.

Bassetti M, Giacobbe DR, Vena A, Wolff M. Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. Semin Respir Crit Care Med. 2019;40(4):524-539.

Bernard C, Girardot M, Imbert C. *Candida albicans* interaction with Gram-positive bacteria within interkingdom biofilms. J Mycol Med. 2020;30(1):100909.

Bertolini M, Dongari-Bagtzoglou A. The Relationship of *Candida albicans* with the Oral Bacterial Microbiome in Health and Disease. Adv Exp Med Biol. 2019;1197:69-78.

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):307-22.

Bezerra NVF, Brito ACM, de Medeiros MMD, de Franca Leite KL, Bezerra IM, de Almeida LFD, Aires CP, Cavalcanti YW. Glucose supplementation effect on the acidogenicity, viability, and extracellular matrix of *Candida* single- and dual-species biofilms. J Invest Clin Dent. 2019.10:e12412.

Brito ACM, Bezerra IM, Borges MHS, Cavalcanti YW, Almeida LFD. Effect of different salivary glucose concentrations on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. Biofouling. 2021;37(6):615-625

Cavalcanti YW, Morse DJ, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Wei X, Wilson M, Milward P, Lewis M, Bradshaw D, Williams DW. Virulence and pathogenicity of *Candida albicans* is enhanced in biofilms containing oral bacteria. *Biofouling*. 2015;31(1):27-38.

Chevalier M, Ranque S, Prêcheur I. Oral fungal-bacterial biofilm models in vitro: a review. *Med Mycol*. 2018; 1;56(6):653-667.

Cruz LIB, Lopes LFF, de Camargo Ribeiro F, de Sá NP, Lino CI, Tharmalingam N, de Oliveira RB, Rosa CA, Mylonakis E, Fuchs BB, Johann S. Anti-*Candida albicans* Activity of Thiazolylhydrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models. *J Fungi (Basel)*. 2018 ;12;4(4):134.

Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2012-8.

Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One*. 2011;25;6(1):e16218.

Fang J, Huang B, Ding Z. Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *J Prosthet Dent*. 2021 ;125(2):257-265.

Federiuk IF, Casey HM, Quinn MJ, Wood MD, Ward WK. Induction of type-1 *diabetes mellitus* in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp Med*. 2004;54(3):252-7.

Gad MM, Fouda SM. Current perspectives and the future of *Candida albicans*-associated denture stomatitis treatment. *Dent Med Probl*. 2020;57(1):95-102.

Gow NAR, Yadav B. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology (Reading)*. 2017;163(8):1145-1147.

Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, Azoulay E, Borges Sá M, Johnson EM, Müller E, Putensen C, Rotstein C, Sganga G, Venditti M, Zaragoza Crespo R, Kullberg BJ. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-

neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. Intensive Care Med. 2009;35(1):55-62.

Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. Head Neck Pathol. 2019;13(1):25-32.

Herrera D, Sanz M, Shapira L, Brotons C, Chapple I, Frese T, Graziani F, Hobbs FDR, Huck O, Hummers E, Jepsen S, Kravtchenko O, Madianos P, Molina A, Unger M, Vilaseca J, Windak A, Vinker S. Association between periodontal diseases and cardiovascular diseases, diabetes and respiratory diseases: Consensus report of the Joint Workshop by the European Federation of Periodontology (EFP) and the European arm of the World Organization of Family Doctors (WONCA Europe). J Clin Periodontol. 2023;50(6):819-841.

Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. J Microbiol. 2016;54(3):149-69.

Hong BY, Sobue T, Choquette L, Dupuy AK, Thompson A, Burleson JA, Salner AL, Schauer PK, Joshi P, Fox E, Shin DG, Weinstock GM, Strausbaugh LD, Dongari-Bagtzoglou A, Peterson DE, Diaz PI. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. Microbiome. 2019;7(1):66.

Hosida TY, Cavazana TP, Henriques M, Pessan JP, Delbem ACB, Monteiro DR. 2018. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. Mycoses. 61:270-278.

IDF DIABETES ATLAS. 2021 10th edn. Belgium: International Diabetes Federation; [accessed 2023 Oct 02]. <https://diabetesatlas.org/>

Ighodaro OM, Adeosun AM, Akinloye OA. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. Medicina (Kaunas). 2017;53(6):365-374.

- Islam M, Rupeshkumar M, Bhaskar. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. *International Journal of Pharmacological Research*. 2017. 7: (1):06-11.
- Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses*. 2006;49(4):283-7.
- Koo H, Andes DR, Krysan DJ. *Candida-streptococcal* interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog*. 2018;14(12):e1007342.
- Kumar R, Saraswat D, Tati S, Edgerton M.. Novel Aggregation Properties of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase Sap6 Mediate Virulence in Oral Candidiasis. *Infect Immun*. 2015 ;83(7):2614-26.
- Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 2008;51(2):216-26.
- Lima-Aragão MV, de Oliveira-Junior Jde J, Maciel MC, Silva LA, do Nascimento FR, Guerra RN. Salivary profile in diabetic patients: biochemical and immunological evaluation. *BMC Res Notes*. 2016;9:103.
- Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 2022;13(1):89-121.
- Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol*. 2017;44 Suppl 18:S12-S22.
- Martorano-Fernandes L, Dornelas-Figueira LM, Marcello-Machado RM, Silva RB, Magno MB, Maia LC, Del Bel Cury AA. Oral candidiasis and denture stomatitis in diabetic patients: Systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res*. 2020;34:e113.
- Martorano-Fernandes L, Ricomini-Filho AP, Del Bel Cury AA. Does *Streptococcus oralis* supernatant influence on the proliferation and virulence of *Candida albicans*? *Arch Oral Biol*. 2023;154:105763.
- Mohammadi F, Javaheri MR, Nekoeian S, Dehghan P. Identification of *Candida* species in the oral cavity of diabetic patients. *Curr Med Mycol*. 2016;2(2):1-7.

Morse DJ, Wilson MJ, Wei X, Bradshaw DJ, Lewis MAO, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence in *in vitro* biofilms by oral bacteria. Lett Appl Microbiol. 2019;68(4):337-343.

Mussi MCM, Fernandes KS, Gallottini MHC. A call for further research on the relation between type 2 diabetes and oral candidiasis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2022;134(2):206-212.

Naglik JR, König A, Hube B, Gaffen SL. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. Curr Opin Microbiol. 2017;40:104-112.

Oliveira IVG. Monitoramento da indução do *Diabetes mellitus* em ratos *Wistar* com aloxana em diferentes doses. [Dissertação]. Presidente Prudente: Mestrado em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista; 2012.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2016;62:e1-5

Patel PN, Sah P, Chandrashekar C, Vidyasagar S, Venkata Rao J, Tiwari M, Radhakrishnan R. 2017. Oral *candidal* speciation, virulence and antifungal susceptibility in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Res Clin Pract. 125:10-19.

Pellon A, Sadeghi Nasab SD, Moyes DL. New Insights in *Candida albicans* Innate Immunity at the Mucosa: Toxins, Epithelium, Metabolism, and Beyond. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:81

Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2019;24(2):e172-e180.

Radenković M, Stojanović M, Prostran M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. J Pharmacol Toxicol Methods. 2016;78:13-31.

Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 ; 4(5): a019703.

Salvatori O, Kumar R, Metcalfe S, Vickerman M, Kay JG, Edgerton M. Bacteria Modify *Candida albicans* Hypha Formation, Microcolony Properties, and Survival within Macrophages. *mSphere*. 2020;5(4):e00689-20.

Sampath A, Weerasekera M, Dilhari A, et al. Type 2 diabetes mellitus and oral *Candida* colonization: analysis of risk factors in a Sri Lankan cohort. *ACTA Odontol Scand*. 2019;77(7):508-516.

Sano T, Ozaki K, Terayama Y, Kodama Y, Matsuura T. A novel diabetic murine model of *Candida albicans*-induced mucosal inflammation and proliferation. *J Diabetes Res*. 2014;2014:509325.

Silva V, Nogueira RM. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em *ratos Wistar*. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2015. 36(1):1-15.

Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Peterson DE, Diaz PI, Dongari-Bagtzoglou A. Chemotherapy-induced oral mucositis and associated infections in a novel organotypic model. *Mol Oral Microbiol*. 2018;33(3):212-223.

Souza JGS, Bertolini M, Thompson A, Barão VAR, Dongari-Bagtzoglou A. Biofilm Interactions of *Candida albicans* and Mitis Group *Streptococci* in a Titanium-Mucosal Interface Model. *Appl Environ Microbiol*. 2020;86(9):e02950-19.

Staniszewska M. Virulence Factors in *Candida species*. *Curr Protein Pept Sci*. 2020;21(3):313-323.

Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, Stein C, Basit A, Chan JCN, Mbanya JC, Pavkov ME, Ramachandaran A, Wild SH, James S, Herman WH, Zhang P, Bommer C, Kuo S, Boyko EJ, Magliano DJ. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109119

Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):536-46.

- Tabatabaei F, Moharamzadeh K, Tayebi L. Three-Dimensional *In Vitro* Oral Mucosa Models of Fungal and Bacterial Infections. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020;26(5):443-460.
- 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.
- Venturini J, Fraga-Silva TF, Marchetti CM, Mimura LA, Conti BJ, Golim Mde A, Mendes RP, de Arruda MS. Imbalanced Macrophage and Dendritic Cell Activations in Response to *Candida albicans* in a Murine Model of Diabetes Mellitus. *Immunol Invest*. 2016 ;45(5):420-38.
- Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(1):15.
- Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., Uppuluri, P. (2019). *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 52, 1-6.
- Wu J, Yan LJ. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2015;8:181-8.
- Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Dongari-Bagtzoglou A. *Streptococcus oralis* and *Candida albicans* Synergistically Activate μ -Calpain to Degrade E-cadherin From Oral Epithelial Junctions. *J Infect Dis*. 2016;214(6):925-34.
- Xu H, Sobue T, Bertolini M, Thompson A, Vickerman M, Nobile CJ, Dongari-Bagtzoglou A. *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. *Virulence*. 2017;8(8):1602-1617.
- Xu H, Sobue T, Thompson A, Xie Z, Poon K, Ricker A, Cervantes J, Diaz PI, Dongari-Bagtzoglou A. *Streptococcal* co-infection augments *Candida* pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response. *Cell Microbiol*. 2014;16(2):214-31.

Yadev NP, Murdoch C, Saville SP, Thornhill MH. Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis. *Microb Pathog.* 2011;50(6):278-85.

Zomorodian K, Kavosi F, Pishdad GR, et al. Prevalence of oral *Candida* colonization in patients with diabetic mellitus. *J Mycol Med.* 2016;26(2):103-110.

* 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



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA DIABETES MELLITUS E DA TERAPIA COM FLUCONAZOL NA PATOGENICIDADE DE BIOFILMES MISTOS DE *Candida albicans* E *Streptococcus oralis* EM MODELO ANIMAL MURINO", protocolada sob o CEUA nº 9611061022 (ID 001826), sob a responsabilidade de **Yuri Wanderley Cavalcanti e equipe; Arella Cristina Muniz Brito** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 03/05/2023.

We certify that the proposal "EFFECT OF DIABETES MELLITUS AND FLUCONAZOLE THERAPY ON THE PATHOGENICITY OF *Candida albicans* AND *Streptococcus oralis* MIXED BIOFILMS IN A MURINE ANIMAL MODEL", utilizing 24 Heterogenics rats (24 males), protocol number CEUA 9611061022 (ID 001826), under the responsibility of **Yuri Wanderley Cavalcanti and team; Arella Cristina Muniz Brito** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 05/03/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2023 a 06/2023 Área: Ciências Biológicas

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 30 a 40 dias

Quantidade: 24

Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar

Peso: 180 a 200 g

João Pessoa, 15 de maio de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

