

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciência da Saúde
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

ADRIELLE MANGABEIRA SANTOS

POTENCIAL CARIOGÊNICO DE *Candida não-albicans*
ISOLADAS DO BIOFILME DENTÁRIO DE CRIANÇAS
INFECTADAS PELO HIV

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Centro de Ciência da Saúde
Faculdade de Odontologia
Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

ADRIELLE MANGABEIRA SANTOS

POTENCIAL CARIOGÊNICO DE *Candida não-albicans*
ISOLADAS DO BIOFILME DENTÁRIO DE CRIANÇAS
INFECTADAS PELO HIV+

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Orientadoras:

Prof^a. Dr^a Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro

Prof^a. Dr^a. Maristela Barbosa Portela

Rio de Janeiro
2014

Folha de aprovação

SANTOS, ADRIELLE MANGABEIRA


"POTENCIAL CARIOGÊNICO DE CANDIDA NÃO-ALBICANS ISOLADAS DO BIOFILME DENTÁRIO DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV"

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Odontologia (Odontopediatria).

Rio de Janeiro, 06 de maio de 2014.



Prof. Dr. Marcelo de Castro Costa
DO-Prof. Adjunto do Deptº. de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ



Profa. Dra. Luciana Pomarico Ribeiro
DO-Profa. Adjunto do Deptº. de Odontopediatria e Ortodontia da UFRJ



Prof. Dr. Matheus Melo Pithon
DO-Prof. Adjunto da UESB

Dedicatória

A Deus

Por tornar meus sonhos possíveis...

"Rendam graças ao Senhor, pois ele é bom; o seu amor dura para sempre. "

I Crônicas 16:34

À minha família,

Meu querido pai **Sinval Neves** (*in memoriam*) que mesmo com sua afetividade paterna em tentar me ensinar as verdades e inconstâncias da vida, não foram suficientes para que eu pudesse compreender o sofrimento das perdas irreparáveis. Sei que jamais conseguirei superar a saudade que sinto, mas agradeço infinitamente cada momento que vivi ao seu lado. A minha doce mãe **Valquiria Mangabeira** e meus irmãos **Eloá Mangabeira** e **Arthur Mangabeira** por todo apoio incondicional, carinho e amor desmedido que sempre me passaram. Vocês me fazem lembrar que em tudo, dai graças! E sempre sorrir mesmo que a caminhada esteja árdua.

Vocês são tudo de melhor que tenho na vida!

Agradecimentos

Aos meus avós, tios e primos por toda cumplicidade, por compreenderem a ausência e por todas as palavras de ânimo e encorajamento.

"Saber encontrar a alegria na alegria dos outros, é o segredo da felicidade".

Georges Bernanos

Às minhas Professoras, **Dr^a Gloria Fernanda Castro** e **Dr^a Maristela Barbosa Portela**, queridas orientadoras. Obrigado por contribuírem para minha formação de Mestre. Vocês me permitiram fazer parte da equipe de vocês. Me apresentaram o mundo da microbiologia e estiveram ao meu lado em todas as etapas deste estudo, por mais difíceis que elas pudessem ter sido. Agradeço por toda confiança depositada! Esses dois anos foram realmente de muito aprendizado profissional e pessoal. Me orgulho por ser aluna de vocês!

Minha eterna gratidão a vocês!

"A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e aprender ainda mais".

Aristóteles

À Professora **Dr^a. Rosangela Soares**, por toda confiança depositada em mim. Por abrir as portas do laboratório e por todo acolhimento.

Ao Professor **Dr^o Matheus Pithon**, por todo conhecimento transmitido. Me aceitou como orientanda mesmo com todas as minhas limitações. Confiou em mim e nunca se negou a ajudar! Você é um exemplo de dedicação e competência.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina".

Cora Coralina

A **Profª Drª Lucianne Cople** Maia, agradeço por todo carinho, preocupação e ensinamento. Me recebeu de braços abertos e nunca poupou esforços em transferir seus conhecimentos. Sou admiradora de toda sua dedicação e competência.

A **Profª Drª. Ivete Pomarico Ribeiro de Souza e Drº Rogério Gleiser**, por todo aprendizado transmitido nos seminários. Foi tudo muito recompensador. Vocês são exemplos de competência e profissionalismo.

A equipe de professores **Drº Marcelo Costa, Drª. Laura Primo, Drª. Luciana Pomarico, Drª. Andrea Antonio, Drª. Aline Neves, Drº. Thomaz Chianca, Drª Carla Martins e João Farinhas** sempre disponíveis durante a minha formação de mestrado. Expresso minha grande admiração pela simplicidade e paciência com seus alunos.

Às professoras **Cláudia, Nena, Marta, Rosana, Barbara e Vanessa**. Obrigada por compartilharem suas experiências clínicas comigo durante meu mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria (FO/UFRJ), em especial **Kátia, Mere, Andréa, João Carlos, Patrícia, Luiza, Robson, Zezé, Rose, Isabel e Edinaldo**. Meus eternos agradecimentos, por todos os sorrisos e apoio recebido durante meu curso.

Aos colegas de turma, **Marina, Thiago, Livia e Clarissa**, obrigada pelo convívio e por compartilharem os momentos dessa caminhada. Desejo a vocês muito sucesso!

Aos amigos do primeiro ano, **Aline, Andréa, Fernanda, Káiron e Paula**. Obrigada pela amizade, apoio e incentivo nesta reta final. Vocês são maravilhosos e merecem tudo de melhor.

A **Helena, Queila, Elaine, Tacíria e Nashelie** que me receberam de braços abertos no mestrado.

Às meninas das especialização, em especial **Raquel Carvalho**, por todo carinho e convívio esse ano. Vocês alegravam a supervisão de clínica.

Aos alunos do doutorado **Thaís Soares, Marcello Rotter, Michele Lenzi, Michelle Ammari, Andréa Pintor e Marlus Cajazeira**, e ex-alunas, em especial, **Mariana, Aline e Bruna**, pela amizade e companhia. Vocês são especiais, cada a um a sua maneira. Vocês foram presentes que ganhei da UFRJ.

A **Tatiana Kelly e Adílís**, companheiras de laboratório Obrigada por todo carinho e ensinamento. Considero como irmãs mais velhas.

A **Alexandre, Anna Léa, Daniel e Geisa**, companheiros de laboratório. Obrigada por todo acolhimento, ajuda e convivência agradável.

A querida **Raquel Pinheiro**, companheira e amiga de laboratório que insiste em me colocar no "mundo do PCR".

Às alunas de iniciação científica **Ana Clara, Raquel e Thais**, pela dedicação e empenho. Vocês se tornaram muito mais que alunas, e sim amigas. Espero contribuir na formação de vocês. Desejo muito sucesso a todas.

À **Gabriel Couto e Caio Ferraz**, presentes que ganhei do grupo Orthodontics Uesb. Companheiros admiráveis. E por mais que haja a distância, meu carinho por vocês só aumenta. Desejo muito sucesso a vocês.

Às minhas "personal mother" **Fátima Ceres e Lenita Siqueira**, me acolheram com carinho e de uma maneira ou outra, supriam parte da dor em ter minha mãe longe. Vocês são anjos que o SENHOR colocou em minha vida.

"Amigos são a família que nos permitiram escolher".

William Shakespeare

A **Ariane Merlin**, que me abraçou como irmã abrindo a sua casa e me ajudando sempre que precisei.

Aos pacientes, da clinica da Disciplina de Odontopediatria e do Projeto SIDA/AIDS em Odontopediatria (FO/UFRJ). Sentirei saudade de todo carinho recebido por vocês.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pelo financiamento desta pesquisa e de meu curso de Mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento!

RESUMO

SANTOS, ADRIELLE MANGABEIRA. **POTENCIAL CARIOGÊNICO DE *Candida não-albicans* ISOLADAS DO BIOFILME DENTÁRIO DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV+**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O objetivo deste estudo foi analisar, *in vitro*, o padrão de desmineralização do esmalte bovino exposto a *C. não-albicans* isoladas de biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV, em comparação com *C. albicans* (n = 2) e *Streptococcus (S) mutans* (ATCC). Também foram avaliadas as formações de biofilme e produção de L-lactato por estas espécies *não-albicans*. Cento e oitenta blocos de esmalte foram divididos em 6 grupos com biofilme formado por: *C. glabrata*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*; *C. albicans*; *S. mutans* e controle negativo (meio sem biofilme). Três blocos de esmalte de cada grupo foram retirados nos dias 3, 5, 8, 15 e 28 após a formação de biofilme para avaliar a microdureza superficial do esmalte final (SMH). Além disso, a viabilidade das células do biofilme e o L-lactato produzidos por estas células foi medida por redução de XTT e enzimaticamente, respectivamente. Análise microscópica de varrimento laser confocal (CLS) foi utilizado para avaliar a topografia de cada isolado de biofilme de *C. não-albicans*. Os resultados da análise de SMH foram submetidos a testes de Mann-Whitney de Kruskal-Wallis e com um nível de significância de 95% (p <0,05), enquanto que os dados de viabilidade do biofilme, L-lactato e análise CLS foram avaliadas de forma descritiva. Todos os grupos mostraram um aumento na perda de SMH, mas apenas os grupos expostos a biofilmes de *S. mutans* e *C. albicans* foram estatisticamente significativas ao longo do tempo. Ao comparar as espécies *C. não-albicans* entre si, *C. tropicalis* apresentaram maior perda% no 5^o dia em comparação com *C. parapsilosis* e no 8^o dia em comparação com *C. glabrata*. Não foi observada diferença estatística entre *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Todos os isolados de *C. não-albicans* mostraram o mesmo perfil de formação de biofilme. A produção de L-lactato foi maior em *C. tropicalis* seguido por *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. No entanto, a análise mostrou CLS *C. parapsilosis* biofilme com mais células viáveis e com a matriz extracelular mais. Embora com menor intensidade em comparação com *C. albicans* e *S. mutans*, os isolados de *Candida não-albicans* do biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV, foram capazes de causar a desmineralização do esmalte bovino.

DESCRITORES: *Candida não-albicans*, Crianças infectadas pelo HIV, Desmineralização, biofilmes, Ácido lático.

SUMMARY

SANTOS, ADRIELLE MANGABEIRA. **POTENCIAL CARIOGÊNICO DE *Candida não-albicans* ISOLADAS DO BIOFILME DENTÁRIO DE CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV+**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

This study aimed to analyze, *in vitro*, the demineralization pattern of bovine enamel exposed to biofilm of *C. non-albicans* isolated from dental biofilm of HIV infected children, comparing to *C. albicans* (n=2) and *Streptococcus (S) mutans* (ATCC). We also evaluated the biofilm formations and the production of L-lactate by these non-albicans species. A hundred eighty enamel blocks randomly assigned to 6 groups with biofilm formed by: *C. glabrata*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*; *C. albicans*; *S. mutans* and negative control (medium without biofilm). Three enamel blocks from each group were removed on days 3, 5, 8, 15 and 28 after biofilm formation to evaluate the final enamel surface microhardness (SMH). In addition, the cells viability of the biofilm and the L-lactate produced by these cells were measured by XTT reduction and enzymatically, respectively. Confocal laser scanning microscopic (CLS) analysis was used to evaluate the biofilm architecture of each *C. non-albicans* isolate. The results from SMH analysis were subjected to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests with a 95% significance level ($p < 0.05$), while the data from biofilm viability, L-lactate and CLS analysis were evaluated descriptively. All groups showed an increase in loss of SMH but only the groups exposed to biofilms from *S. mutans* and *C. albicans* were statistically significant over time. When comparing the species *C. non-albicans* among themselves, *C. tropicalis* showed a greater % loss on the 5th day compared with *C. parapsilosis* and at the 8th day compared to *C. glabrata*. No statistical difference between *C. parapsilosis* and *C. glabrata* was observed. All isolates from *C. non-albicans* showed the same profile of biofilm formation. The L-lactate production was higher in *C. tropicalis* followed by *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. However, the CLS analysis showed *C. parapsilosis* biofilm with more viable cells and with more extracellular matrix. Although with less intensity comparing to *C. albicans* and *S. mutans*, isolates of *Candida non-albicans* from HIV infected children dental biofilm, were able to cause demineralization of bovine enamel.

Key Words: non-albicans *Candida*, HIV-infected children, Demineralization, biofilm formation, lactic acid.

LISTA DE FIGURA

Figure 1 Behavior to isolated to *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* from HIV Infected over 28 days experiment . (A). Percentage of microhardness reduction (noncumulative) in enamel; (B) Biofilm production categorization among isolated; (C) Lactate measurement production. 40

Figure 2 Confocal scanning laser microscopy of *Candida* spp. biofilms. A representative strain of (A) *C. glabrata*, (B) *C. parapsilosis*, (C) *C. tropicalis*, were selected in order to illustrate the presence of yeasts, hyphae, pseudohyphae, different arrange and density of mature biofilm formed by *Candida* species. Biofilm thickness (μm) of each specie that underwent CLSM was determined by merging orthogonal view. Side-view images were obtained using software LAS-AF 4.1.2. Magnification: 40x. 41

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1: Mean percentage reduction of enamel surface microhardness exposed in different biofilms from isolated from HIV Infected children and <i>S. mutans</i> (ATCC) over 28 days experiment	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATCC American Type Culture Collection
- BHI Brain Heart Infusion
- CCS Centro de Ciências da Saúde
- CLS Confocal laser scanning microscopic
- CLSM Confocal Laser Scanning Microscopy
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- HIV Human Immunodeficiency Vírus
- IESC Instituto de Estudos de Saúde Coletiva
- IgA Imunoglobulina A
- IPPMG Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira
- ml Mililitro
- mM Mili molar
- NaCl Solução salina
- págs Páginas
- pH Potencial de hidrogênio
- SMC Surface microhardness change
- SMH Surface microhardness
- spp. espécies / species
- TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- UFRJ Universidade Federal do Rio de Janeiro
- USA United States of America
- XTT 2, 3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-Carboxanilida

LISTA DE SÍMBOLO

- % Porcentagem
- \pm Desvio padrão
- ® Marca registrada
- °C Graus celsius
- μ l Microlitro
- μ m Micrômetro

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
2. PROPOSIÇÃO	18
2.1. OBJETIVO GERAL.....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	19
4. ARTIGO REALIZADO	25
4.1. Artigo 1 - "Demineralization of bovine enamel by non-albicans Candida from dental biofilm of HIV + children".	25
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÕES	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8. ANEXOS	55

1. INTRODUÇÃO

O biofilme dentário apresenta elevada concentração de metabólitos microbianos (Jenkinson *et al.*, 2005; Kolenbrander *et al.*, 2002). Esses metabólitos promovem flutuações de pH predispondo a perda de minerais dentário. Essa perda resulta na dissolução dos tecidos duros dentais, favorecendo, dessa forma, a instalação da lesão de cárie (Lemos *et al.*, 2013; Kidd *et al.*, 2004). O *Streptococcus (S) mutans* é considerado como o principal agente etiológico no estabelecimento da lesão de cárie. Esse microorganismo produz grande quantidade de glucana e torna o meio ácido frente à fermentação de matéria orgânica presentes no biofilme dentário (Kutsch *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011; Burne *et al.*, 2012) excedendo a capacidade de tamponamento da saliva (Lemos *et al.*, 2013; Falsetta *et al.*, 2012).

Estudos comprovam que crianças infectadas pelo HIV têm uma maior prevalência de cárie comparadas a crianças não infectadas, principalmente na dentição decídua (Castro *et al.*, 2004; Hodgson *et al.*, 2006; Cerqueira *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2014 (*in press*)). Isso se dá, porque nesses pacientes, alguns fatores predisponentes para o estabelecimento da doença cárie, como higiene oral deficiente, dieta e medicamentos ricos em sacarose (Castro *et al.*, 2004; Pomarico *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2009) parecem estar mais atuantes. Além disso, deficiência de IgA salivar (Castro *et al.*, 2004) e o aumento da quantidade de microrganismos na sua cavidade oral, como às espécies de *Candida (C.)* relatados nesse indivíduos (Bosco *et al.*, 2003; Cerqueira *et al.*, 2010) também pode favorecer o desenvolvimento da doença cárie.

Dentre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* se caracteriza como a mais prevalente, porém todas apresentam caráter oportunista para desenvolvimento de infecção oral. Em pacientes imunocomprometidos, este microorganismo pode assumir características de diferentes patogenicidades como a exacerbação dos seus fatores de virulência (Starr *et al.*, 2002; Naglik *et al.*, 2003; Pongsiriwet *et al.*, 2004). As espécies de *C. não-albicans*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stella-toidea*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (Chattopadhyay *et al.*, 2005; Jabra-Hizk *et al.*, 2000), também podem estar presentes e desencadear

lesões neste grupo de pacientes. Essas leveduras são capazes de se agregar a microrganismos existentes na cavidade oral favorecendo sua aderência tanto na mucosa como em estrutura dentária (Grimaudo *et al.*, 1996). Sem contar que, esses microrganismos apresentam capacidade de colonizar e se proliferar nos túbulos dentinários. (Chagas *et al.*, 2009)

Devido a presença de uma coagregação entre *S. mutans* e *C. albicans* (Metwalli *et al.*, 2013), essas leveduras vem sendo apontadas como importante coadjuvante no processo da cárie (Rego *et al.*, 2003; Charone *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2007). Sem contar que, sua aderência pode ser favorecida quando há exposição tanto de superfície radicular como de colágeno da dentina. (Nishimura *et al.*, 2002). Alguns estudos mostram que a *C. albicans* foi a espécie mais prevalente em biofilme dental e saliva de crianças cárie-ativas quando comparadas com crianças sem cárie (Radford *et al.*, 2000; Moalic *et al.*, 2001). Bhaskar *et al.* (1986) relataram que essa espécie de levedura possui a capacidade produzir e secretar proteases. Essa enzima é capaz de degradação de proteínas como o colágeno tipo I presente em 90% da matriz orgânica da dentina. A capacidade de isolados *C. albicans* provenientes de biofilme dentário e dentina cariada em degradar colágeno já é comprovada pelo estudo de Portela *et al.* (2012). Contudo, na literatura consultada até o momento, nada se sabe a respeito do papel das *C. não-albicans* neste processo de iniciação e desenvolvimento da doença cárie.

Diante do exposto, devido à importância do controle da doença cárie em crianças infectadas pelo HIV e o possível envolvimento como coadjuvante das *C. não-albicans* no processo cariioso, o presente estudo propõe analisar o potencial de desmineralização de *C. não-albicans* isoladas do biofilme dentário de crianças infectadas pelo HIV através da redução de microdureza do esmalte bovino, quantificação da formação de biofilme e produção de ácido láctico por estas espécies *in vitro*.

2. PROPOSIÇÃO

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar o potencial de desmineralização de *C. não-albicans* isoladas do biofilme dentário de crianças infectadas pelo HIV no esmalte bovino *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* o potencial de desmineralização do esmalte bovino por *Candida não-albicans* isoladas do biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV através da mensuração da microdureza superficial, comparando com *C. albicans* e *S. mutans*.
- Analisar a formação de biofilme por *Candida não-albicans* isoladas do biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV.
- Analisar a produção de ácido láctico por *Candida não-albicans* isoladas do biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV.

3. DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo se caracterizou como uma pesquisa de caráter descritivo e analítico sobre a capacidade de desmineralização de *Candida não-albicans* isoladas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV. Estes isolados clínicos de *C. não-albicans* foram previamente obtidos (Charone, 2009) e estocados no banco de isolados de *Candida* do Laboratório de Prostita do Instituto de Microbiologia Prof Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Todo o trabalho foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPPMG/UFRJ) (Anexo1) sob o número 14/09 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Estudos de Saúde Coletiva (IESC) da UFRJ (Processo no 18/2009) (Anexo 2).

Resumidamente, Charone (2009), realizou as coletas de biofilme supragengival das crianças infectadas pelo HIV no Serviço de AIDS pediátrica do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ). A seleção dos pacientes adotou procedimentos por conveniência no Serviço de AIDS Pediátrica do IPPMG, a partir do recrutamento de pacientes infantis no período de oito meses (agosto de 2007 à março de 2008). Após obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), devidamente assinado pelo responsável legal da criança e anuência da mesma (Anexo 2, pag. 81), a amostra final foi constituída por cinquenta (50) crianças na faixa etária de 3 a 12 anos de idade. Para o presente estudo utilizou-se todos os isolados de *C. não-albicans* obtidos destes pacientes:

- *C. parapsilosis* (n=5)
- *C. tropicalis* (n=2)
- *C. glabrata* (n=1)

Dentre os isolados de *C. albicans*, dois isolados clínicos do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, escolhidos aleatoriamente, e uma cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175T foram utilizados para fins de comparação dos resultados.

As análises microbiológicas, formação de biofilme e produção de ácido láctico foram realizados no Laboratório de Biologia de Protistas do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ (Departamento de Microbiologia Geral) no Centro de Ciências da Saúde (CCS) A análise da topografia do biofilme foi realizada na Unidade Multiusuário de Microscopia Confocal (Instituto de Ciências Biomédicas). Já as análises de Microdureza foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A partir dos resultados do presente estudo, foi elaborado um artigo científico cujo o objetivo foi avaliar, *in vitro*, o potencial de desmineralização de espécies de *Candida não-albicans* isoladas do biofilme dental supragengival de pacientes infantis infectados pelo HIV, sobre o esmalte bovino através da redução da microdureza superficial, quantificação da formação de biofilme e produção de ácido láctico.

Confecção dos blocos de esmalte bovino

Para a análise *in vitro* do potencial de desmineralização do esmalte bovino por *Candida não-albicans* isoladas do biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV, foram utilizados neste estudo noventa (90) incisivos bovinos desinfetados em formol e mantidos a 2% (pH 7,0). Estes dentes foram observados em estereomicroscópio (Zeiss – 475200 – 9901, West Germany) com aumento de 40x e, aqueles que apresentaram cárie, manchas, trincas ou outros defeitos no esmalte, foram excluídos do trabalho.

Após a seleção, as raízes dos dentes bovinos foram removidas com o auxílio de um disco diamantado dupla-face montado em peça-reta restando somente o remanescente coronário. Posteriormente, os dentes foram fixados separadamente, com cera pegajosa azul (Kota Ind. e Com. Ltda, São Paulo, SP) em pequenas placas de acrílico cristal (60 x 20 x 6 mm), visando mantê-los imóveis sobre uma superfície rígida para a realização dos cortes dentários. Estes foram realizados em cortadeira automática (ISOMET Low Speed Saw cutting machine - model n 11-1280-170, Lake Bluff, IL, USA), com dois discos (Buehler 11-4244, 102 mm x 0,3 mm) com um espaçador de 4 mm entre eles obedecendo à seguinte ordem de execução: (1) secção da porção coronária no sentido longitudinal, (2) secções do fragmento no

sentido horizontal resultando em blocos 4 x 4 mm. Com o intuito de realizar a planificação da dentina, os fragmentos foram fixados com cera pegajosa no centro de um dispositivo de polipropileno com o esmalte voltada para o dispositivo. O conjunto foi adaptado em uma politriz metalográfica e a planificação foi realizada sob refrigeração utilizando-se lixa de granulação 600.

Posteriormente, os blocos foram novamente fixados em dispositivos de polipropileno, porém, com o esmalte voltado para cima, sendo novamente adaptado na politriz. O desgaste e polimento do esmalte foram feitos utilizando lixas de granulação 600 e 1200, (Extec, Connecticuti, USA) respectivamente. Para finalizar o polimento, foi utilizado um feltro (Polishing Cloth Buehler 40- 7618) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 μm (Extec, Connecticuti, USA), originando assim uma superfície vítrea que permitiu a aferição da microdureza superficial. Entre cada etapa de polimento, o conjunto dente/disco foi levado a um aparelho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner Mod USC 750, Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda, São Paulo, SP) com frequência de 40 kHz durante 3 minutos, com água deionizada, a fim de evitar que os grãos da primeira lixa interferissem na qualidade de polimento das seguintes. Ao final do polimento, os espécimes ficaram imersos por 10 minutos em água deionizada sob a ação do ultrassom (Rios *et al.*, 2006).

Em seguida, os blocos de dentários foram protegidos com esmalte cosmético de cor vermelha (2 revestimentos, 24 horas de secagem) exceto para uma área circular de 6,06 mm², confeccionada no centro da área exposta de cada bloco de esmalte.

Os blocos foram selecionados através da microdureza da superfície, onde foram realizadas cinco indentações no centro do bloco, espaçadas por 100 μm (Tenuta *et al.*, 2003). As indentações foram realizadas em cinco pontos equidistantes 100 μm por um microdurômetro com ponta de diamante Knoop sob uma carga estática de 50 g, aplicadas durante cinco segundos (Tenuta *et al.*, 2003). Os blocos foram selecionados com base na microdureza de superfície inicial (SMH) (média total de 338,93 \pm 33,8 kg/mm²). Os blocos que apresentaram o valor da média entre suas cinco indentações 10% acima ou abaixo da média total da microdureza foram descartados resultando em 180 blocos de dentes. Posteriormente, os blocos foram fixados em 12 placas de 24 poços (TPP, Zellkultur

Testplatte 24 F) com 15 blocos cada, com a porção de esmalte exposto voltados para cima e submetidos a esterilização de óxido de etileno. (Bioxxi, Sterilization Services, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

Formação do biofilme in vitro

Para formação de biofilme, em cada placa, inoculou-se suspensões celulares com 10^5 leveduras/ml seguindo a metodologia descrita por Charone *et al.*, (2013) modificada. Após o crescimento dos isolados clínicos de *Candida* spp. em BHI líquido (Brain Heart Infusion - BD Difco™, Maryland, Estados Unidos da América) por 48 horas a 37 °C sob agitação, 1 ml do inóculo com o número de células padronizado e no meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI - BD Difco™, Maryland, United States of America) acrescido a 20% de sacarose foi introduzido em cada poço com os fragmento já fixados em seu interior, permanecendo por 28 dias a 37 °C sem agitação. Já, as placas contendo *S. mutans* foram mantidas em microaerofilia durante o mesmo período de tempo. Durante os 28 dias do experimento, o meio foi substituído a cada 48 horas (Machado *et al.*, 2010; Thein *et al.*, 2007). De cada placa, três (3) blocos dentais foram retirados no 3º, 5º, 8º, 15º, e 28º dia após formação de biofilme.

Imediatamente após a remoção, todos os blocos de esmalte bovino foram limpos com algodão e formaldeído 10% e armazenados separadamente por folhas de papel absorventes (Softy's Melhoramentos, São Paulo, SP) embebidas em água deionizada, em recipientes plásticos com tampa, que foram armazenados em um refrigerador a aproximadamente 4°C (RIOS, 2006).

Mensuração da microdureza superficial final, biofilme formado, ácido láctico produzido e topografia do biofilme

Os blocos de esmalte bovino foram submetidos novamente a mensuração SMH pelo mesmo pesquisador que realizou as leituras iniciais. No entanto, os blocos foram codificados a fim de tornar a mensuração cega. Foram realizadas cinco indentações espaçadas de 100 µm a partir da linha de base (Tenuta *et al.*, 2003). A porcentagem de perda de dureza de superfície (% SMC) para as amostras foi

calculada sob equação: % SMC = SMH inicial - SMH depois da indução de biofilme / SMH inicial x 100.

Para avaliar a formação de biofilme, foram selecionado aleatoriamente um isolado de cada espécie de *C. não-albicans* para essa avaliação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Após a formação do biofilme, como descrito anteriormente, mas em placa de 96 poços, o sobrenadante foi removido e o substrato o fundo de cada poço passaram por duas lavagens em 150 µl de PBS estéril. A quantificação do biofilme foi realizada pela adição de XTT (2,3-Bis-(2-Metoxi-4-Nitro-5-Sulfofenil)-2H-Tetrazólio-5-Carboxanilida, Invitrogen™, Life Technologies, Califórnia, Estados Unidos da América) com menadiona na proporção de 1:20 nos poços. A reação de redução do XTT pelos fungos se deu a 37°C por 3 horas na ausência de luz. Após esta incubação, o sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 492 nm.

Para avaliar a quantidade de ácido láctico produzido pelo biofilme em formação foi utilizada a metodologia descrita por Loveren (2000). Foram selecionadas aleatoriamente um isolado de cada espécie de *C. não-albicans* para essa avaliação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Após a formação do biofilme, como descrito anteriormente, mas em placa de 96 poços, tendo como substrato o fundo de cada poço, o sobrenadante de cada troca de meio (48 hs) foi removido e analisado L-lactato foi medido enzymatically (Gutmann *et al.*, 1974). O limite de detecção deste método é de cerca de 0,05 mmol/ l de lactato. A reprodutibilidade e precisão do procedimento é bom, com um coeficiente de variação de 4 a 3%(Loveren *et al.* 2000).

No que se refere a avaliação topográfica do biofilme e a espessura do biofilme através de microscopia confocal de varredura a laser, foram selecionadas aleatoriamente um isolado de cada espécie de *C. não-albicans*. O protocolo estabelecido por Chandra *et al.*, (2008) foi utilizado com modificações para permitir a formação de biofilmes em borosilicato Lab-Tec® 8 poços (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY). O biofilme maduro observado foi o de 5º dia depois de realizado a indução, como anteriormente descrito. Os biofilmes foram lavadas com 150 µl de PBS estéril e incubados com uma solução contendo 10 mM de corantes

fluorescentes FUN-1 (coloração vermelha representando o citoplasma de células metabolicamente ativas) e 488 (25 µg/ml) Concanavalina a-Alexa Fluor (coloração verde que representa a superfície celular e/ou matriz extracelular) durante 40 minutos a 37 °C, na ausência de luz (Chandra, et al. 2008). As imagens foram capturadas em microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 AOBS SECULAR do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ, e analisados pelo software FIJI ®. (Max Planck Institute, Dresden, Germany) e o software LAS AF Lite ® (Leica, Berlin, Germany).

4. ARTIGO REALIZADO

4.1. Artigo 1 - "Demineralization of bovine enamel by non-albicans Candida from dental biofilm of HIV + children".

CANDIDA NON-ALBICANS FROM HIV+ CHILDREN DENTAL BIOFILM CAUSES BOVINE ENAMEL DEMINERALIZATION

Adrielle Mangabeira ¹

Maristela Barbosa Portela²

Rosangela Maria de Araújo Soares³

Gloria Fernanda Barbosa de Araújo Castro⁴

¹Pos graduate student, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Adjunt Professor, Department of Clinics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Brazil

³Associate Professor, Department of Microbiology; Institute of Microbiology Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Adjunt Professor, Department of Pediatric Dentistry and Orthodontics, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil- This study was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Corresponding author: Gloria Fernanda Castro e-mail: gfbacastro@yahoo.com.br
Caixa Postal 68066, Cidade Universitária – CCS, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Cep: 20941-971 Tel: 55-21-24253647 – Fax: 55-21-25622098

Abstract

This study aim to analyzed , in vitro, the demineralization pattern of bovine enamel exposed to biofilm of *Candida (C.) non-albicans* isolated from dental biofilm of HIV infected (HIV+) children, comparing to *C. albicans* and *S. mutans* (ATCC). Also, we evaluated the biofilm formation and the production of lactic acid by these *non-albicans* species. One hundred eighty bovine enamel blocks were randomly assigned to 6 groups with biofilm formed by: *C. glabrata*; *C. parapsilosis*; *C. tropicalis*; *C. albicans*; *S. mutans* (ATCC). Three enamel blocks from each group were removed on days 3, 5, 8, 15 and 28 after biofilm formation for evaluate the final enamel surface microhardness (SMH). Also, the cells viability of the biofilm and the L-lactate produced by these cells were measured by XTT reduction and enzymatically, respectively. Confocal laser scanning microscopic (CLS) analysis was used to evaluate the biofilm architecture of each *C. non-albicans* isolate. The results from SMH analysis were subjected to Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests (95% significance; $p < 0.05$), while the data from biofilm viability, L-lactate and CLS analysis were evaluated descriptively. All groups showed an increase in loss of SMH but only the groups exposed to biofilms from *C. albicans* and *S. mutans* were statistically significant over time. When comparing the species *C. non-albicans* among themselves, *C. tropicalis* showed a greater % loss on the 5th day compared with *C. parapsilosis* and at the 8th day compared to *C. glabrata*. All *C. non-albicans* isolates showed the same profile of biofilm formation. The L-lactate production was higher in *C. tropicalis* followed by *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. However, the CLS analysis showed *C. parapsilosis* biofilm with more viable cells and with more extracellular matrix. Although with less intensity, isolates of *C. non-albicans* from dental biofilm of HIV+ children were able to cause demineralization of bovine enamel.

Key words: *Candida non-albicans*, Demineralization, Children, HIV

Introduction

Candida (C.) albicans is considered the most prevalent opportunistic fungus and pathogenic character in the oral cavity of HIV-infected children (Kim and Sudbery, 2011). However, some kinds of *non-albicans C.* are also present as *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. Stellatoidea*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, and *C. guilliermondii* (Chattopadhyay *et al.*, 2005; Jabra-Hizk *et al.*, 2000). These yeasts have the ability to add microorganisms in the oral cavity leading to their adhesion to the mucosa and tooth structure (Grimaudo *et al.*, 1996).

Studies show that HIV-infected children have a higher prevalence of caries compared to uninfected children, especially in the primary dentition (Castro *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2013 (in press)). This occurs because these children present some predisposing factors for caries establishment as poor oral hygiene, diet and medications rich in sucrose (Castro *et al.*, 2004). In addition, other factors may lead to the development of caries in these individuals, such as salivary IgA deficiency and higher quantity of microorganisms in the oral cavity, among them *Candida* species (Bosco *et al.*, 2013; Cerqueira *et al.*, 2010).

Streptococcus (S) mutans is directly involved in the establishment of carious lesions because of their ability to make the acid fermentation of organic matter present in the biofilm environment. (Kutsch *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2011; Burne *et al.*, 2012). Furthermore, the presence of a co-aggregation of *S. mutans* and *C. albicans* has been reported (Metwalli *et al.*, 2013). This fungus in addition to colonize and proliferate in the dentinal tubules (Chagas *et al.*, 2009), has been identified as an important adjunct in the decay process (Carvalho *et al.*, 2007). However, the role of *C. non-albicans* in this process is unknown. Being extremely important to control caries in HIV-infected children, with regard to the different mechanisms of development in this population. Thus, the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the potential for demineralization of non-isolated *C. albicans* biofilm by reducing the hardness of enamel, quantification of biofilm formation and production of lactic acid in HIV children.

Materials and Methods

This study was performed with *Candida* previously obtained by Charone (2009), from HIV infected children after the study was approved by the Ethics Committee and the term informed consent was obtained from the legal guardians of the child. These isolates are part of the bank of *Candida* of the no Laboratory of Biology of Protists Institute of Microbiology Paulo de Goes UFRJ (Department of General Microbiology) at the Center for Health Sciences (CCS). In brief, these clinical isolates were collected by scraping the mature dental biofilm (ref da Apoena q fala o que é biofilme maduro, ver na tese da Senda) of HIV-infected by a trained dentist with a sterile curette # 20 (Duflex®) rubbed on the labial surface of the tooth, due to its easy access and to allow better isolation from saliva. Then, the material was transferred to sterile plastic tubes containing 1 ml saline (0.85% NaCl) being held under refrigeration and transported for subsequent laboratory analysis. These tubes containing clinical specimens were homogenized in a mixer (vortex) for 30 seconds and then the suspensions were diluted in a 1: 1 by NaCl (0.85%) measurement and sterile to the presumptive identification of *Candida* species. From this dilution 100mL of each suspension were inoculated and seeded in Petri plates containing the culture medium CHROMagar *Candida*®, and incubated at 37 ° C for 48 and 72 hours allowing the presumptive identification of *Candida* species by staining of colonies to confirm the identification, colonies with different colors for each patient were analyzed using biochemical fermentation and assimilation of sugars through the API 20C (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) system and the reactions read after 48 and 72 hours at 37. All *Candida* species isolated and identified were stored and kept in tubes containing 5 mL of thread agar Sabouraud dextrose medium at 4 ° C sterile.

For our study, we used all isolated from *C. non-albicans* obtained from patients from HIV infected children: *C. parapsilosis* (n = 5), *C. tropicalis* (n = 2) and *C. glabrata* (n = 1). Among the isolates of *C. albicans* clinical isolates of HIV-infected supragingival plaque two children were randomly selected, and a strain of *Streptococcus mutans* ATCC 25175T was used for comparison purposes.

Preparation of specimens of bovine tooth

One hundred eighty bovine enamel blocks (4 x 4 mm) stored in solutions (Formoldeído 2%) were embedded in acrylic devices and polished with silicon carbide paper with 600 and 1200 grit, followed by polishing with diamond abrasive paste. Then, the surfaces were protected with nail varnish red (2 hands and drying 24 hours) except a circular area of 6.06 mm², made in each block of the exposed enamel surface center.

The blocks were selected based on initial surface microhardness (SMH) (mean 338.93 ± 33.8 kg / mm²). SMH was evaluated in the central area using a microhardness tester (Micromet 5104, Buehler Ltd., Japan) with a Knoop diamond under a load of 50 grams for 5 seconds by making indentations 5 to 100 micron spacing (Tenuta *et al.*, 2003). Subsequently, the blocks were fixed in 24 well plates (TPP, 24 Zellkultur Testplatte F) to the exposed enamel facing up and subjected to ethylene oxide sterilization. (Bioxxi, Sterilization Services, Rio de Janeiro, RJ, Brazil)

Biofilm formation

Enamel blocks with the previously prepared cell suspensions were sterilized and inoculated with 10⁵ yeast / ml of each isolate of *Candida* in 1 ml of Brain Heart Infusion medium (BHI - BD DifcoTM, Maryland, United States of America) plus 20% sucrose was added to the plate which was incubated at 37 ° C for 28 days. During the 28 days of the experiment, the medium was replaced every 48 hours (Machado *et al.*, 2010; Thein *et al.*, 2007).

Enamel blocks (n = 180) were divided into six groups exposed to biofilms of *S. mutans*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and control (medium without the presence of microorganism). Three enamel slabs were removed from each group on days 3th, 5th, 8th, 15th and 28th after the beginning of the experiment.

Microhardness evaluation

The bovine enamel blocks were submitted again to SMH by a blinded investigator. It was performed with five spaced indentations 100 micron from baseline

(Tenuta *et al.*, 2003). The percentage of loss of surface hardness (SMC%) for the samples was calculated under equation: % SMC = initial SMH - SMH after the induction of biofilm / initial x 100 SMH.

Measurement of biofilm formation

One isolate of each species of *C. non-albicans* for this evaluation was randomly selected. All experiments were performed in triplicate. After biofilm formation, as described above but in 96-well plate as substrate the bottom of each well, the supernatant was removed and two washes in sterile 150 mL of PBS were made. Biofilm quantification was performed by adding 200 μ L 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl) -5 - [(phenylamino) carbonyl] 2H-tetrazolium hydroxide (XTT) (Invitrogen TM, Life Technologies, California, United States) with menadione 1:20 in wells that were formed biofilm. The XTT reduction assay is performed at 37 ° C for 3 hours in the absence of light. After this incubation, 100 μ L of the supernatant was transferred to another 96 well plate and the cultures were placed in the spectrophotometer (Thermo TP-plate Reader) at a wavelength of 492 (Sanchez-Vargas *et al.*, 2013).

Readings were made after the formation of the 3th, 5th, 8th, 15th and 28th day after the induction of biofilm.

Measurement of lactic acid production

Randomly one isolate of each species of *C. non-albicans* were selected for this evaluation. All experiments were performed in triplicate. After biofilm formation, as described above, but in 96-well plate as substrate the bottom of each well, the supernatant of each medium change (48 hours) was removed and analysed. L-lactate was measured enzymatically (Gutmann *et al.* 1974). The detection limit of this method is about 0.05 mmol / L of lactate. The reproducibility and accuracy of the procedure is good, with a coefficient of variation 4-3% (Loveren *et al.*, 2000).

Thickness and topography of the biofilm

Randomly one isolate of each species of *C. non-albicans* to evaluation of this architecture and topographic thickness of the biofilm by confocal laser scanning

microscopy were selected. The protocol established by Chandra et al (2008), was used with modifications to allow the formation of biofilms in borosilicate Tec® 8 well Lab-(Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY). The mature biofilm observed on the 5th day after the induction performed as described above. The biofilms were washed with sterile 150 mL of PBS and incubated with a solution containing 10 mM FUN-1 (red color representing the cytoplasm of metabolically active cells) and 488 (25 ug / ml) fluorescent dyes Alexa Fluor Concanavalin A (color green which is the cell surface and / or extracellular matrix) for 40 minutes at 37 ° C in the absence of light (Chandra et al. 2008). The images were captured in confocal laser scanning microscope TCS SP5 AOBS SECULAR Institute of Biomedical Sciences UFRJ, and analyzed by FIJI ® software. (Max Planck Institute, Dresden, Germany) and the LAS AF Lite ® software (Leica, Berlin, Germany).

Statistical analysis

The data was submitted to descriptive statistical analysis and to compare the results to the loss of SMH%. Statistical significance was set at .05. Kruskal-Wallis and Mann Whitney were used to compare results between the different days and between the different biofilm species each day.

The thickness and lactic acid and confocal resulting biofilms were subjected to a descriptive analysis.

Results

Table 1 shows the results of the percentage loss of surface enamel microhardness (% SMC) of the blocks exposed to different biofilm. All groups showed a gradual increase in the loss of microhardness along the experiment, but only in those exposed to *S. mutans* and *C. albicans* biofilm this was statistically significant.

Comparing the *C. non-albicans* with *C. albicans* group after each day of exposure to biofilm, all of them showed similar loss until the third day of biofilm induction. Only after the 5th day, *C. albicans* showed a greater increase in hardness loss compared to the *C. non-albicans*. Moreover, comparing the species *C. non-albicans* among themselves, *C. tropicalis* showed a greater % loss on the 5th day

compared with *C. parapsilosis* and at the 8th day compared to *C. glabrata*. No statistical difference between *C. parapsilosis* and *C. glabrata* was observed.

Figure 1A shows the percentage loss of hardness caused by non-albicans species, throughout the experiment.

Biofilm formation was detected in all isolates. Figure 1B shows the behavior of biofilm formation among isolates of *C. non-albicans* in every day of the experiment. All isolates exhibited greater biofilm formation on the third day. In the 15th there was a decreased in all samples followed by an increase in the 28th, especially for *C. parapsilosis*.

Figure 1C shows that all species of *C. albicans* produced no-lactic acid after 28 days of the experiment being the final production of *C. tropicalis* higher compared to other isolates.

Qualitative analysis of the images (Figure 2) revealed a uniform biofilm with organization of cells covering most of the substrates having significant presence of yeast and hyphae in all isolates. The quantitative analysis of biofilm Fluorescence transmitted by the different species revealed that the *C. glabrata* showed much greater quantity of extracellular matrix (92,30) and thickness (26,69), whereas *Candida parapsilosis* showed higher cell viability (72 , 62).

Discussion

Caries is a chronic and slowly progressive disease characterized by location and irreversible destruction of tooth structure (Rouabhia *et al.*, 2012). The production of acidogenic substances that promotes loss of tooth minerals (Lemos *et al.*, 2013) and extracellular glucans (Rouabhia *et al.*, 2012) of *S. mutans* did the main agent in the process of decay (Klinke *et al.*, 2009). However, studies indicate interaction of *C. albicans* as a mediator in caries development (Jarosz *et al.*, 2009). HIV-infected children have a higher quantity of *Candida spp.* in the oral cavity (Cerqueira *et al.*, 2007) and a high prevalence of dental caries (Castro *et al.*, 2004). This leads us to believe that exists a direct relationship between these two factors. However, it is unknown the involvement of these species of *C. non-albicans* species in the establishment of caries, although these yeasts are often present in the oral cavity. No

study with this proposal was found in the literature, consequently the results obtained here are unprecedented.

The results of this study corroborate with previous studies (Charone *et al.*, 2013, Klinke *et al.*, 2001) to demonstrate that *C. albicans* and *S. mutans* were both able to promote demineralization of bovine enamel in vitro, and significantly promoted cavitation on the 28th day of evaluation, which did not allow the measurement of superficial microhardness in these groups. In addition, Nikawa *et al.* (2003) demonstrate the ability of *C. albicans* to dissolve hydroxyapatite from the production of lactic acid derived from the fermentation of carbohydrates and Klinke *et al.* (2001), shows that *C. albicans* could increase caries incidence in mice teeth when it is present in your microbiota.

In the present study, *C. non-albicans* caused mineral loss but not with the same intensity. Compared with *C. albicans*, they showed similar behavior at the 3th day of the experiment and only from the 5th day there was a greater mineral loss, caused by *C. albicans*. The greater ability of *C. albicans* to cause mineral loss, comparing to *C. non-albicans* suggesting a higher virulence potential.

Comparing the ability of demineralization among species of *C. non- albicans*, our results suggest that *C. tropicalis* species were more suitable to cause demineralization compared with *C. glabrata* and *C. parapsilosis* as *C. tropicalis* was able to produce a greater loss in the 5th and 8th days. These findings may be related with an increased production of lactic acid by *C. tropicalis* in the results presented here. When the production of acidic substances is high, greater is the capacity of dissolving hydroxyapatite resulting in exposure of dentin collagen leading to the adherence of the yeast in the dental unit (Manfredi *et al.*, 2006). Similar results have also been presented in our previous investigations (Portela *et al.*, 2012). It is noteworthy also that according to Portela *et al.*, 2004, apart from *C. albicans* also *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* may have a greater capacity for virulence, which is in accordance with our study.

Regarding the observation of the ability of biofilm formation, the semi-quantitative assay of XTT reduction of *C. non-albicans* species showed that *C. glabrata* was the main producer of biofilm. Compared with the others, this finding

corroborates the study of Sánchez-Vargas *et al.* (2013) that assessed the isolated *Candida* biofilm formation. They observed a higher biofilm production in *C. glabrata* than in *C. tropicalis*, *C. albicans* and *C. krusei* isolates. However, his studies differed in methodology from ours, since only *Candida* species from oral mucosa and in adult patients were used.

Nevertheless, Calderone, 2011 reported the ability that *Candida* species demonstrated to change their morphology between yeast and hyphal forms contributing to their greater pathogenicity. As regards to the structural arrangement of the biofilm, the results presented here, one could note the presence of the hyphae isolates of *C. parapsilosis* (Figure 2). This finding may be associated with virulence factors that yeast presents, such as dimorphism, adhesins and secretion of proteases as shown by (Manfredi *et al.*, 2006). Protease has the ability to degrade collagen, which is present in 90% of the organic matrix of dentin (Bhaskar *et al.*, 1986) showing high characteristics of pathogenic species of *C.non-albicans* biofilms of children HIV. The evaluation of the topography of the biofilm, however, was only evaluated started on the 5th day after it's induction, since the results of quantification of the biofilm showed a marked decrease in the 8th day of experiment. Under the experiments conditions, the topographic evaluation of the biofilm, as well as the ability to it's formation, may not be related to the ability to cause loss of hardness in vitro as well as the limitations of an in vitro evaluation.

Thus, it is concluded that both *C. albicans* and *C.non-albicans* species have the capacity to induce demineralization of tooth structure reducing the hardness of the enamel as well as producing high amount of lactic acid resultant from biofilm. The control of these fungi in the oral cavity of HIV-infected children is essential not only to prevent oral candidiasis, but also to aid in caries prevention. Considering the high prevalence of caries in these population, further clinical and laboratory research is needed to elucidate further contributing factors of this disease.

References

Bhaskar SN. Orban's oral histology and embryology. 10th ed. Oxford: Blackwell; 1986.

Bosco VL, Birman EG, Cury AE, Paula CR. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. *Pesq. Odontol. Bras.* 2003;17(3): 217-22

Burne RA, Zeng L, Ahn SJ, Palmer SR, Liu Y, Lefebure T, Stanhope MJ, Nascimento MM. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Adv Dent Res.* 2012; 24:77–80.

Calderone RA, Fonzi WA. *Virulence factors of Candida albicans.* *Trends in Microbiology.* 2011; 9(7) 327-35.

Carvalho FG, Parisotto TM, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and association with early childhood caries. *Bras J Oral Sci.*2007; 6: 20.

Castro GF, Souza IPR, Lopes S, Stashenko P, Teles RP. Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic micro-organisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:281-8.

Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L, Soares RMA, Souza IPR, Castro GF. Examining dentinal carious lesions as a predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* spp. in HIVinfected children. *J Dent Child;* 2007; 74:98-103.

Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L, Soares RMA, Souza, I.P; Castro, G.F. Oral candida colonization and its relation with predisposing factors in HIV-infected children and their uninfected sblings in Brazil: the era of highly activeantiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39:188-94.

Chagas MS, Portela MB, Cerqueira DF, de Souza IP, Soares RM, Castro GF. Reduction of *Candida* species colonization in the oral cavity of children infected with human immunodeficiency vírus after dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:383-8.

Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilm. Nat. Protocol. 2008; 3:1909–24.

Charone S, Portela MB, Chagas MS, de Araújo Soares RM, Castro GF. Biofilm of *Candida albicans* from oral cavity of an HIV infected child: challenge on enamel microhardness. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013; 115(4):500-4.

Chattopadhyay A, Caplan DJ, Slade GD, Shugars DC, Tien H-C, Patton LL. Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. Community Dent Oral Epidemiol 2005; 33:35-44.

Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. Oral Microbiol Immunol 1996; 11:59-61.

Gutmann I & Wahlefeld, A. W. Methods of Enzymatic Analysis, pp. 1464–8, Verlag Chemie, Weinheim Germany. 1974.

Jabra-Hizk MA, Falker WA Jr, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus(HIV) infected and non-infected individuals. J Clin Microbiol. 2000; 38:2423-6.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP (2009) *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. Eukaryotic Cell 8:1658–1664.

Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. J Microbiol. 2011; 49:171–177.

Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. Caries Res. 2001; 45:100-6.

Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W: Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. Caries Res 2009; 43: 83–91.

Kutsch VK, Young DA. New directions in the etiology of dental caries disease. *J Calif Dent Assoc.* 2011; 39:716–721.

Lemos JA, Quivey RG Jr, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology.* 2013;159: 436–45

Loveren van C, Buijs JF, ten Cate JM. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model *J Antimicrob Chemoth.* 2000; 45:153–158.

Machado FC, Portela MB, Cunha AC, Souza IPR, Soares RM, Castro GF. Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm. *Rev Odontol UNESP.* 2010; 39:271-5.

Manfredi M, McCullough MJ, AL-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR. In vitro evaluation of virulence attributes of *Candida* spp, isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:183-9.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog* . (2013) 9:e1003616.

Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2003;46:471-8.

Oliveira CA, Tannure PN, De Souza IPR, Maia LC, Portela MB, Castro GFBA. Is dental caries experience increased in HIV-infected children and adolescents? A meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* In press. 2014.

Portela MB, Chagas MS, Cerqueira DF, Souza IPR, Souto-Padrón T Soares, Castro GFBA. Differential collanolytic activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children. *J Oral Pathol Med.* 2012; 113:378-83.

Portela MB, Souza IPR, Costa EMMB, Hagler AN, Soares RMA, Santos ALS. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human

immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5925-7.

Rouabhia M, Chmielewski W. Diseases associated with oral polymicrobial biofilms. *Open Mycol J.* 2012; 6:27–32.

Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Archives of oral biology* 58. 2013; 1320:1318–1326.

Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90:294–303.

Tenuta LMA, Lima JE, Cardoso CL, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. *Pesquisa Odontologica Brasileira.* 2003; 17(4)326-31.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samanarayake LP. In vitro bio-film formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52:761-67.

Zero DT FM, Martinez-Mier EA, Ferrera-Zandona A, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, et al. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries. *JADA.* 2009; 140: 25S–34S.

Table 1: Mean percentage reduction of enamel surface microhardness exposed in different biofilms from isolated from HIV Infected children and *S. mutans* (ATCC) over 28 days experiment .

Day	%SMC/ <i>SD</i> of biofilm <i>S. mutans</i> n=15	%SMC/ <i>SD</i> of biofilm <i>C. albicans</i> n=30	%SMC/ <i>SD</i> of biofilm <i>C. glabrata</i> n=15	%SMC/ <i>SD</i> of biofilm <i>C. parapsilosis</i> n=75	%SMC/ <i>SD</i> of biofilm <i>C. tropicalis</i> n=15	%SMC/ <i>SD</i> of biofilm controle n=15
3 th	58,42±27,77	31,01±24,62	18,19±3,56	18,35±12,27	18,12±16,97	8,42±7,43
5 th	79,10±17,98	74,52±12,12 ^{a,d,g}	15,80±15,87 ^a	13,11±17,25 ^{d*}	32,62±17,17 ^{g*}	9,31±9,40
8 th	69,34±18,23	85,89±7,22 ^{b,e,h}	12,61±4,83 ^{b**}	23,75±17,41 ^e	36,55±11,06 ^{h**}	0,58±7,46
15 th	87,09±5,18	91,39±6,31 ^{c,f,i}	21,91±5,89 ^c	20,75±18,71 ^f	26,44±24,95 ⁱ	2,20±4,11
28 th	---	---	32,56±20,34	23,76±13,03	45,45±28,55	20,76±26,79
<i>p</i> value (Kruskall-Wallis)	0,013	0,013	0,375	0,086	0,500	0,469

Teste Mann-Whitney. Test *p* value >.05

^{a,b,c,d,e,f,g,h,i,**} Significant statistical difference in SMC

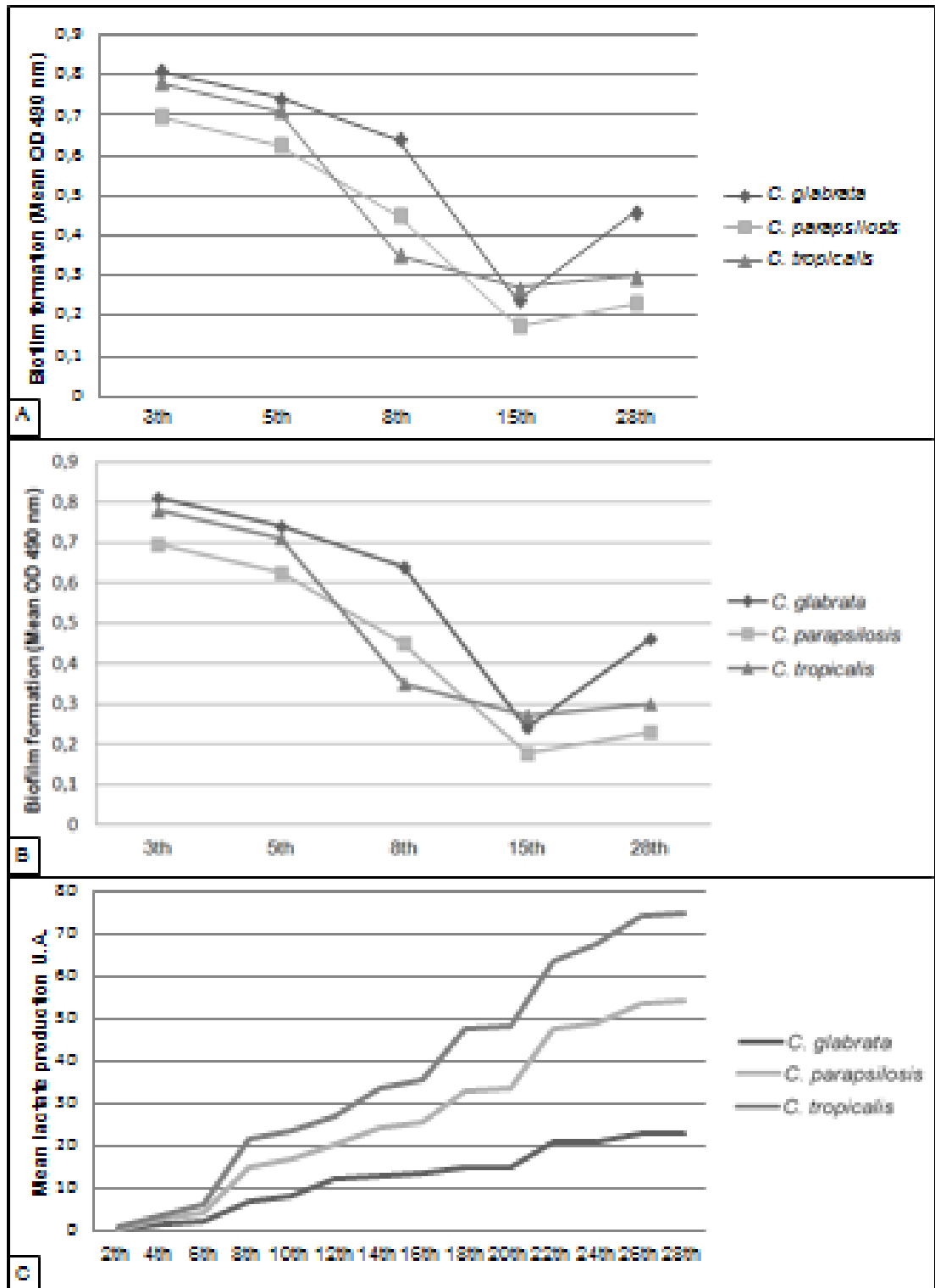


Figure 1 Behavior to isolated to *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* from HIV Infected over 28 days experiment . (A). Percentage of microhardness reduction (noncumulative) in enamel; (B) Biofilm production categorization among isolated; (C) Lactate measurement production.

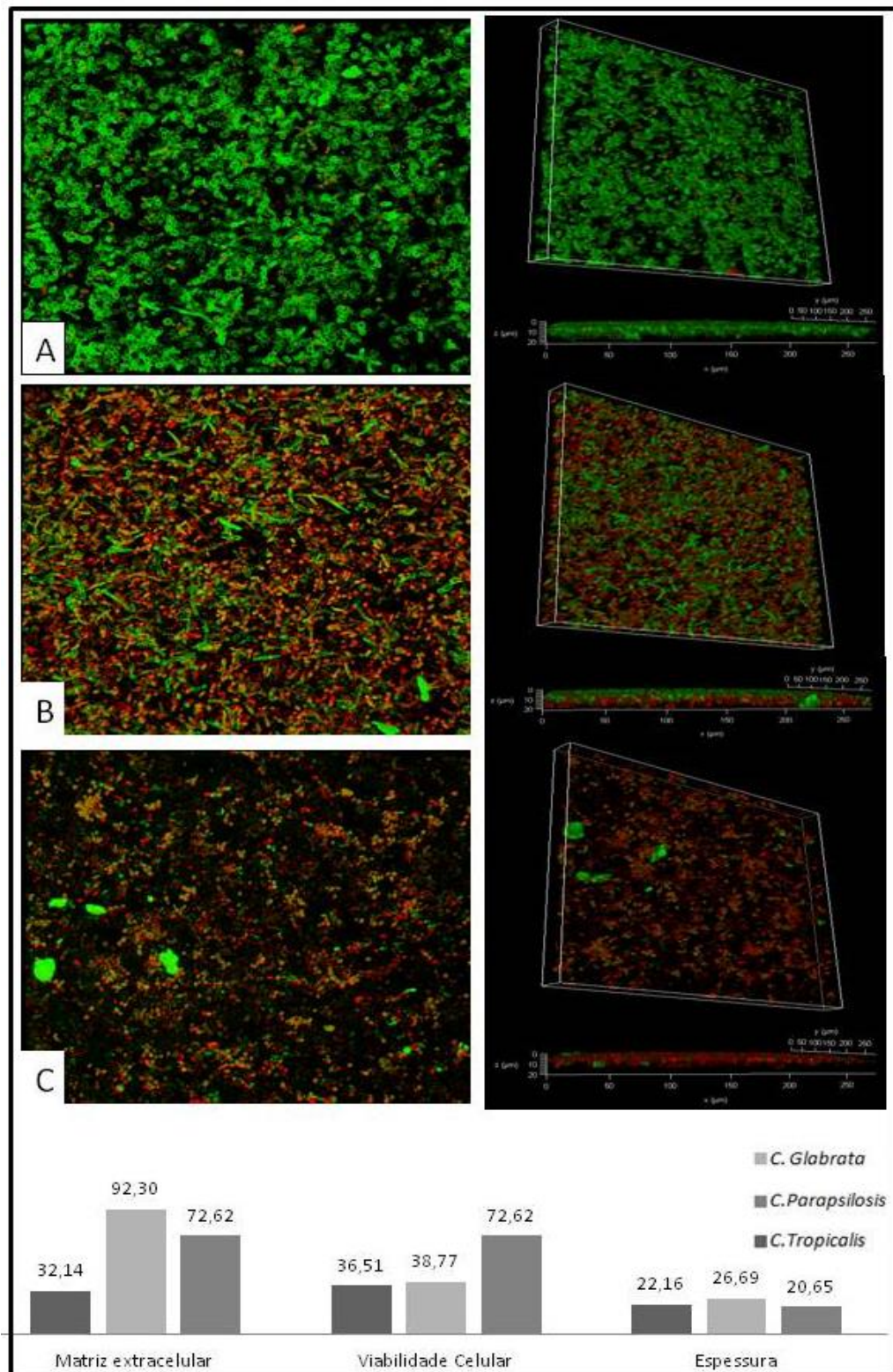


Figure 2 Confocal scanning laser microscopy of *Candida* spp. biofilms. A representative strain of (A) *C. glabrata*, (B) *C. parapsilosis*, (C) *C. tropicalis*, were selected in order to illustrate the presence of yeasts, hyphae, pseudohyphae, different arrange and density of mature biofilm formed by *Candida* species. Biofilm thickness (μm) of each specie that underwent CLSM was determined by merging orthogonal view. Side-view images were obtained using software LAS-AF 4.1.2. Magnification: 40x.

5. DISCUSSÃO

A cárie dentária continua apresentando elevadas prevalências em crianças infectadas pelo HIV, apesar da ênfase na prevenção voltada para esta população (Cerqueira *et al.*, 2007). A literatura demonstra que a prevalência desta doença nas crianças infectadas é maior do que nas saudáveis, principalmente naquelas mais jovens e em dentição decídua (Oliveira *et al.*, 2014). Estudos comprovam também que crianças infectadas pelo HIV apresentam maior quantidade de *Candida* spp. na cavidade oral quando comparadas a crianças clinicamente saudáveis (Portela *et al.*, 2004; Cerqueira *et al.*, 2007). A capacidade deste fungo em formar biofilme se caracteriza por um processo multicelular complexo baseado na adesão celular, crescimento e mudança morfogênica do estado levedura para a forma filamentosa (Deveau & Hogan, 2011; LI *et al.*, 2007).

A associação entre espécies de *Candida* e o estabelecimento da cárie dentária tem sido relatada em vários trabalhos não só relacionados a pacientes infectados pelo HIV (Grabris *et al.*, 1999; Radford *et al.*, 2000; Mondin, 2003; Hossain *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2006; 2007; Cerqueira *et al.*, 2010; Metwalli *et al.*, 2013; Sztajer *et al.*, 2014). Chagas *et al.* (2009) ao realizar um estudo com crianças infectadas demonstraram correlação significativa entre o número de dentes com cárie atingindo dentina e a quantidade de espécies de *Candida* na mucosa desses pacientes. Ainda, estudos *in vitro* sugerem que espécies de *C. albicans* apresentam um alto potencial acidogênico e capacidade para causar perda mineral, sendo portanto um coadjuvante do processo de estabelecimento da cárie dentária (Samaranayake *et al.*, 1986, Nikawa *et al.*, 2003, Charone *et al.*, 2013) . Além disso, Klinker *et al.* (2001) demonstraram que a *C. albicans* é capaz de aumentar a incidência de cárie em ratos quando associado a uma microbiota de baixo potencial cariogênico.

Na literatura consultada até o presente momento, porém, não foram encontradas pesquisas sobre o envolvimento das espécies de *C. não-albicans* frente esse processo. Devido ao crescente número de pacientes imunossuprimidos e infectados pelo HIV, cuja expectativa de vida nos últimos anos tem aumentado frente aos avanços da terapia antirretroviral, e nos quais a presença de espécies de *C.*

não-albicans na cavidade bucal tem se tornado comum, torna-se importante este tipo de investigação. Adicionalmente, muitos casos de infecções bucais graves e resistentes a terapia antifúngica convencional tem sido associada a estas espécies *C. não-albicans* (Portela *et al.*, 2004) o que nos faz crer que estas espécies, assim como a *C. albicans*, apresentar capacidade para interferir no processo da doença cárie em crianças infectadas pelo HIV.

Na primeira etapa desse trabalho, foi realizada uma análise comparativa, *in vitro*, do potencial de desmineralização do esmalte dentário bovino exposto a biofilmes formados por isolados de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* previamente coletados por Charone (2009), oriundos de crianças infectadas pelo HIV. Para tal, foi utilizado o modelo de formação de biofilme sobre blocos de esmalte que, de acordo com Fontana *et al.* (2004), é o melhor modelo *in vitro* para o desenvolvimento de lesões de cárie.

O biofilme dentário se caracteriza como um reservatório de nutrientes propiciando o estabelecimento de uma comunidade microbiana. Os metabólitos resultantes dessa comunidade, dentre eles a produção de ácido e glucanas extracelular favorecem a ligação desses microrganismos ao dente (Kidd *et al.*, 2007; Isalm *et al.*, 2007; Roubhia *et al.*, 2012). Adicionalmente, de acordo com Nikawa *et al.*, (1998) componentes da parede celular das leveduras interagem eletrostaticamente com íons de cálcio e fosfato estabelecendo uma efetiva aderência com hidroxiapatita, contribuindo dessa forma na ligação em superfícies sólidas (Cannon *et al.*, 1995).

No presente estudo, observamos que a capacidade do *S. mutans* e da *C. albicans* de promoverem desmineralização do esmalte bovino *in vitro* foi significativamente maior (Charone *et al.*, 2013 e Klinker *et al.*, 2001). No 28º dia de avaliação, após a indução inicial do biofilme, ambos os grupos (*C. albicans* e *S. mutans*) foram capazes de provocar perda de estrutura superficial do esmalte, inviabilizando, dessa forma, a mensuração no que se refere a sua perda da microdureza. Esses resultados podem ser justificados por autores que demonstram que, além do *S. mutans*, a *C. albicans* também apresenta capacidade de dissolver hidroxiapatita (Nikawa *et al.*, 2003) a partir de sua elevada produção de ácido. Frente a esta significativa capacidade de provocar desmineralização no esmalte bovino,

justificamos a inclusão destes dois grupos na presente pesquisa para fins de comparação com os resultados das cepas de *C. não-albicans*.

No que se refere ao *S. mutans*, considerado como principal agente etiológico no estabelecimento da doença cárie (Tanzer *et al.*, 2001), seu potencial na perda de mineral já foi estabelecido (Filoche *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2011; Arthur *et al.*, 2013) assim como o da *C. albicans*. (Charone *et al.*, 2013) Desta forma, como já citado anteriormente, optamos pela utilização de uma cepa ATCC deste microrganismo como controle positivo da desmineralização do esmalte bovino. Na literatura consultada, a maioria dos modelos de formação de biofilme com *S. mutans* também utiliza uma cepa padrão deste microrganismo (Ccahuana-Vasquez *et al.*, 2010; Rymovicz *et al.*, 2013).

No que se refere à atuação das espécies de *C. não-albicans*, o presente estudo mostrou que elas também foram capazes de promover perda mineral, ainda que de forma reduzida. Quando comparadas com os valores de desmineralização de *C. albicans*, elas apresentaram comportamento similar até o 3º dia de experimento e somente a partir do 5º dia notou-se uma maior perda causada pela *C. albicans* demonstrando uma maior capacidade da *C. albicans* em causar perda mineral, frente as *C. não-albicans*, sugerindo um maior potencial de virulência da primeira.

Já, comparando a capacidade de desmineralização entre as espécies de *C. não-albicans*, nossos resultados sugerem que a espécie de *C. tropicalis* apresenta maior potencial de desmineralização quando comparada com *C. glabrata* e *C. parapsilosis* por ter sido capaz de causar maior perda nos 5º e 8º dias. De forma análoga, ao observar alguns fatores de virulência como a produção e secreção de proteases por espécies de *Candida*, resultados similares foram demonstrados por nosso grupo de pesquisa (Portela *et al.*, 2012). Vale ressaltar também, de acordo com Portela *et al.* (2004), que depois da *C. albicans*, a *C. tropicalis* tende a apresentar maior virulência dentre as *não-albicans*.

Em estudos de formação de biofilme *in vitro*, lâminas de vidro (Koo *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008) ou discos de hidroxiapatita pré-fabricados (Badet *et al.*, 2008) são utilizados como superfícies de aderência. De uma maneira geral, indica-se que o substrato a ser avaliado seja semelhante ao cavidade bucal, e por isso os dentes

usados como substrato em estudos *in vitro*, mimetizam melhor a realidade, sendo assim os modelos mais utilizados (Cacahuana-Vasquez *et al.*, 2010; Azevedo *et al.*, 2011; Van De Sande *et al.*, 2011). Desta forma, optamos pela utilização de blocos de esmalte bovino, já que apresentam semelhança estrutural com o esmalte humano e vem sendo bastante utilizados em estudos *in vitro*, devido a maior facilidade de obtenção (Azevedo *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2012; Giacaman *et al.*, 2013).

Após a indução do biofilme sobre os fragmentos de esmalte bovinos e avaliação da modificação da microdureza superficial, optamos por quantificar a capacidade de formação de biofilme das espécies de *C. não-albicans* utilizadas no presente estudo a fim de traçar uma associação com o dano causado na superfície do esmalte. Já é sabido que a adesão aos tecidos do hospedeiro é a fase inicial para a colonização e posterior infecção por *Candida* spp. (Bendel & Hostetter, 1993). Após a adesão inicial, a capacidade de formação de biofilme é um importante fator de virulência de *Candida* spp. (Luca *et al.*, 2012). Nossos resultados mostraram que todos os isolados de *C. não-albicans* apresentaram a capacidade de formar biofilme *in vitro*, característica envolvida na patogênese das doenças causadas por esses microrganismos (Sardi *et al.*, 2013). Além disso, a organização em biofilme também confere a este fungo maior resistência e menor susceptibilidade a antimicrobianos (Mathé & Dijck, 2013). A *C. glabrata* foi a maior produtora de biofilme comparada as demais. Esse achado corrobora com o estudo de Sánchez-Vargas *et al.* (2013) onde essa espécie também se apresentou com maior produção de biofilme comparada com *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. krusei*, isolados da mucosa oral de pacientes adultos. Mane *et al.*, (2013) estudaram a formação de biofilme por isolados orais de *Candida* de pacientes infectados pelo HIV, porém seus resultados diferiam uma vez que a maior produção de biofilme se deu pela *C. tropicalis*, seguido por *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*.

Ainda, de acordo com os nossos resultados de formação de biofilme através da mensuração de células viáveis pela reação do XTT, observou-se que o ponto de maturação do biofilme para todas as espécies estudadas foi o 5^o dia. A partir desse tempo, os resultados demonstram decréscimo acentuado na quantidade de células viáveis. Desta forma, a avaliação da topografia do biofilme, através de microscopia confocal, se deu neste dia. Com esta metodologia de avaliação (microscopia

confocal), também pudemos observar que o biofilme formado pelo isolado de *C. parapsilosis* apresentou hifas na sua composição. Calderone (2012) caracteriza que essa capacidade em mudar sua morfologia de levedura para formas de hifas pode estar diretamente relacionada com a sua patogenicidade. Berman e Sudbery, (2002) também enfatizam que essas leveduras são dotadas de dimorfismo, ou seja, é capaz a existir tanto como uma levedura, pseudohifas e hifas, e essa característica é conhecida como o principal determinante de virulência.

Um critério crucial para se determinar características de cariogenicidade de um microrganismo é a quantidade de ácido produzido por unidade de tempo. Portanto, vários estudos avaliam *in vitro* as mudanças de pH causadas por microrganismos orais (Klinke *et al.*, 2009; Kneist *et al.*, 2012). Sob condições experimentais, a produção de ácido é influenciado pelo pH atual, capacidade tampão do meio, densidade celular e fase de crescimento do microrganismo (Birkhed *et al.*, 1978) e esses fatores dificultam a comparação e interpretação dos nossos resultados com os demais na literatura.

Assim, a terceira etapa desse trabalho, foi avaliar a capacidade de produção de ácido láctico pelos biofilmes formados. A reprodutibilidade e precisão desse procedimento é satisfatória, com um coeficiente de variação de 4 a 3% (Loveren *et al.* 2000). Nossos resultados demonstraram maior produção de ácido láctico por *C. tropicalis* seguida da *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Esse resultado podem estar associados a maior redução da microdureza promovida pela *C. tropicalis*. Com isso, quanto maior a produção de substâncias ácidas, maior capacidade de dissolução de hidroxiapatita, o que pode resultar na exposição de colágeno da dentina e favorecer, dessa forma, também na adesão dessas leveduras na unidade dentária (Manfredi *et al.* 2006). Porém, *C. tropicalis* se apresentou com a menor capacidade de formação de biofilme. A associação desses resultados sugere que essa espécie seja categorizada como a mais cariogênica dentre as cepas de *C. não-albicans* do presente estudo.

Portanto, com base nos resultados apresentados na presente pesquisa, torna-se evidente a necessidade de novas avaliações visto que ainda há muito a investigar sobre estas espécies. Estes estudos devem ser feitos, não apenas no âmbito de se evitar a candidíase oral, mas também na prevenção da doença cárie.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

Espécies de *Candida não-albicans* isoladas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV, apresentaram potencial de desmineralização, in vitro, sobre o esmalte bovino.

- As espécies de *C. não-albicans* isolados do biofilme dental de crianças infectadas pelo HIV demonstraram moderado potencial de redução na microdureza superficial do esmalte bovino quando comparados com *C. albicans* e *S.*
- A *Candida glabrata* confere maior capacidade de formação de biofilme isoladas do biofilme supragengival de crianças infectadas pelo HIV.
- A *Candida tropicalis* apresenta maior capacidade de desmineralização do esmalte bovino, bem como maior produção de ácido láctico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bhaskar SN. Orban's oral histology and embryology. 10th ed. Oxford: Blackwell; 1986.

Bosco VL, Birman EG, Cury AE, Paula CR. Yeasts from the oral cavity of children with AIDS: exoenzyme production and antifungal resistance. *Pesq. Odontol. Bras.* 2003;17(3): 217-22.

Burne RA, Zeng L, Ahn SJ, Palmer SR, Liu Y, Lefebure T, Stanhope MJ, Nascimento MM. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Adv Dent Res.* 2012; 24:77–80.

Calderone RA, Fonzi WA. *Virulence factors of Candida albicans*. *Trends in Microbiology.* 2011; 9(7) 327-35.

Carvalho FG, Parisotto TM, Hebling J, Spolidorio LC, Spolidorio DMP. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and association with early childhood caries. *Bras J Oral Sci.*; V.6, n. 20, 2007.

Castro GF, Souza IPR, Lopes S, Stashenko P, Teles RP. Salivary IgA to cariogenic bacteria in HIV-positive children and its correlation with caries prevalence and levels of cariogenic micro-organisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:281-8.

Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L, Soares RMA, Souza IPR, Castro GF. Examining dentinal carious lesions as a predisposing factor for the oral prevalence of *Candida* spp. in HIVinfected children. *J Dent Child*; 2007;74:98-103.

Cerqueira DF, Portela MB, Pomarico L, Soares RMA, Souza, I.P; Castro, G.F. Oral candida colonization and its relation with predisposing factors in HIV-infected children and their uninfected sblings in Brazil: the era of highly activeantiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39:188-94.

Chagas MS, Portela MB, Cerqueira DF, de Souza IP, Soares RM, Castro GF. Reduction of *Candida* species colonization in the oral cavity of children infected with human immunodeficiency virus after dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:383-8.

Chandra J, MukherjeePK, Ghannoum MA. In vitro growth and analysis of *Candida* biofilm. *Nat.Protocol.* 2008; 3:1909–24.

Charone S, Portela MB, Chagas MS, de Araújo Soares RM, Castro GF. Biofilm of *Candida albicans* from oral cavity of an HIV infected child: challenge on enamel microhardness. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 115(4):500-4.

Charone S. Prevalência de *Candida spp.* isoladas de biofilme dental e sua associação com a doença cárie em crianças infectadas pelo vírus da

imunodeficiência humana (HIV). 2009, 106f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

Chattopadhyay A, Caplan DJ, Slade GD, Shugars DC, Tien H-C, Patton LL. Risk indicators for oral candidiasis and oral hairy leukoplakia in HIV-infected adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:35-44.

Falsetta ML, Klein MI, Lemos JA, Silva BB, Agidi S, et al. Novel antibiofilm chemotherapy targets exopolysaccharide synthesis and stress tolerance in *Streptococcus mutans* to modulate virulence expression in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:6201–11.

Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11:59-61.

Gutmann I & Wahlefeld, A. W. *Methods of Enzymatic Analysis*, pp. 1464–8, Verlag Chemie, Weinheim Germany. 1974.

Hodgson TA, Greenspan D, Greenspan JS. Oral lesions of HIV disease and HARRT in industrialized countries. *Adv Dent Res*.2006; 19:57-62.

Jabra-Hizk MA, Falker WA Jr, Merz WG, Baqui AAMA, Kelley JI, Meiller TF. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from human immunodeficiency virus(HIV) infected and non-infected individuals. *J Clin Microbiol*. 2000;38:2423-6.

Jabra-Hizk MA, Falker WA, Merz WG. et al. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and non-infected individuals. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6): 2423-6.

Jarosz LM, Deng DM, van der Mei HC, Crielaard W, Krom BP (2009) *Streptococcus mutans* competence-stimulating peptide inhibits *Candida albicans* hypha formation. *Eukaryotic Cell* 8:1658–1664.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005; 13:589–95.

Jenkinson, H.F.; Lala, H.C.; Shepherd, M.G. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. *Infect Immun*. 1990; 58:1429-36.

Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*.2004; 83:35-8.

Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 2011; 49:171–177.

Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res*. 2001; 45:100-6.

Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W: Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res* 2009; 43: 83–91.

Klinke T, Kneist S, De Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, Klimm W. Acid Production by Oral Strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Res* 2009;43:83–91.

Kneist S, Kubieziel H, Willershausen B, Küpper H, Callaway A. Modeling of *S mutans* and *A naeslundii* acid production in vitro with caries incidence of low- and high-risk children. *Quintessence Int.* 2012; 43(5):413-20.

Kolenbrander PE, Anerson RX, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, et al. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002; 66:486–505.

Kutsch VK, Young DA. New directions in the etiology of dental caries disease. *J Calif Dent Assoc.* 2011; 39:716–721.

Lemos JA, Quivey RG Jr, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology.* 2013;159: 436–45.

Loveren van C, Buijs JF, ten Cate JM. The effect of triclosan toothpaste on enamel demineralization in a bacterial demineralization model *J Antimicrob Chemoth.* 2000; 45:153–158.

Machado FC, Portela MB, Cunha AC, Souza IPR, Soares RM, Castro GF. Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. biofilm. *Rev Odontol UNESP* 2010; 39:271-5.

Manfredi M, McCullough MJ, AL-Karaawi ZM, Vescovi P, Porter SR. In vitro evaluation of virulence attributes of *Candida* spp, isolated from patients affected by diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:183-9.

Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog* . (2013) 9:e1003616.

Naglik, J.R.; Challacombe, S.J.; Hube, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Ver.* 2003; 67:400-28.

Nikawa H, Yamashiro H, Makihiro S, et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2003;46:471-8.

Nishimura, M.; Nikawa, H.; Yamashiro, H.; Hamada, T. Embry G Cell-associated collagen activity by *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 2002; 153:125-8.

Oliveira CA, Tannure PN, De Souza IPR, Maia LC, Portela MB, Castro GFBA. Is dental caries experience increased in HIV-infected children and adolescents? A meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* In press. 2014.

- Pinheiro RS, França TT, Ribeiro CMB, et al. Oral manifestations in human immunodeficiency virus infected children in highly active antiretroviral therapy era. *Oral Pathol Med.* 2009;38:613-22.
- Pomarico L, Portela MB, Rojas GCA, Souza IPR, Soares RMA, Castro GF. Cariogenic and erosive potential of the medication used by HIV infected children: pH and sugar concentration. *Community Dental Health.* 2008; 25:170-2.
- Pongsiriwet S, Iamaroon A, Sriburee P, Pattanaporn K, Krisanaprakornkit S. Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in Northern Thailand. *J. Oral Sci.* 2004; 46(2):101-5.
- Portela MB, Chagas MS, Cerqueira DF, Souza IPR, Souto-Pradón T Soares, Castro GFBA. Differential collanolytic activity of *Candida albicans* isolated from oral mucosa and dentinal carious lesions of HIV-infected children. *J Oral Pathol Med.* 2012; 113:378-83.
- Portela MB, Souza IPR, Costa EMMB, Hagler AN, Soares RMA, Santos ALS. Differential recovery of *Candida* species from subgingival sites in human immunodeficiency virus-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5925-7.
- Redford JR, Ballantyne HM, Nugent Z, Beighton D, Roberstson M, Longbottom C, Pitts NB. Caries-associated microorganisms in infants from different socio-economic backgrounds in Scotland. *J Dent.* 2000; 28(5): 307-12.
- Rego, M.A.; Koga-ito, C.Y.; Jorge, A.O. Effects of oral environment stabilization procedures on counts of *Candida* ssp. in children. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4)322-6.
- Rios D, Honorio HM Magalhaes AC, Buzalaf MA, Palma-Dibb RG, Machado MA, Da Silva SM. Influence of toothbrushing on enamel softening and abrasive wear of eroded bovine enamel: an in situ study. *Braz Oral Res.* 2006; 20(2): 148–154.
- Rouabhia M, Chmielewski W. Diseases associated with oral polymicrobial biofilms. *Open Mycol J.* 2012; 6: 27–32.
- Sánchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. *Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species.* *Archives of oral biology* 58. 2013; 1320:1318–1326.
- Starr, J.R.; White, T.C.; Leroux, B.G. et al. Persistence of oral *Candida albicans* carriage in healthy Portuguese schoolchildren followed for 3 years. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17:304-10.
- Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011; 90:294–303.
- Tenuta LMA, Lima JE, Cardoso CL, Tabchoury CP, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. *Pesquisa Odontologica Brasileira.* 2003; 17(4)326-31.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samanarayake LP. In vitro bio-film formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52:761-67.

Zero DT FM, Martinez-Mier EA, Ferrera-Zandona A, Ando M, Gonzalez-Cabezas C, et al. The biology, prevention, diagnosis and treatment of dental caries. *JADA.* 2009; 140: 25S–34S.

CARVALHO, F.G.; PARISOTTO, T.M.; HEBLING, J.; SPOLIDORIO, L.C.; SPOLIDORIO, D.M.P. Presence of *Candida* spp. in infants oral cavity and association with early childhood caries. *Bras J Oral Sci.*; V.6, n. 20, 2007.

Grabis K, Nagy G, Madlena M, Denes Z, Marton S, Keszthelyi G, Banoezy J. Associations between microbiological and salivary caries activity tests and caries experience in Hungarian adolescents. *Caries Res.* 1999; 33(3):191-5.

Hossain H, Ansari F, Schulz-Weidner N. et al. Clonal identity of *Candida albicans* in the oral cavity and the gastrointestinal tract of pre-school children. *Oral Microbiol Immun.* 2003;18:302-8.

Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Murata H, Subiwahjudi A. The effect of saliva or serum on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* colonization of hydroxylapatite beads. *J Dent.* 1998; 26:31–7.

Samaranayake LP, Hughes A, Weetman DA, Macfarlane TW. Growth and acid production of *Candida* species in human saliva supplemented with glucose. *J Oral Pathol.* 1986; 15:251–4.

Van De Sande FH, Azevedo MS, Lund RG, Huysmans MC, Cenci MS. An in vitro biofilm model for enamel demineralization and antimicrobial dose response studies. *Biofouling.* 2011; 27(9):1057-63.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001;65:1028-37.

Soares DN, Valinoti AC, Pierro VS, Antonio AG, Maia LC. Crosssectional microhardness of bovine enamel subjected to three paediatric liquid oral medicines: an in vitro study. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2012; 13(5):261-5.

Rymovicz AU, Ronsani MM, Grégio AM, Guariza-Filho OG, Tanaka O, Rosa EA. Virulence modulation of *Streptococcus mutans* biofilms by metal ions released from orthodontic appliances. *Angle Orthod.* 2013 83(6):987-93.

Kim JE, Kim HE, Hwang JK, Lee HJ, Kwon HK, Kim BI. Antibacterial characteristics of curcuma xanthorrhiza extract on *Streptococcus mutans* biofilm. *The Journal of Microbiology.* 2008; 46(2):228-32.

Kooh H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2003; 52:782–9.

- Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(2):73-9.
- Badet C, Furiga A, Thébaud N. Effect of xylitol on an in vitro model of oral biofilm. *Oral Health Prev Dent.* 2008; 6(4): 337-4.
- Giacaman RA., Campos P, Muñoz-Sandoval C, Castro RJ. Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel. *Arch Oral Biol.* 2013; 58(9):1116-22.
- Mane A, Kulkarni A, Risbud A. *Biofilm production in oral Candida isolates from HIV-positive individuals from Pune, India*, *Mycoses.* 2013; 56:182–6.
- Mathé L, Dijck PV. *Recent insights into Candida albicans biofilm resistance mechanisms.* *Curr Genet.* 2013; 59:251-64.
- Luca CD, Guglielminetti M, Ferrario A, Calavrò M, Cassari E. *Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility.* *New Microb.* 2012; 35:459-69.
- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJS. *Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.* *Journal of Medical Microbiology.* 2013; 62:10–24.
- Bendel CM, Hostetter MK. *Distinct Mechanisms of Epithelial Adhesion for Candida albicans and Candida tropicalis - Identification of the Participating Ligands and Development of Inhibitory Peptides.* *J. Clin. Invest.* 1993; 92:1840-9.
- Li F, Svarovsky M J, Karlsson AJ, Wagner JP, Marchillo K, Oshel P, Andes, D. & Palecek SP. Eap1p, an adhesin that mediates *Candida albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(6):931-9.
- Isalm B KS, Khan AU. Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit.* 2007; 13: RA196–203.
- Cannon RD, Nand AK, Jenkinson HF: Adherence of *Candida albicans* to human salivary components adsorbed to hydroxylapatite. *Microbiology* 1995; 141: 213–9.
- Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral Research.* 2010; 24:135-41.
- Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. A Defined-Multispecies Microbial Model for Studying Enamel Caries Development. *Caries Res.* 2013; 47(4):318-24.
- Azevedo MS, Van De Sande FH, Romano AR, Cenci MS. Microcosm biofilms originating from children with different caries experience have similar cariogenicity under successive sucrose challenges. *Caries Res.* 2011; 45(6):510-7.

Kidd EAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004; 83: C35–C38.

Deveau A, &Hogan DA. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans*. *Methods Mol Biol.* 2011; 692:219-33.

Birkhed D: Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material. *Caries Res.* 1978; 12: 128– 6.

8. ANEXOS